



**Universitat  
Autònoma  
de Barcelona**

**El 17- $\beta$ -estradiol frente a la muerte  
apoptótica en neuronas granulares  
de cerebelo: efectos sobre la  
supervivencia y modulación de la  
plasticidad neuronal**

**Alfredo Jesús Miñano Molina**

**TESIS DOCTORAL**

**Bellaterra 2006**



Universitat Autònoma de Barcelona

**Departament de Bioquímica i de Biologia Molecular**  
Unitat de Bioquímica de Medicina

**El 17- $\beta$ -estradiol frente a la muerte apoptótica en neuronas granulares de cerebelo: efectos sobre la supervivencia y modulación de la plasticidad neuronal.**

Memoria de tesi doctoral presentada per en Alfredo Jesús Miñano Molina per optar al grau de Doctor en Bioquímica i Biologia Molecular per la Universitat Autònoma de Barcelona.

El treball ha estat realitzat sota la direcció del Dr. José Rodríguez Álvarez, professor titular del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Bellaterra, 17 de Maig de 2006

Doctorant

Director de Tesi

Alfredo Jesús Miñano Molina

Dr. José Rodríguez Álvarez

Este estudio se ha realizado con la financiación de los proyectos:

- Ministerio de Ciencia y Tecnología SAF2001-1941
- Ministerio de Ciencia y Tecnología SAF2005-05106
- Ministerio de Sanidad y Consumo Red G03/167

Este estudio también se ha beneficiado de una beca del Ministerio de Educación y Ciencia para la Formación del Profesorado Universitario (AP2001-3147).

*“Me parece que aquellos que sólo se basan en argumentos de autoridad para mantener sus afirmaciones, sin buscar razones que las apoyen, actúan en forma absurda. Desearía poder cuestionar libremente y responder libremente sin adulaciones. Así se comporta aquel que persigue la verdad.”*

*Vincenzo Galilei  
(padre de Galileo Galilei)*

*“LA VERDAD  
OS HARÁ LIBRES”*

*(Jn 8, 32)*

*“Si cantas solo con la voz,  
por fuerza tendrás al fin que callar;  
canta con la vida para no callar jamás.”*

*San Agustín*

*A mis padres, Alfredo y Pilar  
por serlo todo para mi y enseñarme día a día a ser quien soy.  
A mi hermana M<sup>a</sup> Carmen  
por quererme tanto, tener siempre a punto su encantadora sonrisa  
mostrándome qué fácil es ser feliz.  
A mis tíos y abuelos  
por sus ánimos y creer siempre en mis posibilidades.  
Y a Montse  
por su amor incondicional.*

## ÍNDICE

Índice .....	i
Abreviaturas .....	vii
Agradecimientos .....	xi
<b>I – INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1. EL CEREBRO EN DESARROLLO .....</b>	<b>3</b>
1.1. El cerebro nos lleva de cabeza .....	3
1.2. Pero, ¿para crecer hay que morir? .....	3
1.3. Enfermedades neurodegenerativas: un siglo de progresos y misterios que aún permanecen .....	6
1.4. Diferentes tipos de muerte neuronal: apoptosis, necrosis y autofagia .....	6
1.4.1. La muerte necrótica .....	8
1.4.2. La apoptosis: aprendiendo de los gusanos .....	10
1.4.2.1. Las caspasas: el principio del fin .....	11
1.4.2.2. Dos caminos, un destino: las dos principales vías apoptóticas en células de mamífero .....	14
1.4.2.3. ¿Pero cómo se libera el citocromo c?: la familia Bcl-2 y otros factores implicados .....	18
1.5. Control de la apoptosis mediante señalización intracelular: vías de transducción implicadas asociadas a supervivencia .....	22
1.5.1. La vía PI3-K/Akt: la principal vía que media la supervivencia neuronal .....	23
1.5.2. Las MAPKs, una gran familia de segundos mensajeros ....	27
1.5.3. Las Proteínas monoméricas G: pequeñas grandes reguladoras .....	33
1.6. Control de la apoptosis mediante señalización intracelular: vías de transducción implicadas asociadas a muerte, JNK/SAPK y p38 .....	35
<b>2. DESARROLLO POSTNATAL DEL CEREBELO: LAS NEURONAS GRANULARES DE CEREBELO .....</b>	<b>37</b>
2.1. Las neuronas granulares <i>in vivo</i> .....	37

2.2. El cultivo de CGCs, un buen modelo para el estudio de la apoptosis .....	39
2.3. ¿Quién juega un papel clave en la muerte apoptótica por depivación de potasio? .....	41
2.4. Entre la vida y la muerte, el papel de ERK y Akt en las neuronas granulares de cerebelo .....	43
<b>3. EL PAPEL DE LA CERAMIDA EN LA APOPTOSIS</b>	<b>46</b>
3.1. Ceramida: síntesis, función y mecanismos en los que está implicada .....	46
3.2. Y en las CGCs, ¿Qué pasa con la ceramida?	51
<b>4. EL 17-β-ESTRADIOL COMO ESTRATEGIA DE NEUROPROTECCIÓN</b>	<b>53</b>
4.1. El 17-β-estradiol en terapias médicas: relación con enfermedades neurológicas .....	54
4.2. Efectos neurotróficos del 17-β-estradiol .....	55
4.3. El estradiol como neuroprotector frente a procesos de muerte celular .....	57
4.3.1. Síntesis de 17-β-estradiol (E2) .....	57
4.3.2. Receptores y mecanismos de acción de los estrógenos ...	59
4.3.3. ¿Cómo interviene el E2 en estos procesos de muerte celular? Relación de sus mecanismos de acción y las dianas moleculares implicadas en esos procesos .....	65
4.3.4. Otras vías de señalización sustrato de los estrógenos .....	66
<b>II – OBJETIVOS</b> .....	<b>69</b>
<b>III – MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>73</b>
<b>1. MATERIAL BIOLÓGICO</b> .....	<b>75</b>
<b>2. METODOLOGÍA PARA LA OBTENCIÓN DE UN CULTIVO PRIMARIO DE NEURONAS DE RATA</b> .....	<b>75</b>

2.1. Obtención de los cultivos primarios (coticales, hipocampales y granulares de cerebelo) .....	75
2.1.1. Reactivos .....	75
2.1.2. Preparación de soluciones necesarias para la elaboración del cultivo .....	76
2.1.3. Composición de los medios de cultivo y del tampón fosfato .....	76
2.1.4. Disección, obtención y disgregación tisular .....	77
<b>3. MANTENIMIENTO Y SUBCULTIVO DE LA LÍNEA CELULAR MCF-7 .....</b>	<b>79</b>
<b>4. PARADIGMAS DE MUERTE NEURONAL Y DISEÑO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>80</b>
4.1. Muerte apoptótica por privación de potasio .....	80
4.2. Muerte apoptótica por C2-ceramida .....	81
4.3. Muerte excitotóxica inducida por Glutamato .....	81
4.4. Muerte necrótica inducida por Peróxido de Hidrógeno .....	82
4.5. Tratamiento de los Cultivos .....	82
<b>5. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD NEURONAL .....</b>	<b>83</b>
5.1. Ensayo de la reducción del MTT, una medida de la actividad mitocondrial .....	83
5.2. Tinción de Hoechst 33258, observación del estado de la cromatina .....	84
5.3. Tinción de Yoduro de Propidio, observación de la integridad membranal .....	84
<b>6. FRAGMENTACIÓN DEL DNA .....</b>	<b>85</b>
<b>7. IMMUNOCITOQUÍMICA .....</b>	<b>85</b>
<b>8. ANÁLISIS DE LA LOCALIZACIÓN DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS ER-<math>\alpha</math> EN CGCs MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL .....</b>	<b>86</b>

<b>9. WESTERN BLOT .....</b>	<b>87</b>
9.1. Reactivos y fórmulas de los tampones utilizados .....	87
9.2. Procesamiento para Western blot .....	88
<b>10. FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR PARA OBTENCIÓN DE UNA FRACCIÓN MITOCONDRIAL .....</b>	<b>89</b>
<b>11. FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR PARA LA OBTENCIÓN DE UNA FRACCIÓN ENRIQUECIDA EN MEMBRANAS .....</b>	<b>89</b>
<b>12. IMMUNOPRECIPITACIONES DE COMPLEJOS PROTÉICOS .....</b>	<b>90</b>
12.1. Preparación de la proteína G <i>Sepharose</i> <sup>TM</sup> .....	90
12.2. Procedimiento de la Immunoprecipitación .....	90
<b>13. MEDIDA FLUORIMÉTRICA DE LA ACTIVIDAD CASPASA .....</b>	<b>91</b>
<b>14. EXTRACCIÓN DE RNA Y AMPLIFICACIÓN POR RT-PCR .....</b>	<b>92</b>
<b>15. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA PROTEÍNA G MONOMÉRICA RAS .....</b>	<b>93</b>
15.1. Purificación de la proteína de fusión GST-c-raf-RBD .....	93
15.2. Preparación de la resina de glutatión-sefariosa e incubación de la resina con la proteína de fusión .....	94
15.3. Aislamiento de la proteína monomérica G del lisado celular .....	95
<b>16. PLÁSMIDOS Y TRANSFECCIONES .....</b>	<b>96</b>
<b>17. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....</b>	<b>97</b>
<b>IV – RESULTADOS .....</b>	<b>99</b>
<b>1. TRABAJO 1.- CASPASE ACTIVATION IN CERAMIDE-MEDIATED APOPTOSIS OF CEREBELLAR GRANULE CELLS IN CULTURE .....</b>	<b>101</b>
1.1. Anexo del trabajo 1 .....	141
1.2. Leyenda de las Figuras suplementarias del trabajo 1.....	143
1.3. Figuras suplementarias del trabajo 1 .....	145



<b>2. TRABAJO 2.- <i>ESTRADIOL DOES NOT PROTECT CEREBELLAR GRANULE NEURONS FROM NEITHER EXCITOTOXICITY NOR APOPTOSIS</i> .....</b>	<b>147</b>
<b>3. TRABAJO 3.- <i>ESTRADIOL FACILITATES NEURITE MAINTENANCE BY SRC/RAS/ERK SIGNALLING PATHWAY</i> .....</b>	<b>189</b>
<b>V – DISCUSIÓN .....</b>	<b>237</b>
<b>VI – CONCLUSIONES .....</b>	<b>255</b>
<b>VII – BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>259</b>

<b>17-<math>\alpha</math>-E2</b>	17- $\alpha$ -estradiol
<b>AF-1</b>	Activation function -1
<b>AIF</b>	Apoptosis inductor factor
<b>AO</b>	Antioxidantes
<b>AP-1</b>	Activating protein - 1
<b>ATP</b>	Adenine tri-phosphate
<b>Bcl</b>	B cell lymphoma
<b>BDNF</b>	Brain-derived neurotrophic factor
<b>BH</b>	Bcl-2 homology
<b>BSA</b>	Bovine serum albumin
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calcio
<b>CaM</b>	Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin protein
<b>CaMK</b>	Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin protein kinase
<b>cAMP</b>	cyclic adenine mono-phosphate
<b>CARD</b>	Caspase recruitment domain
<b>CGCs</b>	Cerebellar granule cells
<b>CREB</b>	cAMP-response-element binding protein
<b>DES</b>	Diethylstilbestrol
<b>DIABLO</b>	Direct IAP-binding protein with low pI
<b>DIV</b>	Dias <i>in vitro</i>
<b>DMEM</b>	Dulbecco's modified eagle medium
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic acid
<b>E2</b>	17- $\beta$ -estradiol
<b>E2-BSA</b>	17- $\beta$ -estradiol 6-(o-carboxymethyl)oxime:BSA)
<b>EGF</b>	Epidermal growth factor
<b>EGFR</b>	Epidermal growth factor receptor
<b>EGL</b>	External granule layer
<b>ER-<math>\alpha</math></b>	Estrogen receptor alpha
<b>ER-<math>\beta</math></b>	Estrogen receptor beta
<b>ERE</b>	Estrogen response element
<b>ERK</b>	Extracellular signal-regulated kinase
<b>FADD</b>	Fas-associated death domain protein
<b>FCS</b>	Foetal calf serum
<b>FKH</b>	Forkhead
<b>GAPDH</b>	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase
<b>GD3</b>	Disialogangliosido D3
<b>GDP</b>	Guanine di-phosphate
<b>GEF</b>	Guanine-nucleotides exchange factor
<b>GSK3</b>	Glycogen synthase kinase
<b>GTP</b>	Guanine tri-phosphate
<b>hsp90</b>	Heat shock protein

## ABREVIATURAS

<b>IAP</b>	Inhibitor of apoptosis protein
<b>ICE</b>	Interleukin 1 $\beta$ -converting enzyme
<b>IGF-I</b>	Insulin-like growth factor -I
<b>IGF-IR</b>	Insulin-like growth factor –I receptor
<b>IGL</b>	Inner granule layer
<b>JNK</b>	c-jun NH2-terminal kinase
<b>K25</b>	25mM KCl
<b>K5</b>	5mM KCl
<b>MAP</b>	Mitogen activated protein
<b>MAPK</b>	Mitogen activated protein kinase
<b>MEK</b>	Extracellular signal-regulated kinase kinase
<b>MEKK</b>	MEK kinase
<b>mER</b>	Membrane estrogen receptor
<b>MTT</b>	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
<b>nER</b>	Nuclear estrogen receptor
<b>NGF</b>	Nerve growth factor
<b>NMDA</b>	N-methyl-D-aspartate
<b>NO</b>	Nitric oxide
<b>NOS</b>	NO synthase
<b>NT</b>	Neurotrophine
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Anión superóxido
<b>ONOO-</b>	Anión peroxinitrito
<b>PARP</b>	Poly-(ADP ribose)- polymerase
<b>PBS</b>	Phosphate buffer saline
<b>PDK</b>	Phosphoinositide-dependent kinase
<b>PH</b>	Pleckstrine homology
<b>PI</b>	Propidium Iodide
<b>PI3K</b>	Phosphatidylinositol-3OH kinase
<b>PKA</b>	Protein kinase A
<b>PKB</b>	Protein kinase B
<b>PKC</b>	Protein kinase C
<b>PMSF</b>	Phenylmethylsulphonyl fluoride
<b>PPT</b>	4,4',4''-(4-Propyl-[1H]-pyrazole-1,3,5-triyl)trisphenol
<b>PTX</b>	Pertussis toxin
<b>RBD</b>	Ras binding domain
<b>ROS</b>	Reactive oxygen species
<b>Rsk</b>	Ribosomal S6 kinase
<b>SDS-PAGE</b>	Sodium dodecyl sulphate – polyacrilamide gel electrophoresis
<b>SRE</b>	Serum response element
<b>SH2</b>	Src homology 2
<b>Smac</b>	Second mitochondria-derived activator caspases

<b>SMasas</b>	Sphingomyelinases
<b>SN</b>	Sistema nervioso
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>SOD</b>	Superoxid dismutase
<b>STS</b>	Staurosporine
<b>TAE</b>	Tris-Acetate-EDTA
<b>TBS-T</b>	Tris-buffered saline/Tween 20
<b>TNF</b>	Tumor necrosis factor
<b>TNFR</b>	Tumor necrosis factor receptor
<b>VDAC</b>	Voltage-dependent activated channels

**AGRADECIMIENTOS**

5 de Julio de 1999 a 6 de Julio de 2006. Siete años y un día. Siete siempre ha sido un número especial a lo largo de la historia y mira por donde, para mi este siete también hará historia. Aún recuerdo el primer día que entré en esta casa, en el primer protocolo que me dejaron quedó reflejada mi primera fecha. Daba comienzo un largo camino que quedará “resumido” en algo más de trescientas páginas. Paradojas de la vida, siete años y un día después, esa persona tímida y asustadiza entraba en el departamento de Bioquímica a colaborar con gran ilusión y la mirada puesta en el doctorado. Ahora, Dios mediante, será Doctor.

No imaginaba tiempo atrás que me encontraría delante de un ordenador portátil, rodeado de montañas de papeles escribiendo el apartado más perseguido y cotizado de una tesis doctoral, los agradecimientos. Y en este apartado, que debiera “resumirse” en otras tantas trescientas páginas, me será del todo imposible reflejar todos los sentimientos, anécdotas, emociones y otras tantas cosas vividas durante todos estos años y que marcan el desarrollo del día a día de lo que debiera y sí lo ha sido para mi una tesis doctoral; razón y corazón fusionados a lo largo de siete años y un día.

Y sin el artífice que me dio la posibilidad de empezar el doctorado, nada hubiese pasado. Así pues, parte de todo esto debo empezar por agradecerse al director de tesis, el Dr. José Rodríguez. Pepe, gracias por darme la posibilidad de iniciarme en este mundo, confiar en mí, darme herramientas para desarrollar a lo largo de este tiempo quien soy y reforzar el cómo soy tanto en la ciencia como en la vida. Por los buenos y no tan buenos momentos vividos, tanto en el laboratorio como fuera de él. Cuentan los sabios del lugar que la tendencia natural de una tesis tiene como colofón “la muerte del director”. No sé por qué extraña razón no es ese mi sentimiento. Quizás tenga algo que ver aquella conversación, de la que aún recuerdo quién hay detrás de aquel espejo...

Claro que para artífices de la tesis, en el verdadero día a día, están los amigos y compañeros de grupo. Aquel grupo de “cuatro” personas (incluida yo) que revolucionaba la ciencia de la Unidad, eh Xavito! Sí, Cristina, la Malagelada, mi *Madame Christine*, Xavi, el Xifró, mi maestro mentor, nuestro *Xavito Cabrón de Borbón* y tú, Melchor, nuestro *Dr.Enigma*, *Alma Mater* y Rey Mago de los Pepe’s.

## AGRADECIMIENTOS

Ai, Cristina, encara recordo aquell bucòlic paisatge de Versalles, llibreta en mà, redactant les aventures d'un jove poc valent, *Sir Qalimer Cor de Lleó*. Quin fart de riure ens vam fer. I això volia recordar de tu, donar-te les gràcies, pel teu somriure, els mmmssss....., els consells científics i no tan científics, els famosos berenars al bar per amagar-nos dels micròfons del despatx i per fer descobrir en la meva persona... què collons, que no era d'orxata!! Per tot això i més, gràcies Cris.

I què agrair a en Xavi. El meu mestre i amic des que vaig entrar a la Unitat de Bioquímica. Doncs l'he d'agrar quasi bé tot el camí que hem fet junts al llarg d'aquests anys. Has estat i seràs com el meu germà gran. Hem après junts ajudant-nos l'un a l'altre a fer ciència, a ser crítics en aquest món i sobre tot, a passar-ho bé a la feina. Des del suport ofert a diari en les meves més que arriscades tàctiques del "poc a poc", passant per les grans batudes per la Unitat com una croada vers el nostre material, i de les aventures del Zorro, què, eh?, sopars, viatges (inclosa nit d'hotel a París...), partides interminables de ping pong, i sobre tot per crear i fomentar a la Unitat juntament amb el Dr. Enigma i Sir Qalimer una nova filosofia de vida, la filosofia del Quake que tantes tardes de glòria ens ha donat. Gràcies pel passat i ben segur que gràcies pel futur.

Ahora si que la hemos hecho buena, confusión, duda. Grandeeeeeeee!!!!!!!!!!!! Y es que para mi, Mel, lo tienes todo para ser uno más de aquel irrepetible *dream team* en el que he vivido gran parte de mi tesis. Eres doctor, Dr. Enigma; haces ciencia de la buena con el *Railgun*, dejando de lado tus asombrosos "Chips de cDNA", claro; y has formado parte de nosotros conviviendo en nuestro despacho, aquella M2-105, que curiosamente hoy es nuestro laboratorio. Por eso y por más cosas que, y te lo digo para no herirte, quedarán entre Xavito y yo, jajajajajaja!!! Espero poder seguir compartiendo guarras, consejos, confidencias, y en definitiva seguir agradeciéndote. Cuento contigo para mi candidatura a Rector, en CQC. Ah, ¡y cuida mucho a tu niño!

Pero el grupo de los Pepes no acabó aquí. Porque el tiempo iba pasando y nuevas incorporaciones llegaron conforme los antiguos miembros hacían méritos para ser nuevos doctores. Primero fue Daniel y el mundo de las levaduras. A pesar de nuestras diferencias en el plano laboral, gracias por hacerme ver que las cosas pueden tener más de una perspectiva. ¡Mucha suerte en el futuro!

Después llegó Bruna, aquella joven alocada de la que no olvidaré jamás la primera imagen nada más llegar. Risueña, llena de ilusión y guapa, muy guapa. Las órdenes eran claras, empezaba a ser una más y debía enseñarle el funcionamiento de todo.

Espero haber contribuido en lo mejor posible aunque al principio diera un poco de miedo, ¿no? Y en todo este tiempo, que no es poco has sido tú la que me has enseñado infinidad de cosas, empezando por el efecto “Buffer”, mil intentos por enseñarme lo que es la relajación, por ese instinto maternal que siempre estaba ahí y que era tan necesario en el grupo, y por enseñarme lo que es vivir un poco fuera del laboratorio. Lo hemos pasado muy bien y sin ti el grupo de los Pepe’s no hubiese sido el mismo. Hemos reído mucho, hemos soltado alguna lagrimilla, también hemos trabajado a tope y de verdad que ha sido un placer estar a tu lado, “conversando” mientras llenábamos infinidad de cajas de puntas, eh? No pierdas nunca la ilusión que llevas dentro y no cambies, ¡eres maravillosa!

Y poco después la familia de los Pepe’s volvía a crecer. Se oían rumores sobre un vasco con un nombre algo extraño que debía llegar, pero que antes de llegar ya había cogido vacaciones. Vaya, el nuevo apuntaba maneras, jejeje. Era Nahuai, que venía como sucesor del legado de Cristina, que no era tarea fácil. Animalejo menor, durante este tiempo en los Pepe’s, ¡ya son tres años!, has sido como el hermanito pequeño del grupo, un gran trabajador, pero que sabe vivir la vida. Nunca olvidaré esos partidazos en el SAF, mis victorias ajustadas al ping pong y nuestros momentos de casi-gloria en los congresos, eh?, además de viajes por la península. A eso le sumamos las cenas, los momentos estelares en el día a día del labo, en los que siempre estabas al quite, jeje. Seguro que llegarás lejos y compartiremos muchas más cosas. Aupa Real!

La última en llegar fue Rut, para hacer unas prácticas un verano, y nuevamente hice de Cicerone. Después de darle la paliza de cómo debieran ser las buenas prácticas de laboratorio, y con un año para pensárselo, decidió hacer la tesis en nuestro grupo. Calladita y sin hacer ruido, bueno, excepto cuando le caen las cosas de la mano, jejeje, ha ido haciéndose con un hueco en el grupo de los Pepe’s. Espero no haver estat un coñazo de tío sempre damunt i superexigent. Recordaré les teves converses científiques sobre la química dels elements i moltes altres discussions més que interessants, jejeje, sempre responent quant burxava. Ens trobarem a faltar, segur.

A lo largo de todos estos años, el grupo fue recibiendo visitas. Personas que han influido de alguna manera en el transcurso de mi historia y a las que también quiero agradecer la huella que dejaron. Agradecer a Marco Cerbón, mi cuate, su entusiasmo por la ciencia y las ganas de ver siempre más allá. A él le debo mi tesis en el mundo de los estrógenos y por su puesto aprendí a ver bandas en un western transparente!! Ah! Y gracias por tan impresionante y succulenta comida con Mariachis en México DF! Cosas de la vida, también de México nos visitaron Andrea y Toño. Cada uno de ellos

## AGRADECIMIENTOS

con su peculiar manera de ver el mundo y por ende la ciencia. Gracias Andrea por la paciencia infinita, carácter mexicano y por esos tremendos guisos con que nos deleitaste. Fue un placer trabajar contigo en aquel gran verano, ¿verdad? Aun tenemos pendiente los frutos! Luego llegó Toño, que después fue Tonyo. Presagiaste por aquel entonces que si me dejaba perilla no marcharía jamás. Desde entonces no me veo sin ella, un símbolo de identidad. Gracias por tus sabios consejos que son difíciles de olvidar. También fue fugaz pero de esas visitas que quedan en la memoria la de Damià. Gràcies noi, per la gran felicitat que portaves dintre. Recordaré sempre les grans feinades que et vas fer amb en Xavito. Què n'era de dur, eh? Jejeje També un record especial per l'Encarna, la primera Tècnica de Cultius que va arribar. Treballar en aquella sala de cultius, petita, mancada de moltes coses que avui pensem impensables, era un plaer si tenies allà el seu somriure, destil·lava pau interior i grans riallades. Això sí, tot en gran harmonia, gracies al Feng Shui!

Y en este ir y venir de gentes que dejan su huella, hacer mención especial a Virgili. Gracias por los miles de cafés junto a un *paper* que desgranar, gracias por los miles de consejos, gracias por los ánimos en los momentos de oscuridad, el entusiasmo científico que contagias, espíritu crítico, el ritmo que imprimes a las cosas y sobre todo por haber tenido el placer de escuchar en directo tu melodiosa voz de tenor por los pasillos. Espero poder seguir agradeciéndote muchas de estas cosas de aquí en adelante.

Pero no todo fueron visitas de gente de fuera. También yo he recorrido unos cuantos kilómetros por la ciencia y me ha dado el gran placer de conocer a gente maravillosa. La primera aventura fue en Valencia, y qué aventura. Fueron seis meses inolvidables los que tengo que agradecer a Isabel Fariñas. En su laboratorio he disfrutado de hacer y vivir ciencia de alto nivel. Hablar con Isabel de ciencia es parar el reloj y no importarte nada más. Y eso se trasmite a sus becarias. Trabajar seis meses en un laboratorio pequeño y todas mujeres (excepto Miguel, claro) es una experiencia que hay que vivirla. Vamos, que me acostumbré a ser una más y aprendí a pesar un poco en mujer, tanto que me aficioné a la prensa rosa! ¡Gracias chicas! Gracias a Sacri, que de su visita a Barcelona solo recordaba que leía papers y tomaba algún café que otro, pero que cuando jugaba en casa era la maestra. Sabiduría infinita, gracias por preocuparte de mi y que no me faltara de nada. Gracias también a Marifé, Elena, Lucía, Celia, Sara, Nuria, Pili, Miguel, Lucky. Vaya nunca olvidaré los cultivos triples en la campana de la mini sala de cultivo, los “tomates” que tanto gustaban a Celia, la paella en casa de Nuria, el “afair” Sara (eh, ¿chicas?), e infinitas cosas más. Y en especial a



la hermana que gané allí, Teresa. Vivir contigo me ayudó, me enseñó y me dejará recuerdos imborrables. Conversaciones más que filosóficas hasta altas horas de la madrugada, cenas, fiestas, sesiones de cine en Kinépolis y un largo etcétera que agradecer. Besitos a Luna y Mico.

Y más viajes, el más impresionante que jamás pensé hacer, el transoceánico. Mi visita fugaz de diez días en México DF. fue una experiencia maravillosa donde conocí a la gente del laboratorio de Julio Morán. Agradecer a Julio que me dejara trastear por su laboratorio con sus chicas y Silvestre. Gracias por todos los días que pasé allí. Gracias por procurar que no faltara nada. Las impresionantes visitas turísticas, por las abundantes y variadas viandas mexicanas, desde entonces el picante europeo son cosquillas para mí. Este viaje lo tengo que repetir, sin duda. ¿Nos vemos en Cancún? Y a la gente de su laboratorio, por tratarme tan bien, desde Silvestre por su trabajo, Lupita por los cultivos, y todas las chicas del laboratorio que me lo hicieron pasar en grande en los canales de Chochimilco, que náhuatl significa "lugar donde crecen las flores".

Y entre idas y venidas, los incondicionales, la gente del departamento que siempre han estado ahí haciendo del día a día un viaje fascinante, que muchas veces no queremos que acabe. Miles de cafés, meriendas, cenas, fiestas y peligrosas fotos que corren por estos mundos de Dios que muestran el "lado oscuro" de las tesis...Los que llegaron antes que yo y que ya emprendieron otros caminos. Agradecer que mi incorporación fuese agradable, algunos quedan lejos ya pero siempre procuraron por los nuevos, tanto Marc, Álex Bota, Joan Marc, la Roser, Patricia, Esther Dalfó, Jordi Gómez, Anna Torrent, que gran CAP que hicimos juntos, eh, ¿un zumito en la Llimona? Raúl, Imane, Will, Mar, en mi retina quedarán los morritos de Raúl en las fiestas locas del departamento, los tacones de la Imane amenazantes por los pasillos, gracias por tus risas. Williamito, siempre especial liándola en todo momento. Maaaaawrrrr, que dulce melodía verdad? Gràcies Mar pel teu entusiasme en un món millor. Estic amb tú, segur que algún día...

Después los contemporáneos, los que libramos la batalla contra el Dios Cronos por poder acabar una Tesis, eso sí, con "fair play", Noe (alias Nico por algún tiempo), Alex (el Gella) , Sandra (la Campru) y Alberto (Totti), que aunque ha causado baja, continua entre nosotros. Hace ya mucho que empezamos esta aventura, y ánimos que ya queda poquito. Gracias Noe por el apoyo constante entre tus idas y venidas de psico cuando los tiempos no nos han sido propicios, ¿verdad? Alex, que gran tío. Gracias por compartir siempre una Guinness acompañado de tus sabias palabras, por dejarme

## AGRADECIMIENTOS

para el último en el Age y por esconderte siempre en el mismo sitio, eras un filón en el Quake, jejejeje. Sandra, que no agrair-te. Vam començar l'aventura de la tesi junts i també l'acabarem, segur! Gràcies per ser tot cor en els moments bons i dolents. Gràcies per tots aquests anys de mandat en la comissió de festes que han fet de l'altra tesi moments inoblidables, sopars, festes i sobre tot, tequiles!! Ànims que ja s'acaba. Totti, tío, llegaste más tarde, te has ido más pronto y casi-colocao en la industria farmacéutica. Lástima que te marchases, diste mucha vidilla a la vida del departamento, y ahora se te hecha de menos. Gracias por enseñarnos otras formas de ver la vida que quizás sin ti serían de otra manera. Y no te olvides de la Tesis, eh?

Por supuesto, atenciones especiales al Mundo Quake. Que sería de nuestras tesis sin los momentos estelares del "Vamoh a dal-le!". De las partidas a oscuras en los despachos, los gritos de hiena ultratumba de tres despachos más allá de un tal Dr. Enigma, del Graaaaannndeeeee!!!, del Puto Mouse!!!!, y un largo etcétera reflejado en los miles de correos donde se desataban nuestros efluvios literarios de la cultura Quake. Que sería de Superman sin Clark Kent, de Peter Parker sin Spiderman, de Bruce Wayne sin Batman. Por tanto que sería de la tesis de Alfredo sin Qalimero. Y del Mundo Quake sin su XavitoCabrón, Dr.Enigma, Mulà Omar, Poyita, Nico, Totti punti ... y posteriores incorporaciones como El Roig, ActionMamónMan, el Clustry, la Abuelita, el Silenciós, el Puto Biólogo, Dalai Lama, Tu Padre, el Hardy, etc., y un sinfín de incorporaciones esporádicas que me han hecho pasar los mejores ratos de la tesis, sobre todo en sus máximas expresiones en el Quake, los QuakeMasters. Gràcias a todos por permitirme ser el "Poulidor" del Quake para todos los siempres, en especial al Eterno QuakeMaster, XavitoCabrón de Borbón y al Eterno QuakeSparring, Dr. Enigma!!

Y como el tiempo fue pasando y no leía la tesis, pues claro, fue llegando gente nueva que se unió a otros que ya no lo eran, a la que agradecer nuevos cafés, nuevas tertulias, nuevos temas y nuevas cenas espectaculares. Me refiero a la Eli y al Moreno, en tierra de nadie. Eli, joer, mira que hi ha moments a la vida per marxar a Austràlia i perdre-ho tot de vista, menys el Cuerpo, però, un dia a la vida que em decideixo per defensar la meva tesi i no hi seràs! Estaràs a les antípodes, no podré oblidar-me de tu, co-presidenta de la comisió de festes en la unitat des del principi dels nostres temps. Entre Sandra i tu heu amenitzat a la perfecció grans excursions, dos Mas Renart, un amb disfresses incloses i sortides lúdiques a la Vila. Trobaré a faltar el teu entusiasme per la ciència. No ho perdis mai, perquèestic ben segur que arribaràs molt lluny. David Brown, atrás quedaron tiempos en los que al lema de Lleida t'escalfa nos lo

pasábamos en grande en los congresos, eh? Gracias por dejarme ganar algún set al ping pong de tanto en tanto, jejeje, sigue disfrutando con los Quakers de tan hermoso placer y revisa de tanto en tanto la bibliografía, en busca de algún nuevo paper rezagado... También agradecer al Silenciós su saber estar o más bien su saber no estar, jejeje. Ánimo que pronto llegará la tesina. Ha estat un autèntic plaer conèixer-te. A la demás gente del departamento que en algún momento u otro me lo han hecho pasar en grande, rodando películas, haciendo deportes varios y en las infinitas actividades a parte de las científicas, Vidi, David, Anna, Arantxa, Judith, Irene (¡suerte Bombón!), Albert, Tania, Miki, Natalia, Roger, Mateu, Gema, Lucía y José Manuel. Además de todos ellos, agradecer a Cristina, que aunque no hace una tesis, también le pasan los años, eh? (de buen rollito...), hemos vivido también grandes movidas en el departamento y hemos visto ir y venir de gentes. Gracias por aguantar muchas veces mis exigencias, por tu paciencia infinita, ganas de aprender siempre y por tener siempre preparada una cerecita para mí! Ánimos para el futuro en cultivos.

Y todo esto no sería posible sin la figura del funcionario, claro. Siempre imprescindible y al que siempre se les debe palabras de agradecimiento. Que sería de una tesis sin la amabilidad y eficiencia de Oscar, la simpatía y el trabajo bien hecho de Isabel, y de Carlos y de David (actualmente a la guixeta) durante aquellos meses, la inestimable ayuda técnica de Manel siempre que surgen problemas técnicos y todo ello amenizado por la gran labor en la sombra de Mel y la mejor de las sonrisas del departamento, Mónica. Para muchos recién llegada, para mí, la encantadora sonrisa que me dio mi primer protocolo aquí. Fue mi verdadera primera maestra en la poyata y mano a mano con ella hice mi primer western. Gràcies Mònica per la teva càlida benvinguda al departament que va fer que des del primer moment em sentís com a casa. Para envidia de muchos, aun conservo aquel pequeño frasco de colonia... Echaré de menos los buenos días en las visitas a secretaría. Gracias por haber aguantado lo coñazo que podemos llegar a ser los doctorandos.

Agradecer a los profes de la unidad, los verdaderos padres del departamento, Isaac, José, Pica, Mercedes, Pepi y otros seniors como Jordi, Carles, Cesca, nuevos como Carles, José Miguel y Elena que de una manera u otra me han enseñado y llevaré siempre conmigo. Sería genial que las nuevas incorporaciones en la unidad tengan tanta calidad y vivan la ciencia con tanto entusiasmo.

También agradecer a todos aquellos que velaban por nosotros por las noches en aquellos inacabables experimentos, conserjes la mayoría jubilados, otros ya no están

## AGRADECIMIENTOS

entre nosotros (que en paz descansen), otros que ascienden como mi amigo Toni, y otros nuevos que llegan y que hacen que las noches sean más agradables y seguras.

Y a los amigos de siempre, aquellos que sufren a diario e intentan entender que es eso de hacer una tesis, que te dan ánimos, te hacen reír y olvidar que se te mueren las células, que las cosas no salen, con quien celebrar las buenas y malas rachas, aquellos que aunque saben que no te gusta el teléfono y no llamas, te llaman, Jaime, Diana, Jairo, Laura, Cari, Toni, Marcos, Olga, Carlos, por estar siempre ahí, y cuando digo siempre es siempre. Carlos, Charlie, por saber escucharme como a un hermano. A los monitores de “El Forat”, Dani, Noe, David, Peque, Víctor, Xavi Fer, Maite, Javi, y un largo etcétera, por las miles de sonrisas compartidas en nuestra dedicación a los jóvenes, campamentos, excursiones, el día a día con “energúmenos” que te enseñan de la vida más que muchos doctores de muchas cosas. A ellos también agradecerles su granito de arena en esta tesis, también animadores de grupos Pep, Manel, Isa, Dani, Jeni, ... con sus respectivos “otros energúmenos”, que te quieren como si fueses un hermano mayor. También han participado activamente en entenderme a mí y a mi tesis, Montse, Felip, Marta, Pau, Meri, Dúnia, Toni, Núria A, Núria E, Juanjo, y mucha más gente del mogollón del MJS.

Y como dicen que lo bueno llega al final, pues llegó. Com agrair a la Montse, que recordo que me va dir que no muntés cap numerito en els agrairments, així que no ho faré. Només dir-te que no puc expressar en paraules tot el que t’he d’agrair en aquests moments tan xungos com és el final de una Tesi. El teu suport, ajudant-me quan defallia al final de tan llarga escriptura, quan m’ enfadava amb el món perquè em sentia incomprès, i un llarg etcètera que han estat rebuts amb un molt de tranquil·litat i ... alguna que altra mirada... de comprensió i d’amor. Per tot això i més, gracies Montse. T’ estimo un munt de mons de munts, i per sempre!

Y por último, la familia. Un pilar básico para que esta historia sea esta y no otra cualquiera. Mis abuelos y tíos que en la distancia siempre han confiado en mí y me han apoyado dando ánimos cuando más lo necesitaba. Gracias por sembrar en mí la sencillez de vuestros corazones. Espero que germine siempre. Mis padres: Alfredo y Pilar, a los que decirles la palabra doctor hace que se les caiga la lagrimilla (y después de ellos voy yo!), les debo Todo. Una palabra más bien simple que intenta resumir casi treinta años de mi existencia y que en breve pasarán por un momento clave de sus vidas. Todo aquel amor, dedicación, sacrificio, esfuerzo, educación, los buenos consejos, el apoyo diario, el lugar perfecto para llorar, para reír, e infinidad de todo darán uno de sus frutos en lo que me ha hecho feliz todos estos años y por lo que

hemos peleado tanto, la tesis y el ser doctor. No sabría cómo agradecer todo lo que me habéis dado y que sin duda me ha permitido ser quien soy y estar donde estoy. A mi hermana M<sup>a</sup> Carmen, siempre vigilante de mis progresos ha sabido trasmitirme lo fácil que es ser feliz y cómo mis éxitos también eran sus éxitos. Junto con Víctor, mi sparring en las presentaciones con el estradiol, siempre me han apoyado y me han hecho saber que siempre están ahí. Qué haría yo sin mi Garf! Ah! Y ya que nombro a toda la familia, un agradecimiento a Simba, mi gato, que a su manera también ha sabido aguantar lo suyo, jejeje.

He intentado resumir en pocas páginas unos Agradecimientos-Memoria difíciles teniendo en cuenta la relación temporal y lo mucho que da de sí una tesis. Espero no haber aburrido a muchos, hacer caer la lagrimilla a otros o creado indiferencia a otros tantos, total, es mi tesis, no?

Y haciendo honor a mi maestro y amigo Xavito, el que no esté, que piense por qué y que recurra, con un poco de suerte añadiré un anexo...

## I – INTRODUCCIÓN

*Quando sales para hacer el viaje hacia Itaca,  
reza que el camino sea largo,  
lleno de aventuras, lleno de conocimiento.  
[...]*

## I - INTRODUCCIÓN

### 1. EL CEREBRO EN DESARROLLO.

#### 1.1. El cerebro nos lleva de cabeza.

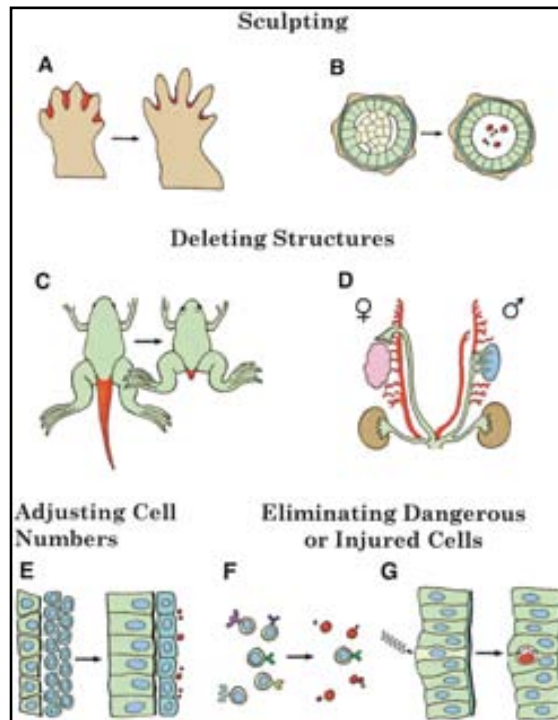
Lo desconocido del sistema nervioso, las consecuencias del futuro y el inexorable avance del desarrollo de enfermedades neurodegenerativas requieren de esfuerzos por ampliar el saber de uno de los grandes enigmas del S.XXI: **El Cerebro**.

Si miramos a nuestro alrededor y observamos cómo vive el ser humano, podemos hacernos una idea de cómo funcionan nuestras células y como se organizan nuestros órganos para formar lo que somos. Conocemos las estructuras de los seres vivos y su funcionamiento interno desde hace relativamente poco tiempo, y sin embargo los hombres llevamos imitando con nuestras acciones y comportamientos lo que ya desde el principio de nuestra existencia hacían todas y cada una de nuestras células. Nuestra historia no es más que un reflejo de lo que ha pasado, pasa y pasará a diario dentro de cada uno de nosotros. Y a lo largo de nuestra historia vemos que los seres vivos desde siempre han luchado por su supervivencia frente a situaciones adversas en lo que llamamos selección natural (Darwin C, 1859) y que ha dado lugar al presente, a quienes somos, como somos y donde estamos. Estamos en un viaje sin retorno, o no, hacia la muerte y el día a día es una batalla constante por la supervivencia, adoptamos estrategias para ganar o perder batallas individuales con el objetivo de ganar como organismo nuestro bien más preciado, la supervivencia, la vida. Eso es lo que hacen a diario cada una de nuestras células.

#### 1.2. Pero, ¿para crecer hay que morir?

La naturaleza a lo largo de la evolución ha elaborado estrategias que permiten la correcta regulación del desarrollo del individuo. Ya a mitad del siglo pasado se descubrió que la muerte celular podía ser una parte importante del desarrollo animal (Clarke and Clarke, 1996). Primero observada durante la metamorfosis de anfibios (Vogt C., 1842) y pronto descubierta en algunos tejidos en desarrollo tanto

en vertebrados como invertebrados (Glucksmann A., 1951; Clarke and Clarke, 1996). El término muerte celular programada fue inicialmente utilizado para describir la muerte celular que ocurre en lugares predecibles y a tiempos predecibles durante el desarrollo, para enfatizar que este tipo de muerte es algo así como programado en el interior del plan de desarrollo del propio organismo (Lockshin and Williams, 1964) (ver figura 1). Poco tiempo después al término muerte celular programada se le llamó también apoptosis.



**Figura 1. Algunas funciones de muerte celular programada en desarrollo animal.**

(A y B) Esculpiendo formas.

(C y D) Eliminando estructuras no deseadas.

(E) Controlando el número de células.

(F y G) Eliminando células no funcionales, dañinas, anormales o mal localizadas.

Esquema extraído de Jacobson et al., 1997.

Si nos centramos en el sistema clave para el funcionamiento del individuo, donde llega toda la información externa e interna y se integra para dar la respuesta adecuada (sistema nervioso), la muerte neuronal juega un papel clave en la regulación del número de neuronas ya a partir de los primeros pasos de su desarrollo y es fundamental para la supervivencia del organismo. A pesar de descubrir que, con la evolución, la naturaleza ha desarrollado procesos controlados de muerte, ella misma lucha por vivir para siempre evadiendo sus propios controles.



Ha resuelto en ciertos casos querer ser inmortal en lo que conocemos como cáncer. Todos estos procesos están inmersos en un equilibrio controlado por unos centinelas que vigilan lo que pasa dentro y fuera del ambiente de las neuronas para condiciones normales y anormales que influyen a la hora de decidir si esa célula vivirá o morirá.

Pero, ¿cómo mueren las neuronas? Ésta es una pregunta difícil y actualmente estamos empezando a entender los mecanismos básicos. Como todas las células, la supervivencia neuronal requiere un aporte trófico. Viktor Hamburger y Rita Levi-Montalcini describieron que la supervivencia de las neuronas en desarrollo está directamente relacionada con la disponibilidad de inervación con su objetivo. Esta fue la clave para el desarrollo de la hipótesis neurotrófica, la cual proponía que las neuronas inmaduras competían por los factores tróficos derivados de los tejidos diana que son aportados en cantidades limitadas; solo esas neuronas capaces de establecer contacto sináptico con esas dianas podrían obtener ese aporte de factor trófico que le permitiría su supervivencia. Esta hipótesis de la neurotrofina predice correctamente que la supervivencia neuronal requiere de señales positivas de supervivencia. Si éstas no se producen podría explicar esta hipótesis cómo las neuronas mueren en ausencia de aporte trófico.

La primera descripción de muerte apoptótica fue realizada el año 1949 por Hamburger y Rita Levi-Montalcini (Hamburger and Levi-Montalcini R, 1949). Estudios realizados en embriones de pollo mostraron una degeneración importante de un gran número de neuronas de determinados ganglios (sistema nervioso periférico). Al año siguiente Levi-Montalcini dio los primeros detalles de muerte neuronal en el sistema nervioso central (Levi-Montalcini R, 1950) en lo que posteriormente se llamarían motoneuronas, confirmando que esta muerte se producía de forma generalizada en todo el sistema nervioso (Oppenheim et al., 1991). El papel potencial de la apoptosis durante el desarrollo neural incluye la optimización de las conexiones sinápticas, eliminación de neuronas innecesarias y la formación de un modelo concreto de conexiones (Burek and Oppenheim, 1996). No fue hasta 1972, cuando Kerr y colaboradores quisieron unificar en un solo concepto en base a una serie de características y rasgos ultraestructurales lo que diferentes autores observaban como muerte programada en diferentes tejidos y tipos celulares bien diferenciadas de la necrosis. Lo que inicialmente llamó “contracción o encogimiento” de la necrosis adoptó el término de “apoptosis” (del griego = caída de las hojas), el cual indica la caída de las hojas de los árboles y

pétalos de las flores, para enfatizar el papel de este tipo de muerte celular en el recambio normal de los tejidos (Kerr et al., 1972).

### **1.3. Enfermedades neurodegenerativas: un siglo de progresos y misterios que aún permanecen.**

Si las neuronas mueren por apoptosis durante el desarrollo, ¿podría el mismo programa ser activado en enfermedades neurodegenerativas? La apoptosis fisiológica que ocurre en el desarrollo del cerebro y la apoptosis patológica en el cerebro adulto comparten mecanismos moleculares similares en las fases que llamaríamos efectoras. Pero, hay diferencias clave en los mecanismos por los que la apoptosis se pone en marcha. Mientras que la falta de factores tróficos es prominente en el papel de la apoptosis durante el desarrollo, hay pocas evidencias que impliquen a los factores tróficos como mecanismos principales en las enfermedades o alteraciones neurodegenerativas del individuo adulto. Podemos encontrar señales extracelulares que activan los receptores con dominios de muerte iniciando la cascada de señalización apoptótica y otros elementos, como las agresiones tóxicas que recibe el individuo a lo largo de la vida, dando como resultado desequilibrios bioquímicos o genéticos que dispararían las enfermedades neurodegenerativas compartiendo vías de señalización apoptóticas. Sin embargo, no podemos dejar de perder de vista que la apoptosis es un proceso clave para explicar enfermedades tan graves como la enfermedad de Alzheimer (LaFerla et al., 1995), Parkinson (Hartmann et al., 2000), Huntington (Lunkes and Mandel, 1997), esclerosis lateral amiotrófica (Rabizadeh et al., 1995) o isquemia cerebral (Choi, 1996). Es obvio que el conocimiento de estas enfermedades, cada día de mayor incidencia en nuestra sociedad, y los mecanismos que se desencadenan durante su proceso, como lo es la apoptosis, podrían dar lugar a nuevas estrategias tanto científicas como terapéuticas que pudiesen paliar y/o mejorar el nivel de vida de nuestras generaciones, así como la de generaciones futuras, frente a estas enfermedades.

### **1.4. Diferentes tipos de muerte neuronal: apoptosis, necrosis y autofagia.**

El estudio de la diversidad morfológica en la muerte celular en desarrollo ha sido revisado en detalle por Clarke y colaboradores (Clarke, 1990). En un estudio ultraestructural de tejido embrionario se propuso que habían hasta tres tipos de muerte diferentes en base al papel que juegan los lisosomas en la alteración celular (Schweichel and Merker, 1973). La apoptosis ocurre sin activación

detectable de los lisosomas endógenos, pero las células son fagocitadas por macrófagos donde sí se produce activación de los lisosomas en este tipo de células. Un segundo tipo de muerte estaría relacionada con la activación de los propios enzimas lisosomales en lo que se suele llamar muerte por autofagia y en un tercer tipo de muerte, los lisosomas no tendrían ningún tipo de actuación. Las características morfológicas de la muerte descrita por Schweichel en el primer tipo coinciden plenamente con la definición actual de apoptosis mientras que el tercer tipo comparte bastantes características con la muerte necrótica (Clarke, 1990).

La apoptosis a diferencia de la necrosis, se caracteriza por la participación activa de la propia célula que está muriendo, guiada por un programa muy concreto que se ejecuta en una serie de fases donde hay una clara implicación genética que está perfectamente definida (Umansky, 1982). Incluso en determinados tipos celulares se produce síntesis de novo de los efectores de la propia muerte. Durante la apoptosis se activan una serie de procesos tanto celulares como moleculares que serán responsables del desencadenamiento de toda una serie de características fenotípicas. Algunas de ellas se consideran características exclusivas de la apoptosis y se utilizan para su identificación. Las más relevantes son la condensación de cromatina, la fragmentación del núcleo celular, la pérdida de volumen celular, el mantenimiento de la integridad de las membranas hasta fases tardías y, finalmente, la formación de los cuerpos apoptóticos que serán fagocitados por los macrófagos circundantes, evitando así el daño a las células vecinas (Fraser et al., 1996) (ver tabla 1).

La necrosis en cambio, es un tipo de muerte celular que aparece como resultado de una disfunción celular aguda en respuesta a condiciones de estrés severas o después de la exposición a agentes tóxicos y es un proceso relativamente pasivo asociado a una rápida depleción celular de ATP. Morfológicamente, la necrosis está caracterizada por un dramático incremento del volumen celular y la ruptura de la membrana plasmática, con la liberación del contenido celular al medio intercelular. Esta liberación del contenido de las células que están muriendo al espacio extracelular pueden causar importantes daños en el tejido afectando a las células vecinas o atrayendo células proinflamatorias al lugar de la lesión (Clarke, 1990). En este daño celular irreversible se suceden una serie de cambios morfológicos característicos de este tipo de muerte (ver tabla 1) consistentes algunos de ellos en la agrupación de la cromatina sin cambios marcados en su distribución. A veces densidades anormales en la matriz debido al hinchamiento

de las mitocondrias, y disrupciones locales de la membrana plasmática bastante evidentes. En estadios posteriores, se desintegran los orgánulos y membranas. La cromatina desaparece al final del proceso dejando sólo residuos celulares a modo de “células fantasma”.

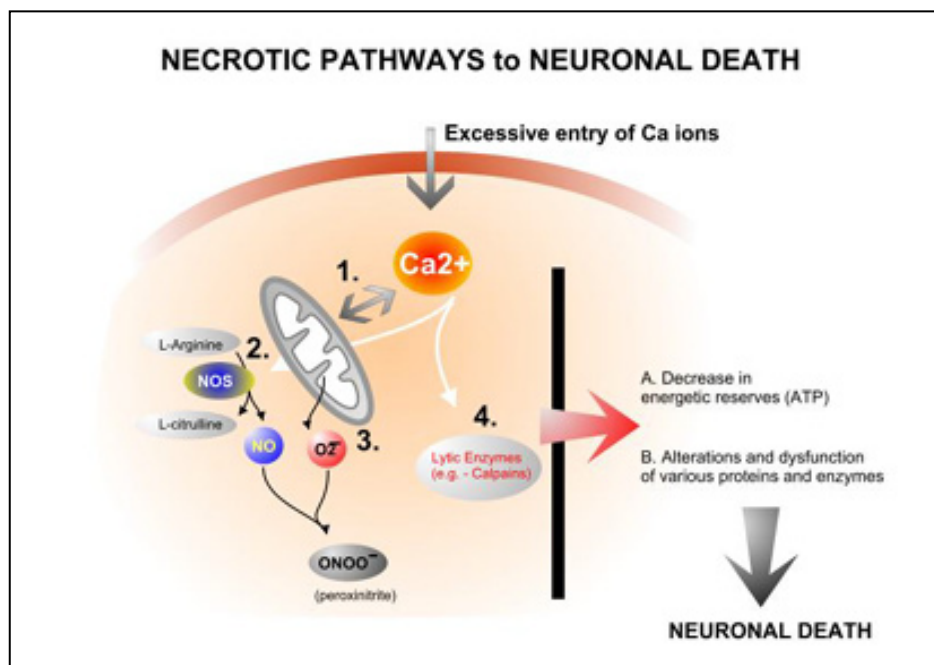
**TABLA 1.** Rasgos comparativos de la apoptosis *versus* necrosis

<b>NECROSIS</b>	<b>APOPTOSIS</b>
Pérdida de la homeostasis celular	Sin cambios importantes al inicio
Permeabilidad de la membrana alterada	No vistos, al menos inicialmente
Perdida de potasio; entrada de sodio; caída del potencial de membrana	No entrada de sodio, sin cambios en la concentración de potasio de la célula
Hinchamiento de todos los compartimentos citoplasmáticos	Condensación del citoplasma
Destrucción de la mitocondria y otros orgánulos	Generalmente los orgánulos permanecen intactos Protuberancias desde la superficie celular separadas de los cuerpos apoptóticos
Depleción de la energía celular (ATP)	No depleción de energía celular
Síntesis baja de macromoléculas	Es necesaria la activación de la síntesis de macromoléculas
Afecta a las células contiguas	Afecta a la dispersión individual de la célula
Pérdida de agregados de cromatina	Altamente conservados agregados granulares de cromatina
<b>ATROFIA PASIVA</b>	<b>DEGENERACIÓN ACTIVA</b>

#### **1.4.1. La muerte necrótica.**

El principal estímulo que puede generar una muerte necrótica en el sistema nervioso central es el que se produce en fenómenos de isquemia y excitotoxicidad. La excitotoxicidad es una condición patológica que ocurre en una variedad de alteraciones neurológicas tales como la hipoxia, hipoglucemia o agresiones celulares y que describe una sobreestimulación de subtipos concretos de receptores de glutamato como los NMDA. Estos son receptores ionotrópicos que actúan como canales de  $Ca^{2+}$  ligando-dependientes y que de su activación prolongada resulta un incremento en la  $[Ca^{2+}]$  intracelular, la generación de especies reactivas de oxígeno y la muerte celular (Choi, 1995). Recientemente se han encontrado evidencias que en estos procesos de excitotoxicidad e isquemia podrían participar proteínas (Bax y Bcl-2, entre otras;(Martinou et al., 1994; Miller et

al., 1997) que anteriormente se pensaba que solo actuaban en procesos de muerte programada. Estas evidencias sugieren que reguladores clave de la muerte apoptótica también podrían estar implicados en la muerte neuronal asociada a excitotoxicidad-isquemia. Algunos mecanismos de esta muerte necrótica son similares a esos otros que forman parte de la muerte neuronal programada, indicándonos que, aquello que hace años nos hacía pensar en procesos de muerte totalmente diferentes a nivel conceptual y bioquímico, podrían estar más o menos relacionados. Es el caso complejo de la excitotoxicidad que dependiendo de la contribución de los receptores de las diferentes subpoblaciones podría ser relevante en la decisión del modo de muerte donde una masiva estimulación de los receptores de glutamato por glutamato exógeno puede rápidamente desencadenar necrosis (ver figura 2).



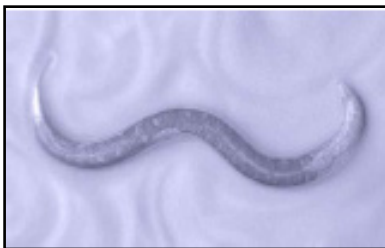
**Figura 2. Vías necróticas de muerte neuronal.** Uno de los pasos importantes en el inicio de la necrosis es un excesivo incremento en el Ca<sup>2+</sup> citosólico (en excitotoxicidad, seguida de una sobre estimulación con glutamato). El incremento en [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> activa, dependiendo del tipo de neurona y estado metabólico una serie de procesos. Esquema extraído de <http://medweb.bham.ac.uk/research/toescu/Teaching/NDegen/Necrosis1.html>.

En este tipo de muerte juegan un papel importante una familia de cisteína proteasas llamadas calpaínas. Son proteasas dependientes de Ca<sup>2+</sup> que en procesos de muerte debido a daños severos donde las vías dependientes de las caspasas han sido inhibidas pueden ejecutar todavía la muerte celular (Leist et al., 1997). Proteolizan una amplia variedad de sustratos implicados en procesos de

muerte neuronal como factores de transcripción, oncogenes, segundos mensajeros, gran variedad de enzimas y proteínas de membrana y del citoesqueleto que podrían alterar el funcionamiento integral de la célula desencadenando la lisis de esta completando el “programa” necrótico. También en este tipo de muerte tienen especial relevancia las especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen Species; ROS). Estas ROS se generan habitualmente durante la respiración celular en la mitocondria. Pero cuando se producen situaciones anormales en el funcionamiento de ésta debido principalmente, en procesos necróticos, a una situación de estrés metabólico se produce un gran incremento en su concentración. Al verse incrementada la concentración de éstas haciendo imposible la detoxificación por las sustancias antioxidantes presentes en las células y los mecanismos de la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa, se produce una serie de eventos en cascada como la formación de radicales derivados del óxido nítrico (NO), peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) y la oxidación de lípidos de membrana produciendo daños importantes en su estructura y oxidación de proteínas, que como resultado final junto al resto de fenómenos anteriormente descritos, dan lugar a la lisis de la célula y liberación del contenido al espacio extracelular.

### 1.4.2. La apoptosis: aprendiendo de los gusanos.

Ya por los años setenta, Sydney Brenner intuyó que el nemátodo *C. elegans* podría ser un organismo modelo, ideal para definir genes específicos responsables de la muerte en el desarrollo (Brenner, 1974). John Sulston mapeó los linajes celulares en *C. elegans*, apuntando que eran invariables y que células específicas siempre morían (Sulston, 1976). H. Robert Horvitz tuvo la perspicacia de mutagenizar *C. elegans* para identificar los genes que regulan todas las muertes celulares que se producían (Ellis and Horvitz, 1986). Por estas contribuciones pioneras en el campo de la genética del desarrollo y la muerte celular programada recibieron el premio Nóbel en el 2002.



**Figura 3. Fotografía del nematodo *C. elegans*.** Este nematodo fue el responsable del gran avance científico de los años setenta al ser un buen modelo para el estudio de la muerte durante el desarrollo.

Cuatro genes llamados *ced-3*, *ced-4*, *ced-9* y *egl-1* forman la maquinaria de muerte responsable de la ejecución en las células del programa de muerte (Hengartner,

1996). *ced-3* codifica una proteína relacionada con el enzima conversor de la interleucina 1 $\beta$  (Interleukin 1 $\beta$  Converting Enzyme; ICE) de mamífero implicada en inflamación (Yuan et al., 1993). La expresión de éstas induce muerte celular. Parecía pues que estas proteínas podrían ser las efectoras de esta muerte apoptótica. Posteriormente se ha observado que los homólogos en mamífero de CED-3 han crecido y siguen creciendo como una familia de proteasas, conocidas como caspasas (Alnemri et al., 1996). *ced-4* en estudios genéticos se encontró corriente arriba de *ced-3*/caspasa y formaría parte de un cuerpo intermedio en la vía apoptótica que implicarían una serie de factores activadores de esta vía, activadores llamados como Apafs (apoptotic protease activating factors) (Yuan and Horvitz, 1992). *ced-9* es el homólogo en este gusano del oncogen de mamífero *BCL-2*, el cual está implicado en la prevención de la muerte apoptótica. Esta familia de proteínas constituye un punto de control crítico en la vía apoptótica. Además *BCL-2* de mamífero fue capaz de funcionar en *C. elegans* (Vaux et al., 1992; Hengartner and Horvitz, 1994) sugiriendo la gran conservación a lo largo de la evolución de esta vía de muerte celular.

#### 1.4.2.1. Las caspasas: el principio del fin.

El nombre caspasa es una contracción de cisteína-dependiente aspartato-específica proteasa (Alnemri et al., 1996). Son unas proteasas altamente conservadas a lo largo de la evolución (desde el nemátodo, pasando por insectos hasta humanos). Estas proteínas contienen tres dominios funcionales: un predominio N-terminal, una subunidad mayor que contiene el centro activo formado por una cisteína dentro de un motivo altamente conservado, QACXG, y una subunidad pequeña en el C-terminal (Stennicke and Salvesen, 1998). Hasta el presente se han identificado 14 caspasas diferentes en mamíferos (Van de et al., 1998), formadas por dos subfamilias biológicas distintas: una de ellas participa en el procesamiento de citoquinas proinflamatorias, y la otra es necesaria para iniciar y ejecutar la respuesta apoptótica durante la muerte celular programada (ver figura 4).

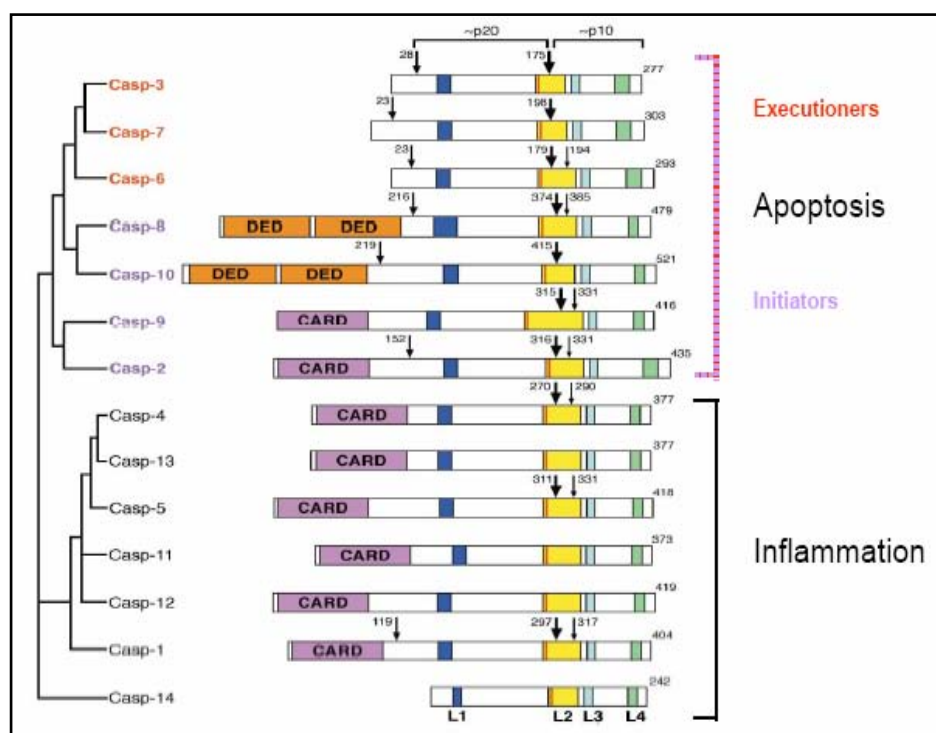
Para permitir el latente programa apoptótico en respuesta a las diferentes señales de muerte, las caspasas se sintetizan en forma de zimógenos (procaspasas) estado en el cual se mantienen inactivas. Estos zimógenos están compuestos de tres dominios: un predominio N-terminal, y los dominios p20 y p10 (ver figura 5) que formarán el enzima maduro. En la mayoría de los

## INTRODUCCIÓN

casos examinados, el enzima maduro está formado por un heterotetrámero que contiene dos p20/p10 heterodímeros y dos centros activos (Earnshaw et al., 1999, Hengartner, 2000).

Existen tres mecanismos de activación de las caspasas: la activación por otra caspasa, la activación inducida por proximidad y la activación dependiente de la asociación con una subunidad reguladora.

La activación de caspasas por otras caspasas en la cascada de activación se realiza mediante la proteólisis del zimógeno entre los dominios p20 y p10 y

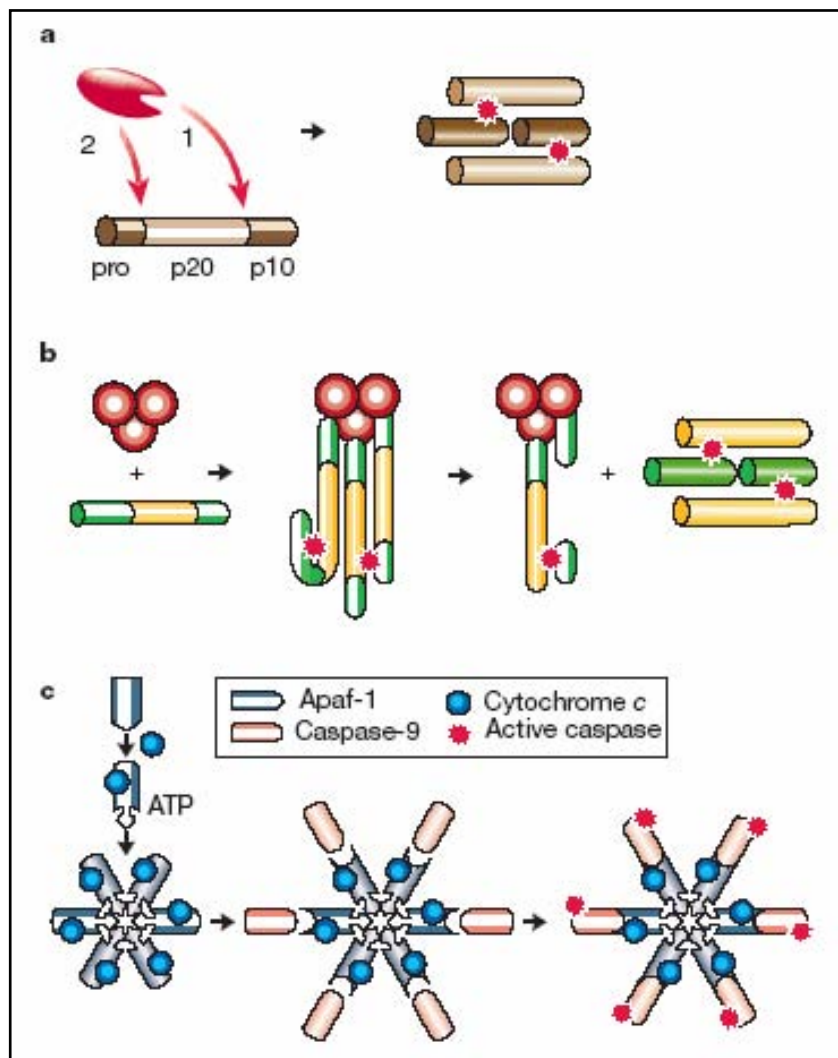


**Figura 4. La familia de las caspasas.** Representación del árbol filogenético de las caspasas de mamífero con la división de las dos subfamilias biológicas. Dentro de la subfamilia de la respuesta apoptótica se clasifican en caspasas iniciadoras y ejecutoras.

también habitualmente entre el prodominio y el dominio p20 (ver figura 5a). Esta estrategia de activación se usa ampliamente por las células para la activación de las tres procaspasas de prodominio corto, caspasa-3, -6 y -7. Estas tres caspasas son consideradas el caballo de batalla de la familia de las caspasas y son normalmente más abundantes y activas que sus primas de prodominio largo. La activación de caspasas inducida por proximidad, propone que bajo condiciones de elevado número de moléculas de procaspasa



reclutadas debido a un estímulo concreto y en gran concentración local de zimógeno, la actividad proteasa intrínseca de la proteína es suficiente para permitir que varias moléculas de proenzima se proteoliten mutuamente activándose unas a otras (ver figura 5b). Este mecanismo es el que se propone para la activación de la caspasa-8 (Muzio et al., 1998), -2 y la caspasa de nematodo CED-3 (Yang et al., 1998). La activación dependiente de asociación con una subunidad reguladora es el sistema de activación más complejo y es el usado por la caspasa-9. A diferencia de las anteriores caspasas, el procesamiento de la procaspasa-9 tiene una menor incidencia en la actividad catalítica del enzima. La clave está en el requerimiento de la asociación con un cofactor proteico, Apaf-1. Una de las dos proteínas que forma el complejo



**Figura 5. Diferentes mecanismos de activación de caspasas.** Los mecanismos de activación de las caspasas incluyen acciones proteolíticas por caspasas situadas por encima de la cascada de activación (a), la activación inducida por proximidad (b) y la formación de un holoenzima(c). Esquema extraído de Hengartner, 2000.

proteico necesario para su activación juntamente con otra proteína, citocromo c (Li et al., 1997) y que con la procaspasa-9 forman un holoenzima llamado apoptosoma que permite la activación de la caspasa (ver figura 5c). Este holoenzima es un gran complejo proteico que puede contener más proteínas adicionales (Cain et al., 1999).

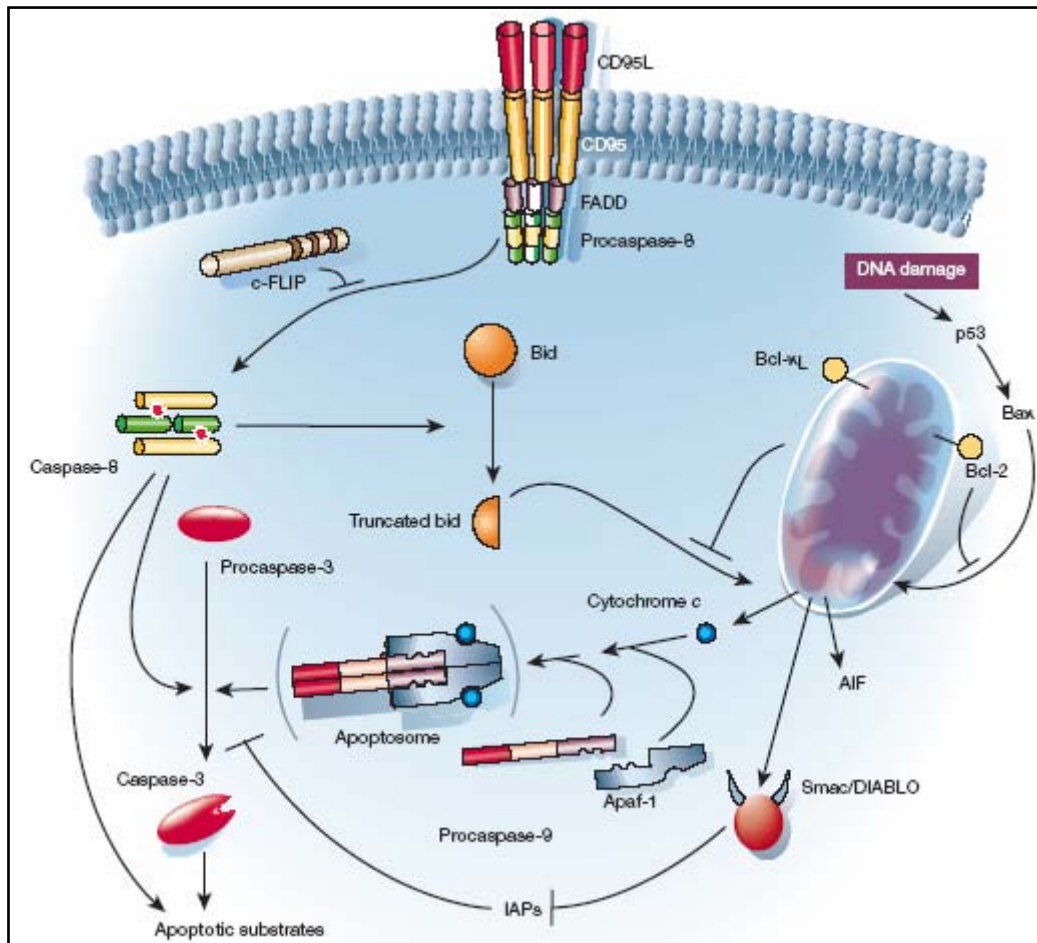
A nivel funcional, en la apoptosis, las caspasas las podemos clasificar en dos grupos: las iniciadoras, que serían aquellas que iniciarían la cascada de activación de las caspasas y que tienen como función activar a otras caspasas como por ejemplo la caspasa-8, -9, -10 y -2 en mamíferos y las caspasas ejecutoras, aquellas que son activadas por las iniciadoras, que actúan directa y selectivamente sobre una serie de sustratos apoptóticos concretos, activando o inactivándolos y que dará como resultado el desarrollo de las características morfológicas comentadas anteriormente. Estas son la caspasa-3, -7 y -6 en mamíferos. En resumen, las caspasas efectoras son normalmente activadas proteolíticamente por caspasas situadas corriente arriba en la cascada de activación, mientras que las iniciadoras son activadas a través de interacciones proteína-proteína reguladoras.

No todas las caspasas identificadas pueden tener un papel relevante en la muerte apoptótica y los mecanismos moleculares que implican la activación de caspasas todavía permanecen poco claros. Aunque también a muchas de las caspasas que se conocían se les empiezan a descubrir nuevas funciones implicadas en el suicidio celular, como es el caso de la caspasa-12. Inicialmente descrita en su implicación en procesos inflamatorios, actualmente se le atribuye un papel importante en la activación de procesos apoptóticos en nuevos mecanismos moleculares descritos que inducen muerte celular programada por estrés reticular (Gu and Spitzer, 1995; Nakagawa et al., 2000), que puede ser causado por una acumulación de proteínas mal plegadas o una desregulación de la homeostasi del calcio (Ferri and Kroemer, 2001).

### **1.4.2.2. Dos caminos, un destino: las dos principales vías apoptóticas en células de mamífero.**

La regulación de esas interacciones proteína-proteína es uno de los temas más importantes en el estudio de la apoptosis y sus vías de actuación. Los mecanismos exactos que ocurren desde que se recibe un estímulo hasta que se desencadenan los diferentes eventos en el núcleo celular todavía siguen

siendo un misterio. Estas diferentes vías de activación de la apoptosis por caspasas no pueden dibujarse independientemente ya que las diferentes piezas que se conocen y que forman diversas vías se interconectan y una vía puede ser regulada por proteínas de otra vía con las que interaccionan. Las dos principales vías apoptóticas de células de mamífero son la vía extrínseca y la vía intrínseca.



**Figura 6. Los caminos del infierno: las dos principales vías apoptóticas en células de mamífero.** La vía extrínseca o del receptor de muerte (a la izquierda de la figura) se dispara a través de los receptores de la superfamilia de los receptores de muerte iniciando la cascada activando la caspasa-8. La vía mitocondrial (a la derecha de la figura) se activa en respuesta a múltiples estímulos, desde lesiones en el DNA hasta la activación cruzada vía caspasa-8 y BID, promoviendo la activación de la caspasa-9. Ambas vías confluyen en la activación de la caspasa-3 ejecutora que actuaría sobre los diferentes sustratos apoptóticos. Esquema extraído de Hengartner, 2000.

La vía extrínseca se inicia con la activación de un tipo de receptores de membrana llamados receptores de muerte. Hay diferentes tipos de receptores de muerte en diferentes tejidos, pero se ha demostrado que dos miembros de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR; *tumor*

*necrosis factor receptor*) están implicados en la muerte neuronal (Nagata, 1997; Raoul et al., 2000): Fas (CD95/Apo-1) y el receptor de neurotrofinas p75 (p75<sup>NTR</sup>). La unión del ligando con el receptor provoca la agrupación de receptores de muerte formando un complejo que inicia la señalización de inducción de muerte (ver figura 6). Este complejo recluta, mediante la molécula adaptadora FADD (*Fas-associated death domain protein*), múltiples moléculas de procaspasa-8, dando lugar a su activación en caspasa-8 debido a la activación por proximidad (Miller et al., 1997) (ver figura 5a y 6). Una vez activada la caspasa-8 se pueden suceder diversas acciones. Como caspasa iniciadora puede actuar sobre otras caspasas como la caspasa-3, -6 y -7 proteolizándolas y activándolas (Srinivasula et al., 1996). Algunos autores sugieren que como caspasa iniciadora también podría translocar al núcleo celular y proteolizar diversos sustratos apoptóticos como la poli (ADP-ribosa) polimerasa (*poly(ADP-ribose)polymerase*, PARP) (Benchoua et al., 2002) juntamente con alguna otra caspasa ejecutora, como la caspasa-3. Otra de las acciones de la caspasa-8 en esta vía extrínseca sería la de activar indirectamente la otra gran vía apoptótica, la vía intrínseca. Esta vía es la señal apoptótica que va mediada a través de la mitocondria. Esta interacción e integración entre la vía del receptor de muerte y la vía mitocondrial se realiza gracias a la acción de la caspasa-8 sobre la proteína Bid, una proteína proapoptótica de la familia de Bcl-2 (una familia de proteínas clave que veremos en detalle más adelante, ver apartado 1.4.2.3). La caspasa-8 proteoliza Bid, esta proteína Bid truncada se transloca a la mitocondria, donde promueve la liberación del citocromo c dando lugar a la activación de la vía intrínseca (Sun et al., 1999).

Mientras que en el inicio de la muerte apoptótica vía receptor de muerte intervienen relativamente un pequeño número de ligandos estructuralmente relacionados, la vía mitocondrial o intrínseca puede ser disparada en neuronas por una gran variedad de agentes no relacionados estructuralmente (Sastry and Rao, 2000). Esto implica que la apoptosis mitocondrial puede ser inducida por algo más que un simple mecanismo. Una de las claves para la vía intrínseca es la liberación del citocromo c de la mitocondria al citosol (ver figura 6). Esta liberación está causada por una ruptura de la membrana mitocondrial externa y/o por la permeabilidad mitocondrial transitoria (MPT; *mitochondrial permeability transition*), y que está controlada por un poro sensible a voltaje y a calcio, comúnmente llamado poro de permeabilidad transitoria (PT;

*permeability transition*) (Blatt and Glick, 2001). Una vez liberado el citocromo c al citosol se puede formar el holoenzima apoptosoma asociándose a la proteína adaptadora Apaf-1 que reclutaría a la procaspasa-9 a través de su dominio de reclutamiento de caspasas (*caspase recruitment domain*; CARD) activándola, en un proceso dependiente de energía en forma de ATP (ver figura 5c y 6). Como comentamos anteriormente este complejo activaría la caspasa-9 cuya acción principal sería la activación de caspasas ejecutoras como la caspasa-3 o la -7.

La vía apoptótica dependiente de receptores de muerte y la mitocondrial convergen a nivel de la activación de la caspasa-3. Por debajo de esta caspasa ejecutora el programa de muerte apoptótica se ramifica en subprogramas de múltiples pasos la suma de los cuales da como resultado el desmantelamiento ordenado de la célula y la posterior eliminación. Estos fenómenos dan lugar a la aparición de las características fenotípicas de la apoptosis comentadas anteriormente (ver tabla 1). La caspasa-3 puede actuar sobre factores nucleares proapoptóticos activando directamente el factor de fragmentación del DNA (DFF; *DNA fragmentation factor*) (Liu et al., 1997), PARP (Nicholson et al., 1995; Tewari et al., 1995), o el complejo CAD (*caspase-activated Dnase*)-iCAD (*inhibitor of CAD*) (Enari et al., 1998). Estos sustratos actúan sobre el DNA degradándolo, en fragmentos que generan un patrón característico de secuencias repetidas de unos 200pb, punto de corte en el DNA a nivel del nucleosoma, también llamado *DNA laddering* (Compton, 1992). Pero no todos los sustratos de las caspasas son nucleares. Aunque los mecanismos no se conocen con exactitud, la externalización de la fosfatidilserina (PS) en los estadios iniciales de la apoptosis (Fadok et al., 1992) depende de la acción de diferentes caspasas (Martin et al., 1996) y es un parámetro ampliamente utilizado para determinar si se desencadena la muerte apoptótica y en qué grado se produce. Existen cientos de sustratos posibles para las caspasas, evidenciando la gran complejidad y magnitud del proceso apoptótico.

Y a pesar de esta gran complejidad en la actuación de las caspasas existe la posibilidad de parar sus acciones. Existen proteínas que son capaces de inhibir a estas caspasas impidiendo que desarrollen su capacidad de “matar” a la célula. Son las proteínas inhibidoras de la apoptosis, las IAPs (*inhibitors of apoptosis proteins*). En células de mamífero se han descrito hasta cinco tipos: NIAP, cIAP1, cIAP2, XIAP y survivin (Liston et al., 1996; Uren et al., 1996),

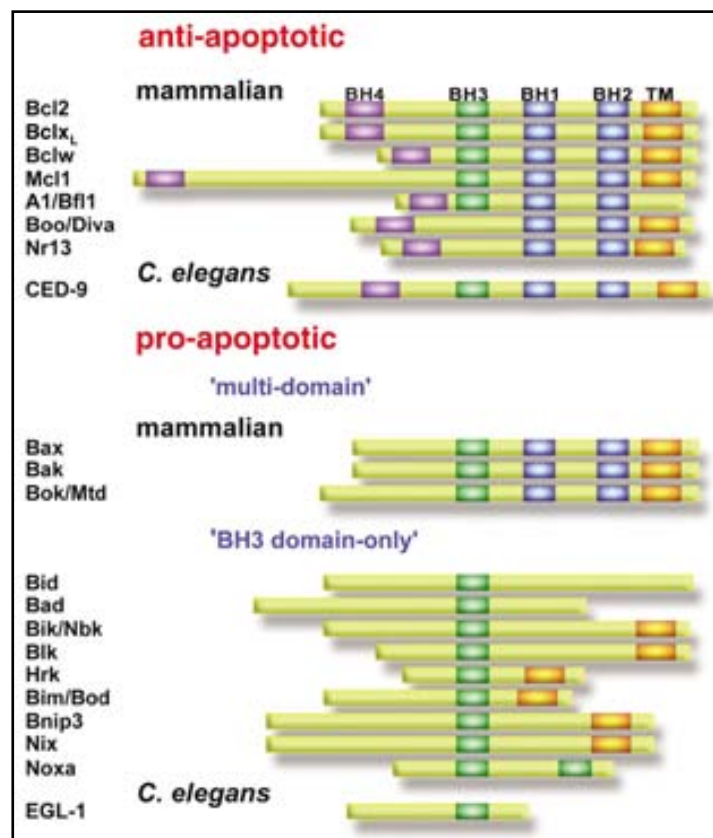
(Ambrosini et al., 1997; Duckett et al., 1998). Son proteínas capaces de inhibir la apoptosis inducida tanto por receptores de muerte como la inducida por miembros proapoptóticos de la familia de Bcl-2 o citocromo c (Deveraux et al., 1998; Deveraux and Reed, 1999) y que den lugar a la activación de las caspasas. La unión de las IAPs a dominios estructurales específicos, impiden que las caspasas puedan continuar con el programa de muerte celular (Roy et al., 1997).

### **1.4.2.3. ¿Pero como se libera el citocromo C?: la familia Bcl-2 y otros factores implicados.**

La mitocondria no solo es el orgánulo celular encargado de la producción de energía mediante la respiración oxidativa. Es también un polvorín celular ya que en su interior secuestra a un peligroso cóctel de proteínas proapoptóticas, de entre las cuales destaca el citocromo c. En principio un simple transportador de electrones, pero con la capacidad de convertirse en el ejecutor de los planes de muerte de la célula. Él, junto con la proteína adaptadora Apaf-1 activan a la caspasa-9 en el citosol como vimos anteriormente (Li et al., 1997). Pero, ¿cómo lo hace el citocromo c para salir de la mitocondria? Exactamente no se sabe con claridad cual es el mecanismo que utiliza para atravesar la membrana mitocondrial, pero está claro que están implicadas una serie de proteínas, la familia Bcl-2, en la regulación de este proceso. El citocromo c se encuentra localizado en las paredes de las involuciones de la membrana mitocondrial interna, en el espacio intermembranal. Es allí donde realiza su función de transportador de electrones para la producción de energía.

La familia Bcl-2 recibe este nombre debido al primer miembro de ésta que se aisló y se describió como gen implicado en el linfoma de células B (de ahí el nombre bcl (Tsujimoto et al., 1985)). Está formada por una veintena de proteínas clasificadas en tres grupos dependiendo de la estructura y función de cada uno de ellas (Adams and Cory, 1998; Gross et al., 1999) (ver figura 7). Un primer grupo (grupo I) estaría formado por proteínas como Bcl-2 y Bcl-X<sub>L</sub>, caracterizadas por la presencia de cuatro dominios cortos conservados de homología a Bcl-2 (Bcl-2 Homology; BH), BH1-BH-4. En el extremo C-terminal poseen una cola hidrofóbica (*Transmembrane Domain*; TM) que localiza a estas proteínas en la superficie de la cara externa de la mitocondria (y ocasionalmente en el retículo) con el grueso de la proteína

de cara al citosol. La característica clave de los miembros del grupo es que todos ellos poseen actividad anti-apoptótica y protegen a las células de la muerte apoptótica. En cambio, el segundo grupo (grupo II) está formado por miembros de la familia Bcl-2 con actividad pro-apoptótica. Son miembros de este grupo de proteínas, Bax y Bak, y tienen una estructura general similar a las proteínas del grupo I, con el dominio transmembrana y demás dominios menos el N-terminal BH4. El tercer grupo (grupo III) consiste en una serie de proteínas cuya característica común es la presencia del dominio de 12 a 16 aminoácidos BH3 (Adams and Cory, 1998). Forman parte de este grupo proteínas como Bad o Bid, que por la ausencia del dominio hidrofóbico hace que su localización sea citoplasmática.



**Figura 7. Características estructurales y funcionales de la familia Bcl-2.** Se clasifican sus miembros según su actividad anti-apoptótica o pro-apoptótica en el proceso de muerte programada. Se representa la disposición de los dominios BH (*Bcl-2 Homology*) y la región transmembrana (TM). Se muestran los miembros de la familia de mamífero en comparación con los de *C. elegans*, donde se muestran la presencia de los dominios conservados. En general, los miembros de la familia anti-apoptótica Bcl-2 presentan conservación de secuencia en los cuatro dominios BH. Los pro-apoptóticos se pueden clasificar en subgrupos en función de la conservación de secuencia: la más altamente conservada, miembros 'multi-dominio' y un subgrupo divergente de solo dominio BH3. Esquema extraído de (Ranger et al., 2001)

Cómo estos miembros de la familia Bcl-2 regulan la salida del citocromo c sigue siendo objeto de estudio y se han planteado diversas hipótesis, ninguna de ellas definitiva (Hengartner, 2000). Una de ellas sugiere que los miembros de la familia Bcl-2 formarían un canal que facilitaría el transporte del citocromo c. Aun así no se sabe si esos poros podrían ser suficientes para liberar proteínas a través. Otra hipótesis sugiere la interacción de miembros de la familia Bcl-2, pro-apoptóticos, con otras proteínas mitocondriales. Una tercera hipótesis sugiere que miembros de esta familia inducirían la ruptura de la membrana mitocondrial externa. Estas proteínas inducirían cambios en la fisiología de la mitocondria (por ejemplo en el intercambio de iones, fosforilación oxidativa, ...) que provocarían la ruptura física y liberación de las proteínas intramembranales al citosol. En este proceso intervienen las proteínas pro-apoptóticas Bax y Bak formando homodímeros. Estos homodímeros estarían implicados en la formación del poro mitocondrial (Mikhailov et al., 2003). Estudios sobre sus componentes incluyen proteínas de la membrana mitocondrial interna como el translocador de nucleótidos de adenina (*adenine nucleotide translocator*; ANT) (Marzo et al., 1998) y proteínas de la membrana mitocondrial externa como componentes de canales de voltaje dependiente de aniones (*voltage-dependent anion channel*; VDAC) (Shimizu et al., 1999).

La función de los miembros antiapoptóticos, como Bcl-2 y Bcl-X<sub>L</sub>, es formar heterodímeros entre ellos, y con Bax o Bak. La unión entre estas proteínas se realiza a través del dominio BH3 (Cheng et al., 2001). De esta manera, Bcl-2 bloquearía la oligomerización de Bax o Bak en la membrana mitocondrial externa (Conus et al., 2000; Mikhailov et al., 2001).

Trabajos recientes muestran la implicación de las proteínas del grupo III de la familia Bcl-2, a través de su dominio BH3, como Bim, Bid, Bad o Hrk en la función de Bax o Bak. Bim o Hrk tendrían diferentes formas de participar en estos procesos, se unirían por el dominio BH3 a Bax provocando cambios conformacionales que favorecería la unión a la membrana mitocondrial y la formación del poro, se pueden unir a Bcl-2 o Bcl-X<sub>L</sub> impidiendo su acción antiapoptótica o incluso podrían participar activamente de la formación del poro y la liberación del citocromo c (Harris and Johnson, Jr., 2001). Otro de los miembros del grupo III que actuaría



como Bim es Bad, que también se uniría a Bcl-2 o Bcl-X<sub>L</sub> impidiendo su acción antiapoptótica (Gross et al., 1999).

Pero no solo se libera el citocromo c de la mitocondria una vez formados estos poros de transición tras estímulos apoptóticos. Muchos otros factores están implicados en este proceso. Datos recientes parecen implicar a la liberación de estos factores en la activación directa de diferentes caspasas, neutralización de inhibidores de caspasas y la activación de nucleasas. Son proteínas mitocondriales pro-apoptóticas de pequeño tamaño como Smac/DIABLO, AIF, la endonucleasa G y OMI/HtrA2 (Van Loo et al., 2002a; Du et al., 2000; Verhagen et al., 2000; Susin et al., 1999; Li et al., 2001a; Van Loo et al., 2001; Van Loo et al., 2002b).

El factor inductor de apoptosis (*apoptosis inductor factor*, AIF) es una flavoproteína con una actividad apoptótica potente. En respuesta a estímulos apoptóticos se libera de la mitocondria por mecanismos similares al citocromo c, trasloca al núcleo donde causaría la fragmentación del DNA y condensación periférica de la cromatina, pero no la digestión oligonucleosomal del DNA típica de *laddering*. Además de estos efectos, el AIF también está implicado en la modificación del potencial transmembrana de la mitocondria y de la exposición de la fosfatidilserina al exterior de la membrana plasmática. Promueve apoptosis por mecanismos independientes de caspasas aunque no es del todo seguro que siempre sea así (Cregan et al., 2004).

Smac/DIABLO (*second mitochondria-derived activator caspases / direct IAP-binding protein with low pI*) es una proteína mitocondrial no relacionada con la apoptosis, pero que al liberarse al citosol actúa antagonizando las proteínas IAPs, principalmente XIAP, pero también a c-IAP1, c-IAP2 y survivina. Esta proteína se une a las IAPs por dominios estructurales concretos, creando competencia por su unión a las caspasas-3 y -7, dejando estas libres para actuar.

Otro factor mitocondrial que también actúa inhibiendo las IAPs es la serina proteasa Omi, también conocida como HtrA2. Este factor mitocondrial se libera como consecuencia de estímulos apoptóticos relacionados con el estrés celular. Es una proteína que se activa al ser proteolizada en la mitocondria y no se sabe bien si es un proceso autocatalizado o bien si

otras proteasas están implicadas. Además de la unión a las IAPs por los mismos dominios estructurales que Smac/DIABLO, este factor también es un acelerador del proceso de muerte debido a su actividad proteasa, lo que le confiere un mecanismo de actuación en la muerte programada independiente de caspasas y de interacción con las IAPs.

La endonucleasa G es otro de los factores mitocondriales implicados en la apoptosis. Localizado en la mitocondria donde actuaría en la replicación del DNA mitocondrial, es liberado al citosol donde transloca al núcleo y allí participaría en la ruptura del DNA como en el factor AIF.

Como podemos observar, numerosas señales pueden activar la vía mitocondrial iniciando la cascada de activación de procesos de muerte programada. Hasta el momento hemos descrito una serie de procesos que están relacionados con la muerte celular, tanto necrosis como apoptosis. Todos estos procesos pueden verse afectados en algún momento debido a la actuación de una serie de vías de señalización intracelular que pueden modular, controlando o frenando los procesos de muerte activados previamente. Esas vías serán las que estudiaremos a continuación con más detenimiento.

### **1.5. Control de la apoptosis mediante señalización intracelular: Vías de transducción implicadas asociadas a supervivencia.**

Nos preguntábamos en un apartado anterior (ver apartado 1.3) si el conocimiento de los procesos que se producen durante el desarrollo, similares a los que ocurren cuando se desencadenan procesos patológicos, nos permitiría incidir mediante nuevas estrategias tanto científicas como terapéuticas en el control de la apoptosis. Este conocimiento implica no solo entender cómo se desencadenan los diferentes tipos de muerte y los mecanismos implicados como hemos visto hasta ahora, sino también cómo pueden ser controlados, modulados e incluso frenados mediante la actuación de otros mecanismos que las propias células tienen y pueden poner en marcha para poder librar lo que anteriormente llamamos la batalla por la supervivencia. Tanto los estímulos que desencadenan los procesos de muerte como otros que se ponen en marcha en respuesta a estos dan lugar a la activación de toda una señalización intracelular, entre las cuales destacan como vías clave en los procesos de supervivencia y que se han descrito en muchos sistemas celulares y en muchos estímulos, la vía fosfatidilinositol-3-OH kinasa (*phosphatidylinositol-3-OH kinase*; PI3-K) / Akt (proteína kinasa identificada en el virus AKT) también

llamada proteína kinasa B (*Protein Kinase B*; PKB) y la vía proteína activada por mitógeno (*Mitogen-Activated Protein Kinase*; MAPK).

### **1.5.1. La vía PI3-K/Akt: la principal vía que media la supervivencia neuronal.**

Fosfatidilinositol-3-OH kinasa (PI3-K) es un enzima que participa en un amplio espectro de procesos celulares y su actividad está ligada al crecimiento celular, diferenciación, movilidad, tráfico de membranas y supervivencia celular, por numerar algunos. Este enzima se ha relacionado con algunas enfermedades humanas, principalmente en procesos cancerígenos. Es por esto que muchos científicos han centrado su esfuerzo en entender como funciona este enzima, como está regulado y como actúa.

Múltiples factores de supervivencia activan las PI3Ks. Estas kinasas fosforilan en posición D3 los lípidos fosfatidilinositoles para generar fosfatidilinositol 3-fosfato (PI(3)P), fosfatidilinositol 3,4-bisfosfato (PI(3,4)P<sub>2</sub>) y fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PI(3,4,5)P<sub>3</sub>). En las células de mamífero se han caracterizado hasta tres clases diferentes de PI3Ks que se diferencian en los mecanismos de activación por agonistas extracelulares, en su especificidad por sustrato lipídico y en la distribución en los tejidos y en las células (Vanhaesebroeck et al., 1997). Las de clase I generan los tres tipos de fosfatidilinositoles fosfato, las de clase II producen PI(3)P y PI(3,4)P<sub>2</sub>, mientras que las de clase III solo generan PI(3)P. Nos centraremos en la PI3K de clase I, la única clase capaz de generar PI(3,4,5)P<sub>3</sub>, principal responsable de la activación del segundo miembro de esta vía de supervivencia, la treonina / serina kinasa Akt, también conocida como PKB (Franke et al., 1997). La PI3K es una molécula heterodimérica formada por una subunidad catalítica, la p110, y una subunidad reguladora, normalmente la p85 (ver figura 8). Principalmente, PI3K es regulada por dos proteínas: los receptores tirosina kinasa y la proteína G monomérica Ras. Dos dominios presentes en la PI3K nos ayudan a entender cómo son regulados estos enzimas.

La subunidad p85 contiene dos dominios adaptadores SH2 (*Src homology 2*). Estos dominios permitirán a la subunidad reguladora asociarse a proteínas con residuos tirosina fosforilados dentro de una secuencia específica pYMXM. Encontramos esta secuencia de asociación en proteínas adaptadoras ligadas a la membrana, como serían Gab 1 o IRS 1, pero también en la cola citoplasmática de los receptores tirosina kinasa, uno de sus principales reguladores (Schlessinger,

2000). La unión de p85 al receptor tirosina kinasa produce un cambio conformacional en el complejo p85/p110 que impide el efecto inhibitor de la subunidad reguladora sobre la subunidad catalítica. Paralelamente, la asociación de PI3K con el receptor aproxima en el espacio la subunidad p110 activa a los sustratos lipídicos de membrana sobre los que actuará.

El enzima PI3K de clase I contiene un dominio RBD (*Ras Binding Domain*) que permitirá su interacción con la conformación activa de Ras. A principios de los 90, aparecieron los primeros argumentos a favor de esta interacción, por una parte se detectó el dominio RBD en la estructura primaria de la PI3K, conocido por su implicación en la asociación con proteínas como Ras o c-Raf, y por otra parte, experimentos de co-inmunoprecipitación, en los cuales se encontraba una fracción activa de la PI3K unida a Ras (Sjolander et al., 1991). Aún así, la primera demostración de una interacción directa la realizó el grupo de J. Downward, utilizando proteínas purificadas y confirmando la interacción con formas mutantes de Ras (Rodríguez-Viciano et al., 1994). La activación de PI3K por Ras participaría en señales de factores de crecimiento y de diferenciación (Rodríguez-Viciano et al., 1994), reorganización del citoesqueleto (Rodríguez-Viciano et al., 1997), transformación celular (Gire et al., 2000) y bloqueo de la apoptosis inducida por diferentes estímulos (Kauffmann-Zeh et al., 1997; Xue et al., 2000), entre otras.

Diversas fosfatasas regulan negativamente la PI3K y controlan la duración de la estimulación degradando los PI(3,4,5)P<sub>3</sub>. La fosfatasa más conocida es PTEN (*Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10*), una proteína supresora de tumores que defosforila PI(3,4,5)P<sub>3</sub> para producir PI(3,4)P<sub>2</sub> gracias a la presencia de los dominios SH2, SHIP1 (*Src homology 2 (SH2) domain-containing inositol-5-phosphatase 1*) y SHIP2 (*SH2-containing inositol-5-phosphatase 2*) (Leevers et al., 1999).

El resultado de la activación de la PI3K será una rápida acumulación de PI(3,4,5)P<sub>3</sub> que desencadenará la activación de la vía PI3K/Akt (ver figura 8). Hay proteínas de señalización que contienen dominios llamados de homología a pleckstrina (*pleckstrin homology*; PH). Estos dominios se encuentran en proteínas globulares y les permiten unirse con gran afinidad a fosfolípidos. Un subconjunto de dominios PH se unen preferentemente a PI(3,4)P<sub>2</sub> y PI(3,4,5)P<sub>3</sub> más que a otros fosfoinosítidos (Bottomley et al., 1998; Rameh and Cantley, 1999, Fruman et al., 1999). La integridad de estos dominios es clave para la activación de las proteínas kinasas dependientes de fosfoinosítidos (*phosphoinositide-dependent kinase*; PDK)

y la treonina / serina kinasa Akt, principal efector de la PI3K. Los fosfoinosítidos son capaces de unirse al dominio PH de estas kinasas. Esta unión provoca la translocación de la kinasa del citosol a la membrana plasmática y quedarán próximas en el espacio (ver figura 8). Es esta proximidad la que permitirá a las PDKs fosforilar y activar Akt. Se han descrito dos sitios de fosforilación claves para Akt; la treonina 308 y la serina 473. En la actualidad se conocen dos PDKs, la PDK1 y la PDK2. La PDK1 fosforila específicamente el residuo treonina 308 *in vivo* (Alessi et al., 1997, Stokoe et al., 1997) y PDK2 el residuo serina 473 (Alessi et al., 1997). PDK1 ha sido clonada pero se desconoce si PDK2 es diferente de PDK1 o es una isoforma de esta.

Akt fosforila numerosos sustratos implicados en la maquinaria del proceso apoptótico (ver figura 8). Estos incluye, entre los más importantes, la proteína BAD, miembro de la familia de Bcl-2, la GSK3, la caspasa-9 humana y algunos factores de transcripción, como los de la familia forkhead (FKH). Como comentamos anteriormente (ver apartado 1.4.2.3) BAD es capaz de unirse a dos miembros de su familia que tienen función antiapoptótica, Bcl-2 y Bcl-X<sub>L</sub>, inactivándolas. Akt puede fosforilar BAD en la serina 36, creando un sitio de unión para la proteína 14-3-3 (proteína adaptadora ubicua y altamente expresada). Cuando BAD se une a 14-3-3, es incapaz de heterodimerizar con las proteínas de su familia y así inhibir la actividad antiapoptótica de Bcl-2 y Bcl-X<sub>L</sub> (Zha et al., 1996). De esta manera, la fosforilación de BAD por Akt facilita su inactivación y promueve supervivencia celular (Datta et al., 1997). A pesar de que es una de las funciones antiapoptóticas principales de Akt, BAD no se encuentra expresada de forma ubicua.

Akt inactiva FKH de forma similar a la descrita anteriormente. Cuando Akt fosforila FKH, se facilita la unión de ésta a proteínas 14-3-3, obligándolo a permanecer en el citoplasma e impidiendo su translocación al núcleo donde ejercería su función proapoptótica activando la transcripción de genes proapoptóticos como por ejemplo la expresión del ligando Fas (Brunet et al., 1999). Experimentos de transfección adenoviral con dominantes negativos de Akt (eliminan su actividad) también mostraron una activación del factor FKH, induciéndose en este caso el factor proapoptótico Bim (Linseman et al., 2002). Akt también puede activar la expresión de genes a partir de otros factores de transcripción. Akt en diferentes tipos neuronales es capaz de inducir la expresión de genes de supervivencia como Bcl-2 y Bcl-XL activando factores de transcripción como NF-κB y CREB (*cAMP-response-element-binding protein*) (Kane et al., 1999; Du and Montminy, 1998).

## INTRODUCCIÓN

La acción de Akt puede ser directa sobre elementos de la cascada apoptótica, fosforilándolos, como es el caso de la caspasa-9 (Cardone et al., 1998). Esta fosforilación impediría su activación y por tanto bloquearía la activación de la cascada de caspasas. De esta manera podría inhibir directamente una de las cascadas más importantes de la apoptosis. Estos sitios de fosforilación de la caspasa-9 para Akt descritos en células humanas no parece que estén presentes en células de rata (Fujita et al., 1999).

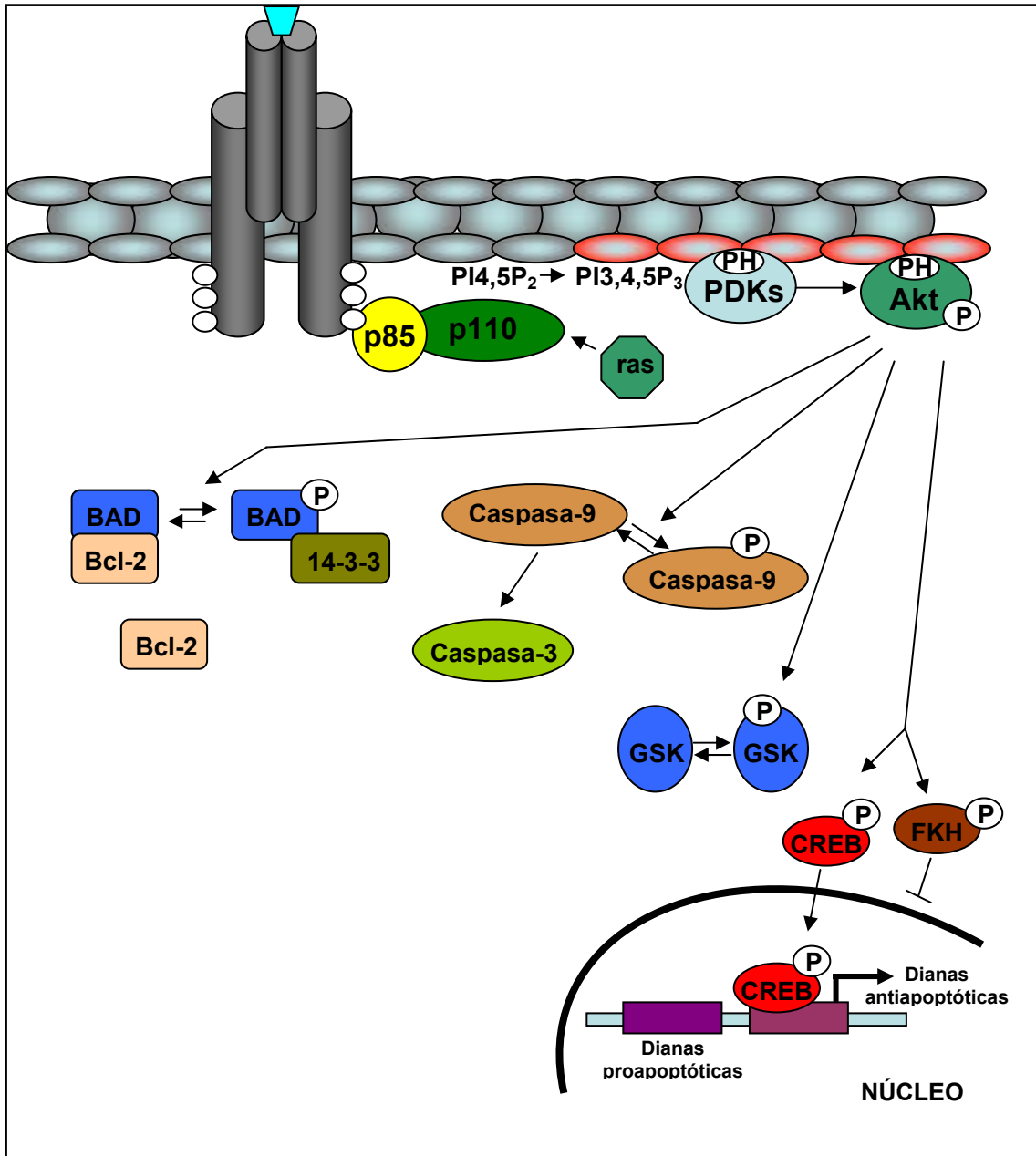


Figura 8. Esquema de la vía PI3K/Akt. Resumen esquemático de la activación de la vía PI3K/Akt que detalla los principales activadores celulares de la vía y las dianas más importantes de la proteína Akt.

Uno de los primeros sustratos directos en ser identificados fue la glicógeno sintasa kinasa 3 (*Glycogen synthase kinase 3*; GSK3) (Cross et al., 1995). Está implicada en la regulación de importantes vías de señalización intracelular incluyendo el control de factores de transcripción como AP1 y CREB. Recientemente está adquiriendo importancia como sustrato clave en la apoptosis. Es una proteína constitutivamente activa en condiciones fisiológicas donde fosforila numerosos sustratos (como por ejemplo la glicógeno sintasa, c-myc,  $\beta$ -catenina, ...), manteniéndolos inactivos y estimulando su degradación por la vía del proteasoma (Kandel and Hay, 1999). Posteriormente se observó la importancia que jugaba en la apoptosis neuronal (Crowder and Freeman, 2000; Hetman et al., 2000).

### **1.5.2. Las MAPKs, una gran familia de segundos mensajeros.**

Otra de las vías clave en cuanto a la señalización intracelular es la familia de proteínas conocida como proteínas activadas por mitógenos (*mitogen-activated kinases*) o más comúnmente llamadas, las MAP kinasas. Estas proteínas están relacionadas como si de una red se tratase y actúan en forma de cascada de activación donde cada cascada tiene al menos una serie de tres proteínas kinasas que se fosforilan, activan en cascada y que culminan con la activación de una MAP kinasa multifuncional (Lewis et al., 1998; Errede et al., 1995). Las MAP kinasas son los componentes principales de las vías de transducción que controlan la embriogénesis, diferenciación celular, proliferación celular y muerte celular (ver figura 9). Aunque interacciones entre las diferentes cascadas de activación ocurren en numerosas vías para integrar respuestas y moderar las señales de salida y que existen numerosas evidencias que muestran un gran solapamiento entre sustratos de las MAPK (Lewis et al., 1998; Waskiewicz et al., 1997), nos centraremos en el estudio detallado y particular de una de estas vías miembro de la familia, la vía Raf/MEK/ERK, implicada de manera importante en procesos de crecimiento, desarrollo y diferenciación.

La proteína clave en esta vía de señalización es la ERK1/2 (*Extracellular signal Regulated Kinase 1/2*). Existen dos proteínas ERKs, la ERK1 y la ERK2, de 44 y 42 KDa respectivamente, y presentan una homología global del 85% (Boulton et al., 1990; Boulton et al., 1991). Ambas son expresadas de forma ubicua aunque su abundancia relativa varía en función del tejido. ERK2 se encuentra mayoritariamente en el soma y árbol dendrítico de neuronas de la corteza, cerebelo, hipocampo y estriado (Fiore et al., 1993). Éstas, inicialmente se

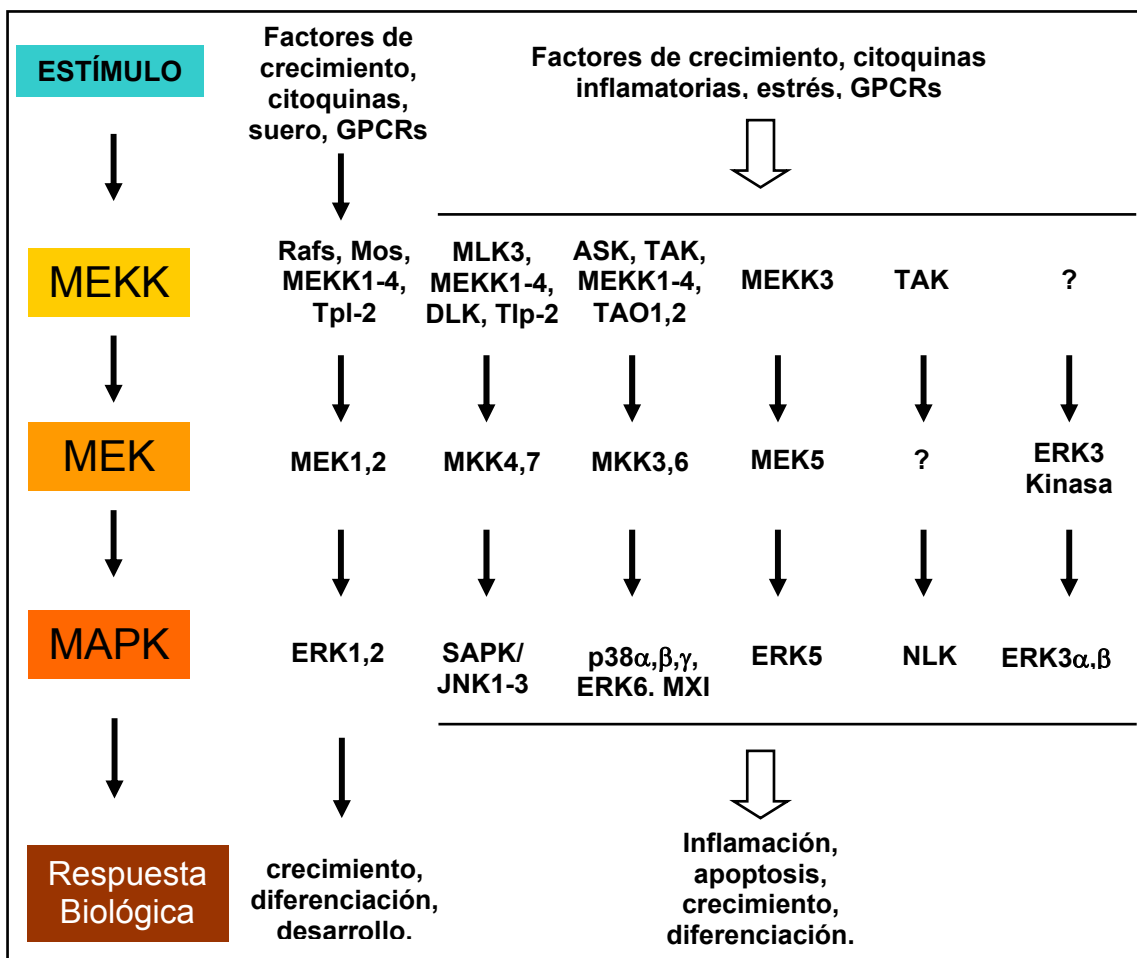
describieron como MAPKs (Cooper and Hunter, 1983), hecho que a menudo lleva a la confusión ya que muchas veces para referirnos a las ERK1/2, nos referimos como MAPKs. No fue hasta 1989 cuando se observó que estas proteínas eran activadas por numerosos estímulos mitogénicos, de aquí que se cambiara su nombre por el de ERKs (Rossomando et al., 1989). Justo un año antes se describió el modelo de regulación, uno de los rasgos característicos de las MAPK es su mecanismo de activación. La fosforilación dual de las MAPK en tirosina y treonina (Ray and Sturgill, 1988). Parece que el activador inmediato y que regula su función es MEK, (Ferrell, Jr. and Bhatt, 1997). Esta fosforilación dual permite el establecimiento de un umbral de activación (Ferrell, Jr., 1997; Ferrell, Jr., 1999) que permite que las proteínas siendo fosforiladas en tirosinas no son activas y se van acumulando. Una vez superado el umbral, las kinasas pasan rápidamente al estado activo en función de la fosforilación en treoninas. Ya activadas las ERKs se pueden localizar en el citosol o en el núcleo. Este fenómeno se produce para potenciar la cooperación en la activación de este tipo de vías y permitir una mejor modulación por otras señales para amplificar la señal.

MEK1 y MEK2 son codificadas por dos genes diferentes (Zheng and Guan, 1993), y presentan un 80% de homología entre ellas. MEK1 se presenta en mucha mayor abundancia que MEK2 en el cerebro de ratón (Crews et al., 1992; Ortiz et al., 1995) y en células gliales (Tournier et al., 1994). Se considera que el único sustrato de MEK1/2 es ERK1/2, de manera que a menudo, el papel de esta cascada se estudia con inhibidores farmacológicos de MEK1/2 en los tratamientos tanto en células como en animales, como el PD 98059 (Dudley et al., 1995; Alessi et al., 1995) o el U0126 (Favata et al., 1998).

Los activadores de MEK, MEK kinasas (MEKK), son las proteínas que llevan por nombre Raf (ver figura 9). Existen tres miembros de la familia Raf: A-Raf, B-Raf y c-Raf (también llamada Raf-1) (Daum et al., 1994; Morrison, 1995; Morrison and Cutler, 1997; Hagemann and Rapp, 1999). Las tres fosforilan y activan MEK1/2 (Dent et al., 1992; Howe et al., 1992). Además, las Rafs parece que actúan con una gran especificidad sobre MEK1/2, haciendo de la vía Rafs-MEK1/2-ERK1/2 una de las cascadas más lineales y específicas que se conocen.

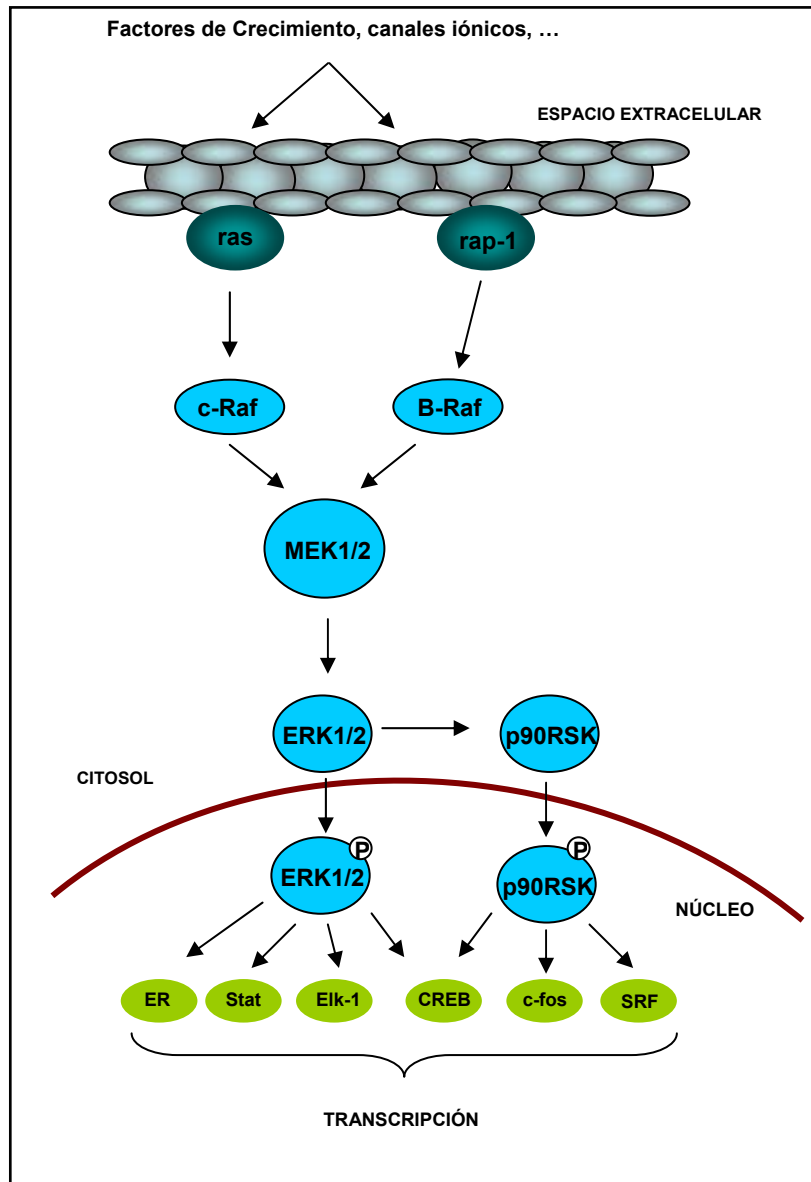


Las Rafs se consideran el punto central de la regulación de la cascada ERK1/2 a través de señales extracelulares. Muchos elementos regulan la activación de c-Raf y de B-raf: fosforilación por PKA (Dumaz et al., 2002), asociación con proteínas hsp90 (*heat shock protein 90*) (Jaiswal et al., 1996), con proteínas 14-3-3 (Fantl et al., 1994) y fosforilación por otras kinasas como Src o PKC entre otras (Morrison et al., 1993). A pesar de ello, quizás sus reguladores principales sean las proteínas G monoméricas ras y rap-1 que transmiten a la cascada ERK1/2, pero también a otras cascadas, una gran parte de las señales extracelulares, como veremos más adelante.



**Figura 9. Esquema de la familia de la cascada MAP Kinasa.** Resumen esquemático de la cadena de tres proteínas kinasas de cada una de las familias Mapas. De manera genérica se muestran los diferentes estímulos que las pueden activar así como las respuestas biológicas que regulan. GPCRs; Receptores acoplados a proteínas G (*G protein-coupled receptors*).

Existen otros factores que regulan las ERKs y que pueden estimular la vía de las ERK1/2 en neuronas. Los efectos de estos factores sobre esta vía pueden ser muy diferentes a los descritos anteriormente y explicaría la gran variedad de funciones que pueden tener las ERKs. Uno de los más estudiados es el AMPc (Frodin et al., 1994) que ha dado pie a generar un gran número de trabajos a cerca de las funciones de la vía de las MAPKs. Recientes estudios sugieren que la vía ERK juega un papel fundamental tanto en invertebrados como en vertebrados en la



**Figura 10. La vía Raf/MEK/ERK.** Resumen de la cascada de activación de ERK, detallando los sustratos, tanto nucleares como citosólicos, implicados en los procesos de supervivencia y desarrollo. La activación puede ser tanto por factores de crecimiento como por mecanismos asociados a canales iónicos.

consolidación de la memoria con la implicación del AMPc (Impey et al., 1999). La cascada de las MAPKs se activa potencialmente por la actividad sináptica que en la mayoría de los casos provoca incrementos en la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$ . Así pues parece que la vía ERK cobra un especial interés en los mecanismos implicados tanto en la actividad como en la plasticidad sináptica y a través de ella el posible papel central del factor de transcripción CREB en algunas de esas formas de plasticidad sináptica. En estos procesos se puede desencadenar la activación de una serie de factores que deriven en la activación de las MAPKs. Los mecanismos por los cuales el  $Ca^{2+}$  activa las MAPKs en neuronas no están del todo definidos. En células PC12, la entrada de  $Ca^{2+}$  activa la proteína G ras a través de la tirosina kinasa Src a través de factores como Sos (GEF) mediante la cascada Src/Shc/Grb2/Sos (Rusanescu et al., 1995) o vía PyK2-dependiente y Shc-independiente (Lev et al., 1995). Se han propuesto otros que implican la acción de proteínas como las  $Ca^{2+}$ /calmodulina (CaM), la CamKII (*CaM kinase II*) (Chen et al., 1998a), la PKA (Impey et al., 1998) y la PKC (Bouschet et al., 2003) en la activación de la vía MAPK a través de proteínas de la familia Ras.

Los sustratos de la vía ERK1/2 son numerosos y variados, desde proteínas del citoesqueleto hasta factores de transcripción. Nos centraremos en aquellos sustratos implicados en procesos de supervivencia y plasticidad (ver figura 10). En el núcleo, las ERK1/2 activan principalmente factores de transcripción de la familia AP-1 (*Activating Protein-1*) como c-fos (Chen et al., 1992). c-fos contiene dominios ETS que regulan la transcripción de genes inducidos de manera precoz por suero, uniéndose a las regiones SRE (*serum responsive element*) de los promotores. Muchos de estos genes están asociados a procesos de supervivencia y plasticidad. Otros factores de transcripción fosforilados por ERK1/2 son los miembros de la familia TCFs (*ternary complex factor*), como Elk-1 (Gille et al., 1995). ERK1/2 también fosforila otras proteínas nucleares como la RNA polimerasa II (Dubois et al., 1994), o el receptor de estrógenos (Migliaccio et al., 1996). En el citosol, ERK1/2 también fosforila numerosos sustratos. Entre ellos encontramos la MAP2, la proteína Tau (Drewes et al., 1992) o las dos isoformas de la proteína Rsk (*Ribosomal S6 kinase*), Rsk-1 y Rsk-2 (Sturgill et al., 1988). Rsk es un sustrato muy importante porque actúa sobre dos proteínas implicadas en procesos de vida y muerte celular. Rsk-2 activada puede fosforilar el factor de transcripción CREB en la serina 133 (Xing et al., 1996). Esta fosforilación activará la función de CREB, su implicación en la transcripción de genes asociados a procesos tanto de vida (Riccio et al., 1999) como de diferenciación celular (Frodin and Gammeltoft, 1999).

ERK ejerce múltiples funciones en el cerebro. Nos centraremos en sus implicaciones en procesos como la neuroprotección y la plasticidad tanto neuronal como sináptica que pueden darse como respuesta a la activación de procesos apoptóticos. Tradicionalmente se asocia la activación de ERK con factores de crecimiento. Numerosos factores de crecimiento y neurotrofinas (como NGF, BDNF, NT-3, NT-4, NT-5, EGF, IGF-I) estimulan ERK1/2 tanto en neuronas (Fukunaga and Miyamoto, 1998) como en astrocitos (Tournier et al., 1994). La acción de los factores de crecimiento es a través de sus receptores, que poseen actividad tirosina kinasa. A través de una serie de proteínas adaptadoras, acabarán activando las proteínas ras y/o rap-1, que a su vez acabarán activando ERK1/2, aunque son capaces de activar otras vías importantes implicadas en procesos de supervivencia como la PI3-K/Akt (Kaplan and Miller, 2000).

La mayoría de los efectos antiapoptóticos de las neurotrofinas que encontramos en la literatura los encontramos ligados a la actividad PI3-K e independientes de la actividad ERK. No obstante, existe un debate sobre los efectos neuroprotectores de las ERKs desde el punto de vista de la importancia de la actividad de esta vía en estos procesos de supervivencia. Una de las hipótesis más aceptada es que ERK no es clave en estos procesos y su grado de participación dependería del sistema y de los estímulos. La estimulación con NGF de células PC12 y de cultivos de neuronas simpáticas produce una fuerte y sostenida activación de las ERKs, pero cuando inhibimos la vía con PD98059, o a través de dominantes negativos, tiene poco efecto o nulo sobre la supervivencia de estas células (Creedon et al., 1996; Virdee and Tolkovsky, 1996; Klesse et al., 1999). Otras evidencias indican que, en células PC12, las vías ERK y PI3-K/Akt se repartirían el trabajo: la vía ERK se ocuparía del crecimiento de las neuritas mientras que la supervivencia iría a cargo de la vía PI3-K/Akt (Klesse et al., 1999), pero si se mantiene la vía de las ERKs constitutivamente activa, esta puede asegurar la viabilidad de la célula (Xia et al., 1995; Klesse et al., 1999). Otros estímulos neuroprotectores, como el BDNF, promueven la supervivencia de las neuronas simpáticas a través de MEK y PI3-K (Atwal et al., 2000). Este conjunto de datos podría hacer pensar que ERK puede jugar un papel neuroprotector cuando se ve sobreexpresada, pero no queda claro si, en un contexto fisiológico, como podría ser el estímulo por una neurotrofina como NGF, las ERKs tendrían un rol neuroprotector.

Parece que donde convergen todos los estímulos que implican la actuación de la vía ERK1/2 son las proteínas G monoméricas que hemos ido nombrando a lo largo de este apartado y que a continuación explicamos: las proteínas Ras.

### **1.5.3. Las proteínas monoméricas G: pequeñas grandes reguladoras.**

Las proteínas Ras son pequeñas GTPasas que regulan el crecimiento celular, la proliferación y diferenciación. El mecanismo básico de la señalización de Ras se ha investigado ampliamente. Como resultado tenemos un detallado entendimiento bioquímico de cómo la Ras GTPasa es cargada con GTP y cómo, en este estado activo, Ras se une y activa un gran catálogo de proteínas efectoras. Así, las proteínas Ras funcionan como un interruptor molecular determinado por si están unidas a guanina difosfato (GDP) (posición *off*) o a guanina trifosfato (GTP) (posición *on*) (Ehrhardt et al., 2002). Inactivas, las proteínas ras-GDP son activadas por la interacción con miembros de una larga y diversa clase estructural de proteínas llamadas *guanine-nucleotide exchange factors* (GEFs), las cuales catalizan la liberación de GDP. La pérdida de GDP es rápidamente reemplazada por la más abundante GTP (Lenzen et al., 1998). Este cambio de GDP por GTP permite la unión de una gran variedad de proteínas efectoras diferentes a ras en esta configuración unida a GTP. Varias proteínas con actividad GTPasa (GAPs; *GTPase activating proteins*) también se unen a proteínas Ras en su estado unidas a GTP, actuando de reguladoras negativas incrementando la actividad GTPasa de las proteínas Ras, dando lugar a la hidrólisis de GTP a GPD pasando las proteínas Ras a su estado inactivo *off*.

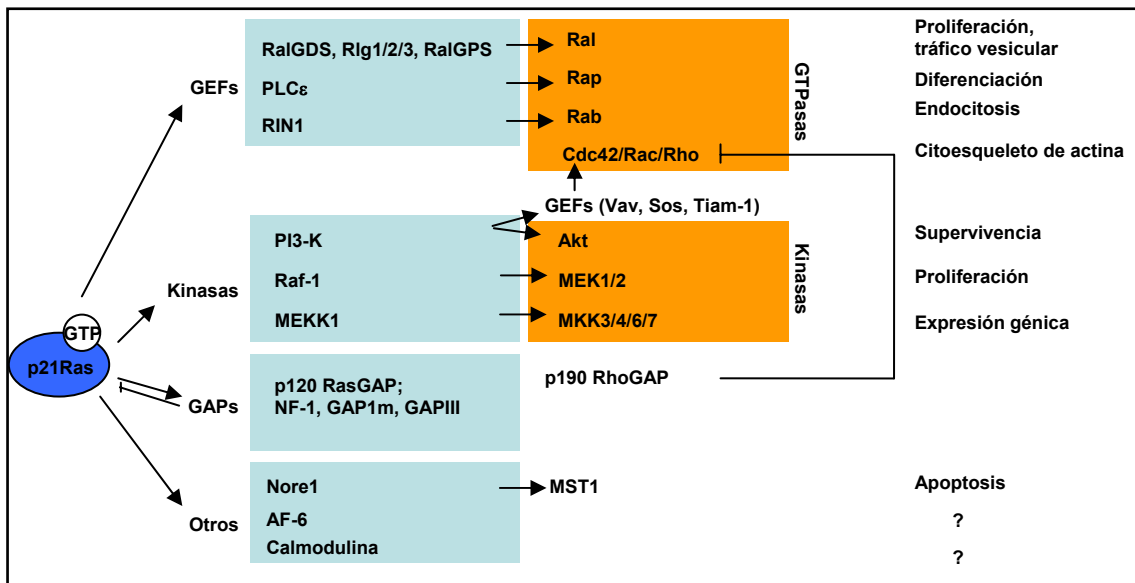
La superfamilia de proteínas Ras incluye aproximadamente sobre 150 pequeñas GTPasas (diferentes a las heterotriméricas GTPasas, las proteínas G). Ésta comprende seis subfamilias, una de ellas es la subfamilia que lleva el mismo nombre, Ras. Esta subfamilia contiene 13 miembros divididos en cinco subgrupos. El primero de ellos incluye las primeras proteínas Ras descubiertas, H-Ras y K-Ras. Junto con N-Ras, estas comprenden las proteínas clásicas Ras o p21Ras. Las proteínas p21Ras están estrechamente relacionadas y presentan una identidad de secuencia del 85%. Miembros de otros subgrupos como Rap o Ral comparten el 40-50% de identidad en aminoácidos con p21Ras. Nos centraremos en la proteínas clásicas Ras ó p21Ras y las diferentes proteínas efectoras que se le pueden unir, teniendo en cuenta su especial relevancia en los procesos de supervivencia, proliferación y diferenciación asociados a la activación de vías como mencionamos en el apartado anterior, Raf/MEK/ERK.

## INTRODUCCIÓN

Ras-GTP se asocia a diferentes tipos de proteínas promoviendo su activación. Estos efectores pueden ser agrupados en GEFs para otros miembros de la superfamilia Ras, kinasas, GAPs y un grupo de efectores con funciones menos caracterizadas (ver figura 11).

Dentro de los efectores del tipo GEFs, Ras-GTP puede asociarse a RalGDS activando otras proteínas de la familia Ras (Hofer et al., 1994), participando en el control de la activación de Ras. En el grupo de kinasas, Ras-GTP puede unirse a la subunidad catalítica p110 de la PI3-K (Rodriguez-Viciano et al., 1994) y a miembros de la familia Raf de serina/treonina kinasas, Raf-1 y B-Raf (Vojtek et al., 1993; Zhang et al., 1993; Warne et al., 1993). Estas uniones darían lugar a la activación de las dos vías más importantes asociadas a estos efectores, la vía Akt y la vía Raf/MEK/ERK, comentadas anteriormente.

La co-evolución de los miembros de la subfamilia Ras durante millones de años ha dado como resultado una elevadísima interregulada red de señalización, dando lugar a una gran complejidad. Empieza a esclarecerse que la interacción de los miembros de la familia Ras con sus reguladores y efectores depende no solo de potenciales interacciones dictadas por su estructura, sino que también debido a la particular localización subcelular de Ras y sus potenciales reguladores y efectores.



**Figura 11. Efectores más generales de las proteínas Ras y sus funciones.** Los podemos clasificar en efectores del tipo GEFs, GAPs y otras. Extraído de Ehrhardt et al., 2002.

### **1.6. Control de la apoptosis mediante señalización intracelular: Vías de transducción implicadas asociadas a muerte, JNK/SAPK y p38.**

Otros miembros de la familia de las MAPK que juegan un papel importante en la modulación de procesos, relacionados la mayoría de las veces con procesos de muerte son los componentes de la familia que responden a diferentes formas de estrés, como la transformación, el desarrollo, la activación del sistema inmune, la inflamación, los cambios ambientales y por supuesto, la apoptosis. Nos referimos a las proteínas kinasas comúnmente llamadas SAPKs (*stress-activated protein kinases*) que integran proteínas que llevan el mismo nombre, las proteínas JNK y p38 (ver figura 9). Existen de entre 8 y 10 isoformas diferentes producto de procesos de *splicing* alternativo de tres genes principalmente, *sapka*,  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  (Kyriakis et al., 1994; Derijard et al., 1994; Kallunki et al., 1994; Casanova et al., 1996; Gupta et al., 1996). Algunas de estas isoformas de SAPK fueron clonadas de forma independiente y reciben el nombre de *c-jun NH2-terminal kinase* (JNK) (Derijard et al., 1994; Kallunki et al., 1994). Existen diversas isoformas de JNK que son el resultado de la expresión de tres genes: *jnk1*, *jnk2* y *jnk3* (Gupta et al., 1996). Estudios con ratones *knockout* implican directamente a JNK1 y JNK2 en la regulación de procesos apoptóticos durante el desarrollo del sistema nervioso (Yang et al., 1997; Kuan et al., 1999). De aquí que en muchas ocasiones a las proteínas JNKs se las conozca también por el nombre genérico de SAPKs.

Las SAPKs se unen y fosforilan el factor de transcripción c-jun (Dai et al., 1995), uno de los componentes del complejo de factor de transcripción AP-1 (*activator protein 1*) junto con otros miembros de las familias de c-jun y c-fos. También pueden fosforilar otras dianas nucleares como Elk-1 (Whitmarsh et al., 1995), elementos de respuesta a suero como Sap-1a (Janknecht and Hunter, 1997) o ATF-2 (van Dam et al., 1995). Estos factores forman dímeros que se unen a los sitios AP-1 promoviendo la expresión de genes con sitios de unión para este complejo. Las JNKs pueden actuar sobre numerosas proteínas fosforilándolas tanto en el citosol como por ejemplo p53 (Hu et al., 1997), como en el núcleo si se transloca como c-jun (Hibi et al., 1993), ATF-2 (van Dam et al., 1995) o elk-1 (Whitmarsh et al., 1995) entre otras. Recientemente también han aparecido como sustratos miembros de la familia de Bcl-2, dando importancia a nuevas acciones de JNK en la vía apoptótica mitocondrial (Lei and Davis, 2003; Eminel et al., 2004). Otros miembros de SAPKs son la llamada familia p38, formada por cinco miembros: p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$ , SAPK3 y SAPK4 (Han et al., 1994; Enslin et al., 1998; Li et al.,

1996; Cuenda et al., 1997; Goedert et al., 1997). Éstos responden a casi los mismos agonistas que activan otras SAPKs, pero bajo ciertas circunstancias estas, están reguladas de forma diferente. Fosforilan también ATF-2, Sap-1a y el factor de transcripción GADD153 (*growth arrest and DNA damage transcription factor 153*) (Wang and Ron, 1996). Ciertas isoformas de p38 también activan proteínas kinasas como algunas MAPKAPKs (*mitogen-activated protein kinase-activated protein kinases*) como MNK1 (Fukunaga and Hunter, 1997).

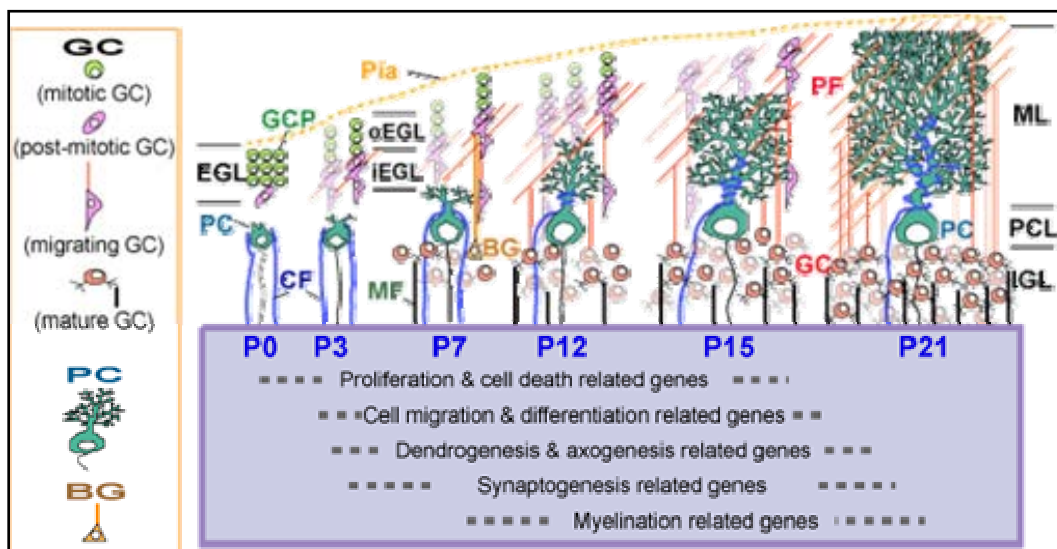
La función de estas proteínas en el proceso apoptótico es diverso en función de los sustratos que fosforilen. Así, las JNKs parecen estar directamente relacionadas con la alteración del potencial de membrana mitocondrial. Miembros de esta familia son capaces de fosforilar e inactivar miembros de la familia de Bcl-2 como Bcl-X<sub>L</sub> (Tournier et al., 2000) promoviendo la apoptosis dependiente de la mitocondria. Estas proteínas de la vía JNK también requieren una doble fosforilación simultánea en residuos tirosina y treonina para activarse. Las JNKs son activadas por múltiples señales extracelulares. Se ha observado que participan en procesos como la isquemia cerebral (Borsello et al., 2003; Kuan et al., 2003), la apoptosis provocada por estrés (Cao et al., 2004), ceramida (Willaime-Morawek et al., 2003b) y modelos de Parkinson y Alzheimer (Hunot et al., 2004; Savage et al., 2002). En células PC12 diferenciadas, la privación de NGF promueve la activación de la vía SAPK y p38 y en consecuencia la inhibición de la vía ERK induciéndose el proceso apoptótico (Xia et al., 1995). En estudios en neuronas granulares de cerebelo, inhibidores de p38 protegen de la muerte apoptótica inducida por glutamato (Kawasaki et al., 1997). Además, la insulina es neuroprotectora y la vía asociada a su receptor inhibe la fosforilación y activación de p38, sugiriendo su contribución a este tipo de muerte (Heidenreich and Kummer, 1996).



## 2. DESARROLLO POSTNATAL DEL CEREBELO: LAS NEURONAS GRANULARES DE CEREBELO.

### 2.1. Las neuronas granulares *in vivo*.

El cerebelo del adulto contiene un núcleo profundo y una corteza cerebelar externa formada por tres capas. La capa cortical más superficial es la capa molecular, formada principalmente por axones de células granulares y dendritas de otras neuronas. Una capa más profunda a la molecular es la formada por una única capa de grandes neuronas, las células de Purkinje. Finalmente, cercana a la sustancia blanca está la capa granular, que contiene los cuerpos celulares y dendritas de las células granulares (ver figura 12, detalle del estadio P21). El córtex cerebelar también contiene tres tipos característicos de interneuronas inhibitorias (las células en cesta, las células estrelladas y las células de Golgi tipo II).



**Figura 12. Esquema del desarrollo de las neuronas granulares de cerebelo.** Durante el desarrollo, la corteza cerebelar se forma a partir de dos capas germinativas, la zona germinativa ventricular y la capa granular externa. De la primera surgen las células de Purkinje y las células gliales y de la segunda, constituida por neuroblastos se diferenciarán a neuronas granulares de cerebelo. GCP, precursor célula granular; PC, célula de Purkinje; GC, célula granular; BG, glía Bergmann; MF, fibra musgosa (*mossy fiber*); CF; fibra trepadora (*climbing fiber*); PF, fbra paralela; EGL, capa granular externa; ML, capa molecular; PCL, capa de células de Purkinje; IGL, capa granular interna. Esquema extraído de [www.brain.riken.jp/labs/lmn/index/Objectives.html](http://www.brain.riken.jp/labs/lmn/index/Objectives.html)

## INTRODUCCIÓN

Hay dos tipos de axones conduciendo señales excitadoras hacia el córtex cerebelar. Cada uno nombrado según las observaciones de los neuroanatomistas del siglo XIX en tinciones y preparaciones estudiadas por ellos. Las fibras trepadoras, que literalmente trepan por las dendritas de las células de Purkinje; todas ellas originadas de células procedentes del complejo de la oliva inferior. Y las fibras musgosas, que representan todos los otros estímulos excitadores hacia el cerebelo desde otras regiones (ver figura 12).

Cuando los precursores de las células granulares finalizan su proceso de mitosis, crecen sus axones y migran sus cuerpos celulares en diferentes direcciones (ver figura 12). Los axones crecen hacia ambos lados, derecha e izquierda, del cerebro en desarrollo, a la vez, unos cuantos milímetros en cada dirección. Todos los axones de células granulares crecen en paralelo, de ahí el nombre de fibras paralelas. Esta capa en la que crecen, superficiales a los cuerpos celulares de las neuronas de Purkinje, será la capa molecular en el cerebelo adulto. Al mismo tiempo, los cuerpos celulares de las granulares migran hacia el interior sobrepasando a las neuronas de Purkinje que ya están en su lugar, hasta formar la nueva capa granular interna. Las células granulares migratorias utilizan las pre-existentes fibras de la glía radial o de Bergmann como cable-guía para su movimiento migratorio (ver figura 12). La proliferación ocurre en la capa granular externa (external granule layer; EGL); la migración de las células granulares desde la superficie a través de la capa molecular (molecular layer; ML) en desarrollo y pasando las células de Purkinje (P), forman la capa granular interna (IGL) del cerebelo adulto (Ryder and Cepko, 1994; Komuro and Rakic, 1998). Las interneuronas inhibitorias en cesta y estrelladas también surgen desde la capa granular externa, pero no migran hacia el interior, permanecen en el desarrollo de la capa molecular.

El cerebelo es una de las áreas del cerebro en la cual el fenómeno de la apoptosis en el desarrollo es más dramático. El desarrollo celular y la diferenciación de estas células granulares es dependiente de una gran actividad básicamente postnatal (Burgoyne and Cambray-Deakin, 1988). Aproximadamente la mitad de estas células granulares de cerebelo (CGCs) generadas llegarán a ser neuronas maduras. La otra mitad se pierde en el proceso apoptótico que se produce tanto en la EGL como posteriormente en la IGL (Raff et al., 1993; Wood et al., 1993). Las CGCs que no establecen sinapsis con las fibras musgosas durante esta migración mueren por apoptosis. Estas fibras aportan constantemente a las CGCs estímulos

excitadores que son imprescindibles para sobrevivir, proliferar, migrar y desarrollarse (Williams and Herrup, 1988; Wood et al., 1993). A pesar de que la presencia de las células de Purkinje es fundamental para el correcto desarrollo de las CGCs, este proceso de maduración *in vivo* se puede mimetizar *in vitro*, realizando un cultivo puro de neuronas granulares de cerebelo, lo que nos permite tener un buen modelo para caracterizar y estudiar el fenómeno de la apoptosis.

## **2.2. El cultivo de CGCs, un buen modelo para el estudio de la apoptosis.**

El cultivo primario de CGCs es un modelo ampliamente utilizado para el estudio de la apoptosis (para revisión, ver Sastry and Rao, 2000). A partir de diferentes concentraciones de potasio extracelulares se puede conseguir que las neuronas sobrevivan o mueran por apoptosis. Si las CGCs crecen en un medio con concentraciones fisiológicas de potasio (5mM; K5) mueren por un proceso que se ha descrito apoptótico. En cambio, si crecen en un medio con concentraciones despolarizantes de potasio (por ejemplo 25mM; K25) sobrevivirán y se desarrollarán (Gallo et al., 1987a). La influencia del potasio se similar cuando las neuronas son maduras. Si se dejan madurar las neuronas en un medio K25 y posteriormente se deprivan de potasio, mueren por apoptosis (D'Mello et al., 1993). La elevada concentración de potasio mimetizaría de alguna manera los estímulos excitadores que, *in vivo*, permiten la supervivencia de las neuronas granulares. ¿Pero, qué hace el potasio? Podemos conseguir que las CGCs cultivadas continuamente en K25 mueran por apoptosis inhibiendo sus canales de  $Ca^{2+}$  voltaje-dependientes y la muerte de las CGCs transferidas a K5 puede ser prevenida por la adición de ionóforos de  $Ca^{2+}$  o activando los receptores ionotrópicos de glutamato permeables al  $Ca^{2+}$  (Kingsbury and Balazs, 1987; Balazs et al., 1988; Pearson et al., 1992; Copani et al., 1995). Estas observaciones sugieren que elevadas concentraciones de  $K^+$  potencian la supervivencia de las CGCs aumentando la entrada de  $Ca^{2+}$ .

Otra de las maneras de estimular a las CGCs para que sobrevivan frente a la muerte apoptótica inducida por K5 es añadiendo factores tróficos al medio. Uno de los más bien establecidos es el efecto neuroprotector del IGF-I (*Insuline-like growth factor-I*) (D'Mello et al., 1993). Se sabe que IGF-I es sintetizado y secretado por las células de Purkinje en el cerebelo (Andersson et al., 1988; Bondy, 1991). Además, el receptor de IGF-I está presente en las neuronas granulares (Bondy, 1991; Lesniak et al., 1988; Marks et al., 1990). IGF-I es por tanto un factor de supervivencia para estas neuronas tanto *in vivo* como acabamos de ver, como in

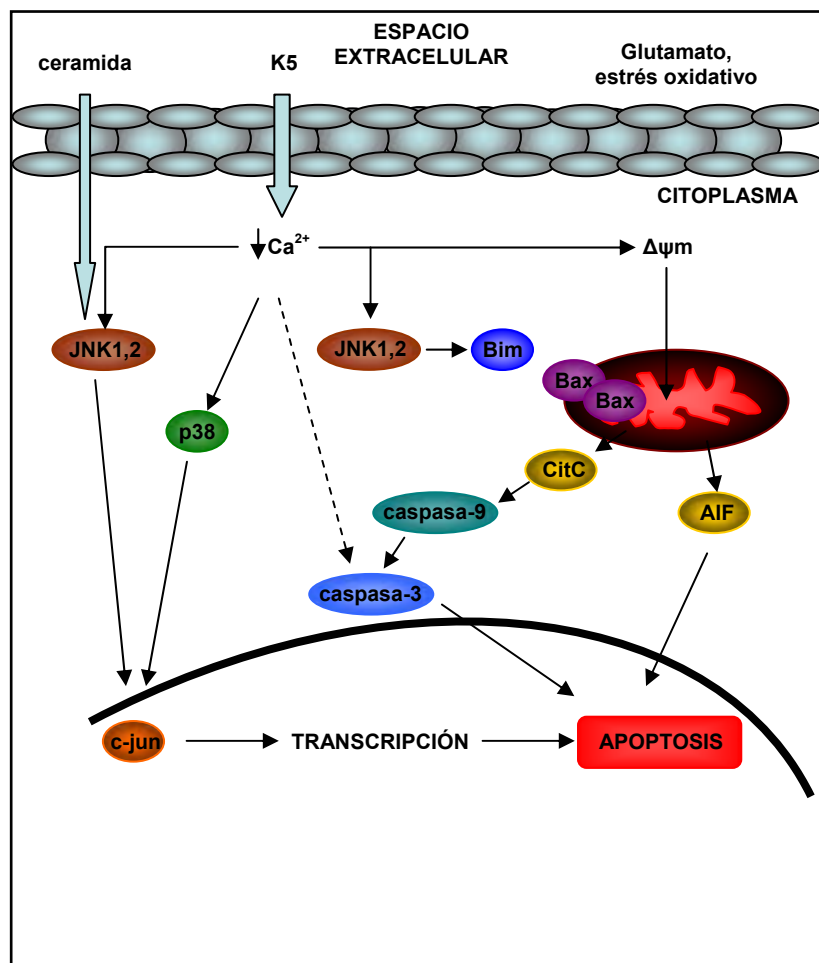
vitro, ya que las CGCs en cultivo, en presencia de elevadas concentraciones de potasio, neutralizando el IGF-I del suero con anticuerpos se reduce en un 30-40% el número de neuronas que maduran (Calissano et al., 1993). Existen otros factores tróficos destacables implicados en efectos de neuroprotección de las CGCs como el BDNF (Segal et al., 1992; Kubo et al., 1995; Bonni et al., 1999), o el polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria (*pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*; PACAP) (Villalba et al., 1997; Gonzalez et al., 1997). También podemos considerar como factor trófico de especial interés en el estudio de las CGCs al agonista glutamatérgico N-metil-D-aspartato (NMDA), interesante porque promueve supervivencia en las CGCs durante su desarrollo *in vitro* mimetizando las señales excitadoras que reciben *in vivo* (Gallo et al., 1987a; Burgoyne and Cambray-Deakin, 1988; Xifro et al., 2005). También porque dependiendo de las concentraciones utilizadas (Balazs et al., 1988), así como del estadio de maduración de las CGCs y duración del estímulo (Resink et al., 1995b; Resink et al., 1995a), el NMDA tendrá efecto protector o efecto tóxico. El receptor NMDA está formado por diferentes combinaciones de subunidades (NMDAR1, NMDAR2 y NMDAR3) y varían en su composición a lo largo del desarrollo de las neuronas. En el caso de las neuronas en cultivo, se ha establecido una correlación en la variación de la composición del NMDAR, entre la situación *in vivo* y la *in vitro* (Vallano et al., 1996).

Existen otras maneras de provocar muerte apoptótica en las CGCs a parte de la privación de potasio mediante la adición de estímulos tóxicos. Nosotros nos centraremos en el papel de la ceramida como veremos más adelante. La ceramida induce muerte apoptótica tanto en neuronas granulares inmaduras (Taniwaki et al., 1999) como en maduras (Centeno et al., 1998). Además, la ceramida podría estar implicada en la muerte apoptótica por privación de potasio ya que se ha observado un incremento en las concentraciones de ceramida intracelulares cuando se priva a las CGCs de potasio (Toman et al., 2002). Esta posible relación de la ceramida y la privación de potasio en la apoptosis de las CGCs serán estudiadas más adelante, primeramente sería interesante saber, a nivel general, cuales son los procesos que están implicados en la muerte apoptótica por privación de potasio en las CGCs.

### 2.3. ¿Quién juega un papel clave en la muerte apoptótica por privación de potasio?

En el proceso de muerte apoptótica que ocurre en las CGCs y que hemos explicado en el apartado anterior juegan un papel clave las caspasas (ver apartado 1.4.2.1). La activación de la caspasa-3 ha estado ampliamente descrita en este modelo, tanto en neuronas inmaduras como en maduras (Armstrong et al., 1997; Eldadah et al., 1997; Moran et al., 1999; Gerhardt et al., 2001) y todo apunta a que el mecanismo por el que se activaría sería a través de la caspasa-9 (Gerhardt et al., 2001), dejando a la caspasa-8 aparentemente sin función en este modelo.

Si la caspasa-9 parece que sería la que canaliza la activación de la caspasa ejecutora (ver figura 13), parece lógico pensar que todas las proteínas implicadas en la vía mitocondrial pueden jugar un papel importante en este proceso apoptótico. También parece jugar un papel importante en el proceso el potencial de membrana



**Figura 13. Esquema de componentes que participan en la muerte apoptótica por K5.** Representación de los elementos que a día de hoy participarían en la muerte apoptótica por privación de potasio en neuronas granulares de cerebelo de rata.

mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ), que en K5 parece que se produce una pérdida, y esta pérdida parece estar relacionada con el papel que juegan proteínas de la familia de Bcl-2 (Wigdal et al., 2002) (ver figura 13). En cultivos de CGCs de elevada densidad encontramos que las proteínas de la familia Bcl-2, en concreto Bcl-2 y Bcl-X<sub>L</sub>, están sobreexpresadas (Ohga et al., 1996), indicando que estas proteínas podrían jugar un papel importante en la supervivencia de estas células. Por otro lado, cuando se cultivan CGCs con deficiencias en la proteína Bax, las células resisten mejor a la muerte apoptótica por K5 y presentan una disminución de la activación de caspasa-3 (Miller et al., 1997; Cregan et al., 1999). La acción apoptótica de Bax en CGCs requiere de su translocación a la mitocondria (McGinnis et al., 1999). Esta translocación podría ser dependiente de Bim en CGCs y regulado por la vía JNK (Harris and Johnson, Jr., 2001). Recientemente se ha descrito que la traslocación de Bax a la mitocondria en CGCs podría estar regulada por acción de la proteína GSK3 $\beta$ . Podría fosforilar Bax y promover su translocación a la mitocondria (Linseman et al., 2004). Además de estos procesos que se suceden en las CGCs en K5, sabemos de la importancia de los factores tróficos a estas células para su supervivencia. Así el IGF-I promueve supervivencia en estas células, por una parte inhibiendo la expresión de genes implicados en el proceso apoptótico (Linseman et al., 2002) y por otra impidiendo que realicen su función proapoptótica (Gleichmann et al., 2000).

Estas proteínas proapoptóticas generan poros mitocondriales transitorios, por donde saldrían algunos factores mitocondriales, entre los cuales, como ya comentamos anteriormente, destaca el citocromo C, uno de los más estudiados en CGCs y utilizado como marcador apoptótico en K5. A pesar de ser un factor clave, la neuroprotección descrita tanto para neuronas inmaduras (K25 o NMDA) (Alavez et al., 2003) como para maduras (IGF-I) (Gleichmann et al., 2000) parece que es debida a mecanismos independientes de citocromo C. Quizás otros factores menos estudiados, como AIF, puedan tener un papel más relevante en la muerte apoptótica por K5 (ver figura 13). Este factor también podría estar implicado en la degradación del DNA que se observa en la muerte por K5, pudiendo ser un componente novedoso del proceso apoptótico caspasa-independiente (Slagsvold et al., 2003). Parece que la muerte por K5 en CGCs tendría diferentes vías de ejecución que funcionarían conjuntamente. Quizás uno de los elementos menos estudiados en esta muerte sean los factores de transcripción y su regulación en estos procesos. Uno de ellos, con un papel importante en las CGCs es el factor controlado por la vía JNK/p38, c-jun (Yamagishi et al., 2003). Podemos nombrar

otros factores que también están implicados en la muerte por K5 como por ejemplo el factor NP1 (*neuronal pentraxin 1*) uno de los factores que parece tener importancia en el control del programa génico de muerte (Enguita et al., 2005) y otros como las proteínas MEF2 (*myocyte enhancer factor 2*) que son degradados por las caspasas podrían tener un papel importante en el proceso apoptótico por K5 (Li et al., 2001b).

#### **2.4. Entre la vida y la muerte, el papel de ERK y Akt en las neuronas granulares de cerebelo.**

Hemos visto cómo funciona el modelo de las neuronas granulares de cerebelo para el estudio de la apoptosis y qué elementos juegan un papel clave en este proceso. También hemos comentado anteriormente (ver apartado 1.5) que en el proceso apoptótico hay una serie de puntos de control ejercido por la señalización intracelular que pueden modular los diferentes eventos del proceso apoptótico. En concreto, hemos resaltado el papel que pueden desempeñar en la supervivencia dos vías principalmente, la vía PI3-K/Akt y la vía MEK/ERK. Ahora veremos qué relación e implicación tienen estas dos vías en el modelo de muerte apoptótica en las neuronas granulares de cerebelo.

Diversos estudios muestran que la vía PI3-K/Akt juega un papel clave en la supervivencia de las CGCs en el proceso apoptótico desencadenado por la privación de potasio. Participa en modelos de neuroprotección tanto en células inmaduras como en maduras. En células inmaduras K25 o NMDA activan la vía PI3-K/Akt induciendo un efecto antiapoptótico frente a la privación de potasio (Lafon-Cazal et al., 2002), que es suficiente para mantener la supervivencia de las células a lo largo del tiempo (Xifro et al., 2005). En neuronas maduras, esta vía también juega un papel importante en la supervivencia. Así, en el modelo de neuroprotección por factores tróficos, como IGF-I, se produce una activación de Akt (D'Mello et al., 1997) que participa en diferentes etapas del proceso apoptótico con la finalidad de proteger a las células de la muerte. Así pues, esa activación de Akt puede inhibir la liberación del citocromo C, inhibiendo la activación de las caspasas-9 y -3. Además inhibe la activación de factores de transcripción implicados en el proceso apoptótico como miembros de la familia *forkhead* (FKHRL1), regulador transcripcional de la proteína pro-apoptótica Bim, principal efector de la vía intrínseca del programa de muerte (Linseman et al., 2002). Añadir a esto que no solo los factores tróficos implican la activación de esta vía y mecanismos asociados inhiben procesos apoptóticos. Otros como el cAMP o el litio

también implican la activación de Akt y mediante la fosforilación de GSK3 $\beta$  inhiben el proceso apoptótico, aunque para algunos, como el cAMP, la activación de Akt sea prescindible en su efecto neuroprotector (Chin and D'Mello, 2004; Chin et al., 2005).

Aunque muchos son los efectos que tienen los factores tróficos sobre las principales vías de transducción, uno de los más importantes como vemos es la activación de rutas alternativas que permitan a la célula sobrevivir. La que parece estar más empeñada en este proceso es la vía PI3-K/Akt (Zhang et al., 2000) aunque no siempre es la principal protagonista de este proceso, dando también protagonismo a la vía MEK/ERK. Aun así, esta vía plantea mucha más controversia y no está tan empeñada en participar en procesos de supervivencia, sino que también está implicada en procesos que pueden desencadenar la muerte de estas neuronas o dar paso a la activación de procesos que no implican directamente protección pero sí cambios que pueden ser de gran importancia para estas neuronas. Así pues un mismo estímulo puede activar ambas vías, Akt y ERK, siendo importantes para la supervivencia de las células, aunque el grado de implicación en procesos de supervivencia no es el mismo. Akt es imprescindible para la supervivencia (Zhang et al., 2000), pero la activación de ERK que también se produce está implicada en otros efectos necesarios para esa supervivencia. La función de la vía MEK/ERK puede ser diversa en función de diversos factores. Así, la activación de esta vía en modelos como la privación de potasio, o de toxicidad con MPP<sup>+</sup> o metilmercurio, puede inducir neuroprotección a través del factor de transcripción NF- $\kappa$ B e independiente de Akt (Chin et al., 2004). En un mismo modelo puede ejercer de neuroprotector como hemos visto y puede promover procesos de plasticidad (Watanabe et al., 2004) mediante la potenciación del crecimiento dendrítico con la activación de la vía MEK/ERK gracias a la activación de fosfolipasas que pueden ser importantes en procesos de supervivencia. Incluso en el mismo modelo, esta vía puede ser la ejecutora del daño neuronal. Factores tróficos que inducen supervivencia activando la vía de Akt en CGCs inhiben la vía MEK/ERK para promover también supervivencia como en el caso del factor GDF-15. La privación de potasio induce una activación retardada y prolongada en el tiempo de ERK que activa factores de transcripción como c-jun que estarían implicados en la muerte de las neuronas (Subramaniam et al., 2003). GDF-15 inhibe la activación de ERK y previene la generación de especies reactivas de oxígeno, importantes activadoras de la vía MEK/ERK. Los mismos autores han descrito que esa activación prolongada de la vía MEK/ERK en neuronas

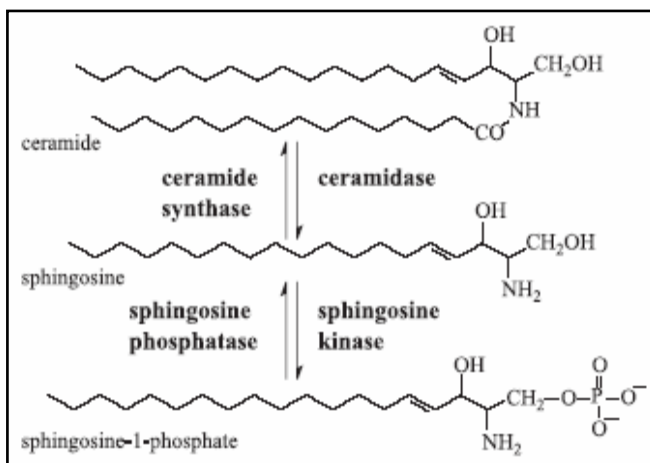


granulares deprivadas de potasio promueve la muerte celular produciendo daños en la membrana y condensación del núcleo siendo esa muerte independiente de la actividad caspasa-3 (Subramaniam et al., 2004). Estos datos sugieren que ERK sería un importante ejecutor de daño neuronal implicando otro tipo de mecanismos. Para completar aún más la controversia que genera esta vía en las CGCs, recientemente estos autores afirman que el IGF-I, modelo comentado anteriormente, activa tanto Akt como ERK inicialmente, pero en el tiempo es capaz de inhibir la activación de la misma vía ERK que se produce en la deprivación de potasio. Así, en las CGCs deprivadas de potasio se induce la activación de ERK retrasada en el tiempo y que es inhibida por IGF-I. Además, este IGF-I requiere la activación de ERK junto con Akt para promover su supervivencia (Subramaniam et al., 2005). Estamos frente a una activación dual de la misma vía que implica mecanismos distintos con finales distintos haciendo aún más complejo el entendimiento sobre las funciones que una misma vía de transducción puede tener en un mismo tipo celular y frente a estímulos que participan en los mismos procesos.

### 3. EL PAPEL DE LA CERAMIDA EN LA APTOSIS.

#### 3.1. Ceramida; síntesis, función y mecanismos en los que está implicada.

Metabolitos derivados de esfingolípidos, como la ceramida, la esfingosina, la esfingosina-1-fosfato (sphingosine-1-phosphate; S1P) (ver figura 14) y esfingolípidos complejos (gangliosidos) son reconocidos como moléculas capaces de regular una amplia variedad de procesos. Estudios con estos metabolitos han evidenciado su importancia como señalizadores, implicados en el control de proliferación, supervivencia, diferenciación y apoptosis. Nosotros centraremos nuestro estudio en la ceramida y su relación con el proceso de muerte apoptótica en general y en concreto en el modelo de las neuronas granulares de cerebelo.



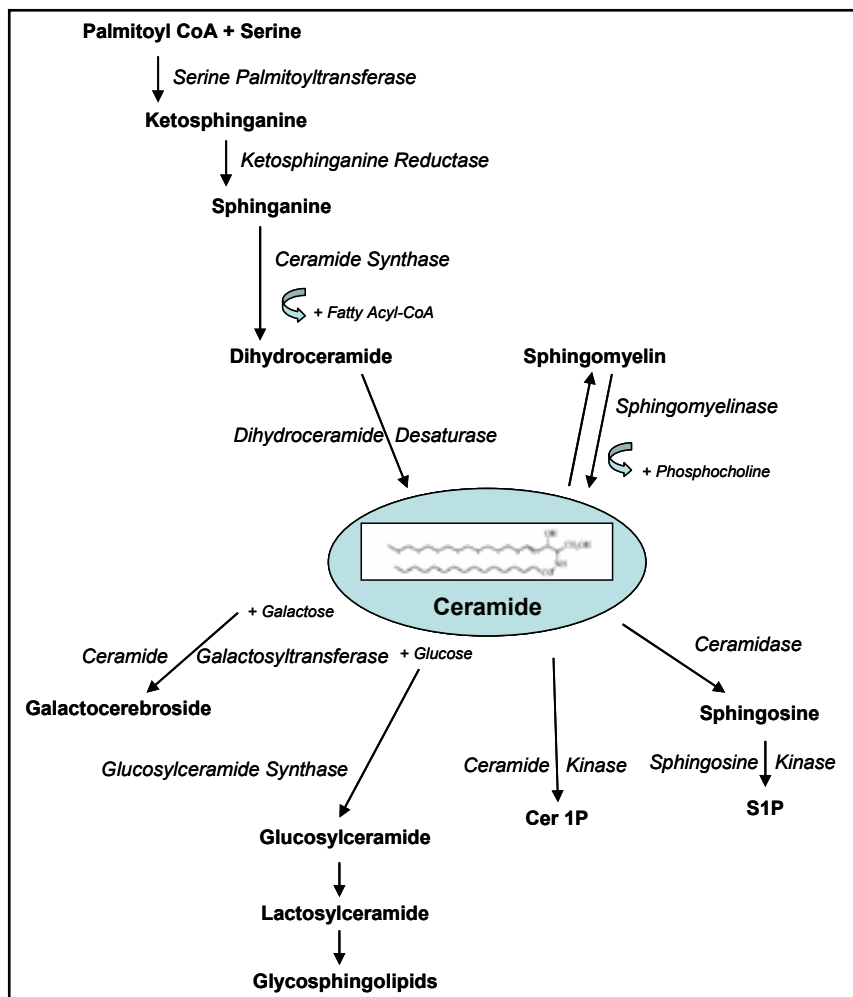
**Figura 14. Estructuras de la ceramida, esfingosina y esfingosina-1-fosfato.**

Estos metabolitos de esfingolípidos son interconvertibles por los enzimas presentados. S1P potencia el crecimiento y la supervivencia, mientras que la esfingosina y la ceramida están generalmente asociados con el arresto del ciclo y la muerte celular en diferentes tipos de células.

La ceramida es una molécula señalizadora que está implicada en diferentes procesos celulares como la proliferación, senescencia, diferenciación y paro del ciclo celular (Kolesnick, 1991; Hannun, 1994). Durante los últimos años numerosas evidencias han propuesto que la ceramida podría tener un papel más importante como regulador de la muerte apoptótica (Obeid et al., 1993; Kolesnick and Hannun, 1999)

La ceramida puede ser generada a partir de la síntesis *de novo* por la condensación de serina y palmitoil-coA la cual es convertida a dihidroceramida y posteriormente a ceramida (Merrill, Jr. and Jones, 1990) y/o por acción de unas enzimas llamadas esfingomielinasas (SMasas) (ver figura 15). Tres importantes tipos de SMasas se conocen, clasificadas de acuerdo con su pH óptimo y dependencia a cationes. La mejor caracterizada es la SMasa ácida del lisosoma

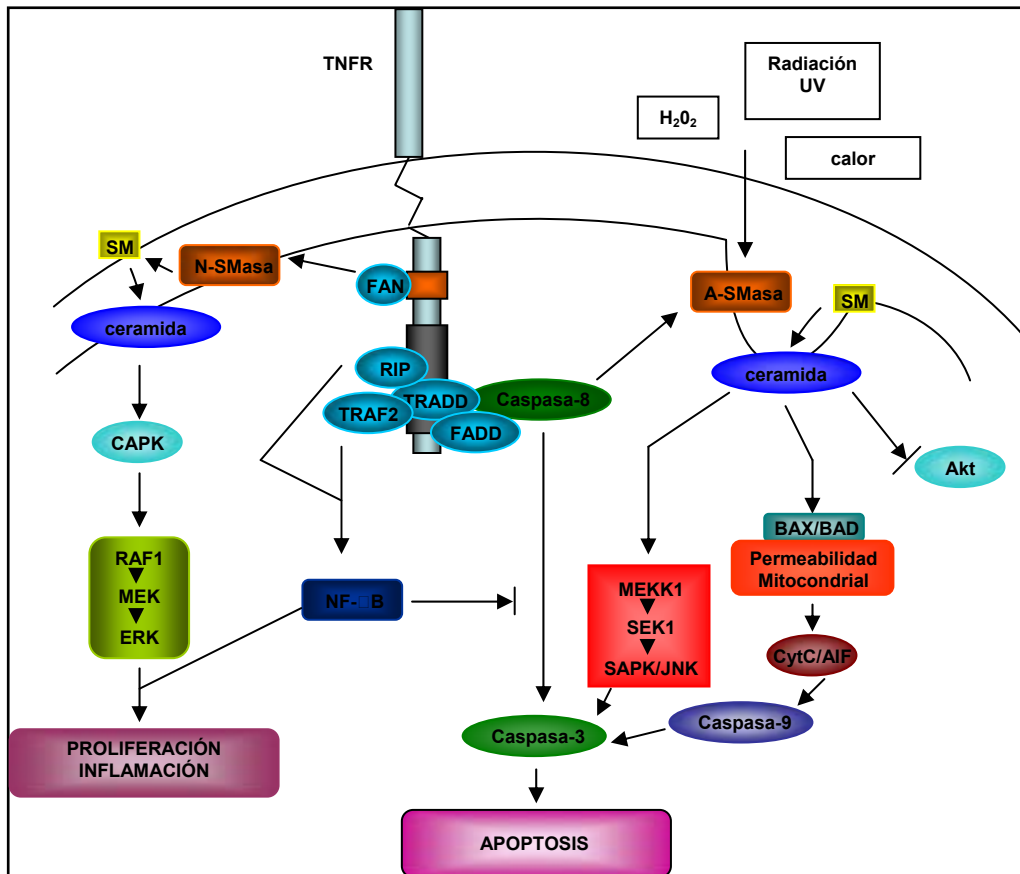
(A-SMasa), cuya deficiencia es la responsable de la enfermedad de Niemann-Pick A y B (Brady et al., 1966; Schuchman and Desnick, 2001). A-SMasa tiene una expresión ubicua y los niveles de expresión no cambian a lo largo del desarrollo. Por el contrario, la SMasa neutra,  $Mg^{2+}$  dependiente unida membrana o  $Mg^{2+}$  independiente citosólica, (N-SMasa) se ha encontrado a niveles muy altos en el cerebro y su expresión se incrementa durante el desarrollo neuronal (Spence and Burgess, 1978). Ninguna enfermedad se ha asociado a la deficiencia de la N-SMasa y además la señalización asociada a ésta está menos caracterizada que aquellas que implican a la A-SMasa. La tercera es la SMasa alcalina, ésta última



**Figura 15. Síntesis de esfingolípidos.** La síntesis *de novo* de esfingolípidos ocurre en la cara citosólica del retículo endoplasmático, y comienza por la condensación de serina y palmitoil-CoA. Posteriormente y tras un proceso de reducción, acetilación y desaturación se obtiene la ceramida (*N-acylsphingosine*). La ceramida puede transformarse en esfingomiélin, el mayor esfingolípidos, o convertirse hacia glicolípidos por la adición de oligosacáridos. El catabolismo de los esfingolípidos produce ceramida y la degradación de ésta produce otras moléculas basadas en la esfingosina. La ceramida, la esfingosina y la S1P se ha demostrado que actúan como segundos mensajeros, conservados desde las levaduras hasta el hombre. Esquema adaptado de Colombaioni and Garcia-Gil, 2004.

sólo presente en la mucosa del tracto gastrointestinal (Nilsson and Duan, 1999) y no parece participar en vías de señalización (Mathias et al., 1998). La síntesis *de novo* de ceramida es principalmente producida en la cara citosólica de la membrana del retículo endoplasmático mientras que la actividad SMasa se encuentra en lisosomas, vesículas de secreción y en microdominios específicos de la membrana plasmática llamados *rafts* lipídicos, implicados en importantes procesos celulares que desencadenan la activación de mecanismos moleculares de señalización intracelular (Brown and London, 1998) (ver figura 16). Un gran número de estímulos se han descrito que incrementan los niveles de ceramida intracelulares. Entre los inductores más prominentes está el factor de necrosis tumoral (TNF), el ligando Fas (FasL) y diversos agentes quimioterapéuticos (Testi, 1996; Hannun, 1996; Kolesnick and Kronke, 1998) (ver figura 16). En algunos casos estos incrementos implican síntesis *de novo*, aunque en la mayoría de ellos una o más de una SMasa celular está activa.

En el sistema nervioso, el papel de la ceramida en la muerte apoptótica es todavía hoy muy discutido y genera controversia. Se han encontrado niveles altos de ceramida en pacientes o modelos de enfermedades neurodegenerativas incluyendo el Alzheimer (Han et al., 2002), el Parkinson (Boka et al., 1994) y la isquemia cerebral (Herr et al., 1999). Algunos investigadores sugieren que estos incrementos en los niveles de ceramida sean la consecuencia de la muerte celular (Hofmann and Dixit, 1998), mientras que otros sugieren que la ceramida es un regulador central de la apoptosis. Los argumentos a favor de este papel principal se pueden dividir en tres evidencias; la primera, se acumula ceramida en células que no mueren, sino que inician un proceso de paro del ciclo celular y diferenciación o senescencia; la segunda, el tratamiento de células con inhibidores de caspasas previene de la apoptosis pero no de la acumulación de ceramida (Bose et al., 1998; Yoshimura et al., 1998; Chen et al., 1998b); la tercera, células que sobreexpresan Bcl-2 todavía acumulan ceramida en respuesta a TNF incluso aunque se produzca protección frente a la apoptosis (Dbaibo et al., 1997). Con estos datos vemos que la ceramida no está por debajo de efectores de la muerte apoptótica y que no solo está presente en células destinadas a morir. Así pues, la acumulación de ceramida podría actuar como señalizadora en multitud de situaciones de respuesta a estrés a través de una gran variedad de mecanismos, por si sola, o en combinación con otras señales, en los cuales la apoptosis puede ser un potencial resultado, como lo puede ser la diferenciación o la parada del ciclo celular.



**Figura 16. Mecanismos propuestos de inducción de apoptosis por TNF y estrés mediante la señalización vía esfingomielina.** Factores ambientales de estrés actúan directamente en las membranas y activando la SMasa ácida, generando ceramida e iniciando la señalización a través de la cascada SAPK/JNK. Esta cascada actuará sobre efectores por encima de la caspasa-3 que acabarán activándola, siendo ésta la efectora del proceso apoptótico. El receptor de TNF inicia el proceso a través de la formación del complejo de proteínas adaptadoras de dominios de muerte que posteriormente activará la SMasa ácida y los sistemas SAPK/JNK y Caspasa-3 para señalar la apoptosis. Efectos pro-inflamatorios y de proliferación están asociados a la activación a través de TNFR de la SMasa neutra que genera ceramida, la estimulación de kinasas específicas y la activación de la cascada ERK vía Raf-1. Además, TRADD

Aunque la ceramida sea el esfingolípido mejor caracterizado en neuronas, derivados glucosilados, las glucosilceramidas (GlcCer), también juegan papeles importantes como segundos mensajeros durante el desarrollo y nadie lo discute (Schwarz and Futerman, 1997). Las GlcCer se encuentran en niveles bajos en neuronas, ya que es un metabolito intermedio de la formación de grandes moléculas, los gangliósidos (GSLs). A pesar de ello, se han observado acumulaciones de GlcCer en el cerebro en patologías como la enfermedad de

Gaucher tipo 2 y 3, debido a defectos en el metabolismo de síntesis de los GSLs. Estos gangliósidos deben el nombre al lugar donde se descubrieron, los ganglios. La neurobiología de éstos se ha estudiado extensamente (Tettamanti and Riboni, 1993; Schwarz and Futerman, 1996). Recientes investigaciones apuntan que estos gangliósidos podrían interaccionar y/o modular dianas específicas en varias etapas del desarrollo. Numerosos estudios indican que la acumulación de ciertos gangliósidos, como GM2, podrían afectar la función y supervivencia neuronal (Wada et al., 2000). Uno de los gangliósidos estrella en el posible rol de éstos en procesos de desarrollo neuronal y que puede ser clasificado como un verdadero segundo mensajero, es el gangliósido GD3 y su papel en la regulación de procesos como la apoptosis. Recientemente ha adquirido importancia ya que el péptido  $\beta$ -amiloide induce la síntesis de GD3 que es necesaria para la apoptosis de neuronas corticales (Copani et al., 2002).

La variedad de señales que puede mediar la ceramida sugiere que la vía de la esfingomielina pueda estar asociada a una gran variedad de sistemas efectores, uno de ellos es una proteína fosfatasa dependiente de ceramida (*ceramide-dependent protein phosphatase*; CAPP) (Dobrowsky and Hannun, 1992) y una proteína quinasa dependiente de ceramida (*ceramide-dependent protein kinase*; CAPK) (Mathias et al., 1991), además de MAPK, PKC, fosfolipasas, factores de transcripción y caspasas (Cutler and Mattson, 2001) (ver figura 16), muchos de ellos importantes en la señalización en neuronas. En neuronas corticales, la ceramida disminuye los niveles de ERK y estimula otras vías como JNK y p38 induciendo muerte neuronal que sería caspasa-3 independiente (Willaime et al., 2001; Willaime-Morawek et al., 2003b) mientras que otros autores sugieren que en este mismo tipo celular, la ceramida estaría inhibiendo temporalmente la vía PI3K-Akt, defosforilando y activando factores proapoptóticos como GSK3- $\beta$  y BAD (Stoica et al., 2003), a través de la activación de proteínas kinasas de la familia de las MAPK como p38 y ERK1/2 (Stoica et al., 2005), induciendo muerte apoptótica por la vía intrínseca y caspasa-3 dependiente.

Añadiendo más controversia a la variedad de señales en las que puede estar implicada la ceramida y sus funciones, también se ha descrito que pueden implicar procesos de neuroprotección. En cultivos de neuronas simpáticas, un incremento en los niveles de ceramida intracelulares puede prevenir el proceso de muerte apoptótica inducida por la privación de NGF (Ito and Horigome, 1995). En neuronas hipocampales la ceramida protege frente a la excitotoxicidad, toxicidad

por el péptido  $\beta$ -amiloide y estrés oxidativo a través de la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (Goodman and Mattson, 1996).

El uso de ceramidas sintéticas de cadena corta ha sido una importante herramienta en el estudio de la señalización por ceramida. Estas ceramidas más polares como *C<sub>2</sub>-(N-acetyl-D-sphingosine)* y *C<sub>6</sub>-cermide-(N-hexanoyl-D-sphingosine)*, también llamadas C2-ceramida y C6-ceramida, cuando se añaden exógenamente reproducen algunos, no todos, los efectos biológicos de algunas citoquinas y señales ambientales de estrés (Hannun and Luberto, 2000) y causan muerte celular apoptótica concentración dependiente en cultivos primarios de neuronas (Movsesyan et al., 2002; Stoica et al., 2003; Willaime-Morawek et al., 2003b).

### **3.2. Y en las CGCs, ¿Qué pasa con la ceramida?**

Estudios previos en CGCs sugieren que la vía de la esfingomielina ceramida dependiente puede jugar un papel destacado en el desarrollo durante los periodos postnatales tempranos (Farrar et al., 1987; Guerrini et al., 1995). En este sentido, la ceramida induce muerte apoptótica en cultivos de CGCs inmaduras, siendo necesarias concentraciones más altas de ésta a lo largo del curso del cultivo (Taniwaki et al., 1999).

En el modelo de las CGCs se han descrito evidencias sugiriendo que la privación de potasio podría ser un estímulo que produce un incremento en la concentración intracelular de ceramida (Toman et al., 2002), que estimularía el metabolismo de los gangliósidos, en concreto los disialogangliósidos GD3 (Melchiorri et al., 2002), siendo éstos unos elementos pro-apoptóticos, elevando la expresión de receptores Fas y de su ligando Fas-L (Castiglione et al., 2004). De esta manera, se ha descrito que GD3 induce la permeabilidad de la mitocondria con la consiguiente liberación del citocromo C y la activación de caspasas (De Maria et al., 1997; De Maria et al., 1998; Rippo et al., 2000; Malisan and Testi, 1999; Kristal and Brown, 1999; Scorrano et al., 1999). Alternativamente, GD3 se ha observado que potencia la apoptosis previniendo la translocación nuclear del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, suprimiendo así la vía de supervivencia dependiente de este factor (Colell et al., 2001).

De acuerdo con esto, cuando las CGCs son expuestas a análogos solubles de la ceramida, C2-ceramida, éstas mueren por apoptosis de manera concentración

dependiente (Manev and Cagnoli, 1997; Centeno et al., 1998). Quizás, aunque el papel de las caspasas inducidas por diferentes tipos de estímulos ha sido estudiado en detalle en CGCs (D'Mello et al., 1998; Moran et al., 1999; Caballero-Benitez and Moran, 2003), existen pocos datos sobre la activación de las caspasas por ceramida en el modelo de las CGCs e incluso algunos de esos datos son contradictorios, como resultados recientes que implican la activación de la caspasa-3 en la muerte apoptótica inducida por C2-ceramida (Vaudry et al., 2003) con otros que sugieren que C2-ceramida induce apoptosis caspasa-3 independiente (Monti et al., 2001). Estas aparentes contradicciones nos permiten abrir una puerta en la que adentrarnos para ampliar el conocimiento de las preguntas sobre el modelo de las CGCs y de procesos como el desarrollo y la muerte apoptótica.



#### 4. EL 17- $\beta$ -ESTRADIOL COMO ESTRATEGIA DE NEUROPROTECCIÓN.

Durante los últimos años se han acumulado evidencias sugiriendo que la exposición a estrógenos disminuye el riesgo y retrasa el principio y desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y el Parkinson, así como potencian la recuperación frente a daños neurológicos traumáticos como la isquemia cerebral. Recientes estudios científicos muestran que no solo el estradiol exógeno disminuye la respuesta de varias formas de lesión sino que el cerebro por si solo regula su propia síntesis de estrógenos y la expresión de los receptores estrogénicos en los lugares de la lesión. Así pues, la visión de los estrógenos en la función nerviosa no puede quedar relegada a su estudio como regulador neuroendocrino y como hormona sexual responsable de comportamientos reproductivos, sino que debemos profundizar en su estudio, en el papel que juega como neuroprotector directo en respuesta a enfermedades neurodegenerativas y lesiones cerebrales. Los estrógenos deben ejercer este papel a través de diversas rutas, implicando a través de ellas procesos dependientes de los estrógenos como la supervivencia celular, el crecimiento axonal, las respuestas regenerativas, la potenciación de la señalización sináptica y de la neurogénesis. Algunos de los mecanismos que dan lugar a estos efectos son independientes de los definidos como receptores clásicos de los estrógenos y que implican receptores desconocidos en las membranas, modulaciones directas de receptores de neurotransmisores o las conocidas actividades antioxidantes de los estrógenos como veremos seguidamente.

Aunque hay evidencias que indican que esta exposición a estrógenos puede suprimir ciertas poblaciones de neuronas, el potencial clínico beneficioso del tratamiento con estrógenos para mejorar las funciones cognitivas puede ser más importante que los riesgos centrales o periféricos asociados. Se abren excitantes e importantes vías de investigación futuras sobre los efectos protectores de los estrógenos, incluyendo el ligando óptimo y las dosis que pueden ser usadas clínicamente para proporcionar beneficios sin comportar riesgos; modulación de neurotrofinas y expresión de receptores de éstas; interacción de estrógenos con cofactores y coactivadores regulados que acoplen a los receptores de estrógenos con la maquinaria transcripcional; interacciones de estrógenos con otros factores que promuevan supervivencia o regeneración; y finalmente, pensando en un futuro cada vez más inmediato, porque no los efectos potenciales de los estrógenos en la regeneración neuronal y la modulación de la selección de fenotipos de células madre para terapias reconstitutivas.

#### **4.1. El 17- $\beta$ -estradiol en terapias médicas: relación con enfermedades neurológicas.**

Los estrógenos, como vemos, desempeñan un papel muy importante en multitud de procesos neuronales, por lo que no es raro pensar que la alteración de sus niveles pueda implicarse en la etiología de algunas enfermedades neurológicas o psiquiátricas. Uno de los datos que mejor apoyan esta afirmación es la existencia de diferencias sexuales en la recuperación ante daños del tejido nervioso debido a traumatismos o accidentes cerebrovasculares. Estas diferencias se atribuyeron en un principio a diferencias sexuales en la conectividad y tamaño de los centros nerviosos. Sin embargo, parece ser más específico la presencia de diversos esteroides como el estradiol y la progesterona, en el sitio y en el momento del daño cerebral (Stein, 2001). Es más, algunos estudios clínicos han confirmado que las variaciones en los niveles plasmáticos de hormonas sexuales influyen en el riesgo a padecer un infarto cerebral; de esta manera, las mujeres premenopáusicas presentan una menor incidencia de infarto cerebral que los hombres de la misma edad. Esta protección se pierde cuando las mujeres entran en la menopausa y el riesgo de padecer infarto cerebral se iguala al de los hombres (McCullough and Hurn, 2003).

Por lo tanto, existen indicios de la relación entre los niveles de esteroides en sangre y el desarrollo de enfermedades nerviosas. La menopausia en las mujeres representa el caso más significativo de alteración en la concentración de esteroides en sangre. En los últimos años, varios estudios han sugerido un posible efecto beneficioso de la terapia hormonal sustitutiva con estrógenos, sobre distintos aspectos cognitivos en las mujeres postmenopáusicas, que no sufren enfermedades neurológicas. Sin embargo, los estudios de observación que sugerían que el estradiol podría disminuir el riesgo y/o retrasar la aparición de enfermedades neurodegenerativas (Paganini-Hill and Henderson, 1996; Kawas et al., 1997; Wise et al., 2001), no se han confirmado plenamente. De particular interés son los datos que hacen referencia a la enfermedad de Alzheimer: varios estudios han descrito que la terapia sustitutiva con estrógenos disminuye el riesgo de padecer dicha enfermedad (Tang et al., 1996; Yaffe et al., 1998; Costa et al., 1999). Sin embargo, esta terapia no parece mejorar los síntomas de la enfermedad una vez que ésta se ha manifestado, e incluso puede empeorarlos. Algo parecido ocurre con el infarto cerebral; aunque la mayoría de los estudios apuntan a que la

terapia sustitutiva puede disminuir el riesgo de padecer infartos (Paganini-Hill, 1995), recientemente se ha descrito todo lo contrario (Rossouw et al., 2002).

En contraste con esta situación tan confusa sobre el efecto de las hormonas esteroideas en el cerebro humano, el carácter beneficioso de los estrógenos en el SN es muy claro en los estudios con animales. Se sabe, desde hace muchos años, que el estradiol es un factor que promueve la supervivencia y diferenciación de diferentes poblaciones neuronales en cultivo, como células hipotalámicas (Chowen et al., 1992; Duenas et al., 1996), células de la amígdala (Arimatsu and Hatanaka, 1986) o células hipocámpales (Sudo et al., 1997). Además, se ha demostrado que el estradiol protege de la muerte neuronal inducida por multitud de agentes estresantes como los radicales libres (Sawada et al., 1998), el péptido  $\beta$ -amiloide (Bonfont et al., 1998), y aminoácidos excitadores como el glutamato (Sawada et al., 1998; Singer et al., 1999; Honda et al., 2000).

Las cualidades neuroprotectoras del estradiol también se han puesto de manifiesto en experimentos *in vivo*. Se ha demostrado que reduce el daño isquémico en ratas (Dubal et al., 1998; Wang et al., 1999) y además, la hormona protege a las neuronas del sistema dopaminérgico nigroestriatal de la toxina MPTP (Dluzen et al., 1996b; Dluzen et al., 1996a) o de la 6-hidroxidopamina (Dluzen, 1997). Un dato interesante es que en la mayoría de los modelos experimentales, el estradiol tiene efectos neuroprotectores si se administra antes del estímulo lesivo, pero no si se administra una vez que la lesión ha tenido lugar. Este fenómeno concuerda con los datos clínicos que muestran que la terapia sustitutiva con estrógenos no tiene efecto o es incluso perjudicial (Henderson et al., 2000; Mulnard et al., 2000) si se administra a individuos con enfermedades neurológicas, como el Alzheimer, ya diagnosticadas. Esto sugiere que los estrógenos podrían actuar más como factor preventivo que curativo en el desarrollo de enfermedades del sistema nervioso

#### **4.2. Efectos neurotróficos del 17- $\beta$ -estradiol.**

Parece pues, que este factor preventivo de los estrógenos puede estar relacionado con la función de éstos en el sistema nervioso, actuando como factor trófico directamente o influenciando a los diferentes factores tróficos existentes en el sistema nervioso.

Los factores tróficos como comentamos al principio de la introducción, promueven el crecimiento, la supervivencia y el mantenimiento de las neuronas. Los

estrógenos, con efectos neurotróficos, son capaces de interactuar con neurotrofinas. Las primeras acciones neurotróficas de los estrógenos en el crecimiento y supervivencia fueron demostradas usando cultivos organotípicos de hipotálamo en desarrollo, area preóptica y corteza cerebral (Toran-Allerand, 1976; Toran-Allerand et al., 1999). Estas acciones estrogénicas conservaban similitudes con las neurotrofinas. La colocalización generalizada de los receptores de estrógenos (ver 4.3.1.2) con los receptores de neurotrofinas (trks) se ha visto principalmente en neuronas de la corteza cerebral, hipotálamo, hipocampo y ganglios sensoriales. Esta co-expresión de los receptores nos ayuda a explicar el hecho de que el estradiol y las neurotrofinas generalmente parezcan ejercer una función de regulación recíproca una sobre la otra a niveles de transcripción génica ya descritos desde un principio de sus funciones (Toran-Allerand, 1976; Bothwell, 1996). Así, la regulación recíproca tan compleja entre los receptores de neurotrofinas y los de estrógenos, refuerza las ventajas de tener mecanismos de seguridad que converjan por encima y de forma cruzada con vías de señalización conocidas como las MAPK (Toran-Allerand, 1976).

Estrógenos y neurotrofinas pueden fosforilar rápidamente el receptor de estrógenos (Toran-Allerand et al., 1999). En líneas celulares tumorales neuronales y no neuronales, los efectos estrogénicos presumiblemente mediados por la membrana plasmática son muy rápidos, ocurriendo desde segundos hasta minutos; esta puede implicar una vía de señalización compartida entre estrógenos y factores de crecimiento para la proliferación celular y la fosforilación del receptor de estrógenos. Por ejemplo, en células tumorales de mamífero (MCF-7) el estradiol puede provocar una fosforilación de Src máxima a los 10 segundos (Migliaccio et al., 1996). Estas respuestas son similares a aquellas provocadas por factores de crecimiento mitogénicos como EGF, IGF-I y la insulina. Estos efectos del estradiol requieren solo un 10-20% de ocupación del receptor de estrógenos (Migliaccio et al., 1996), un nivel que coincide con la estimación del porcentaje de receptor de estrógenos presente en la membrana plasmática (Watson et al., 1995). Todavía no está claro si el receptor de estrógenos que media la propiedad de los estrógenos de promover el crecimiento en el cerebro en desarrollo son los receptores clásicos, ER $\alpha$  y ER $\beta$ , o quizás otros subtipos de receptores todavía no identificados (Toran-Allerand et al., 2002).

Observamos una gran variedad de mecanismos y acciones en los que están implicados los estrógenos que implican efectos neurotróficos a través de

cualquiera de sus receptores y que pueden ir acompañadas de la interacción con factores de crecimiento, como por ejemplo, una de las relaciones recientemente más estudiada; la relación entre el receptor de estrógeno ER- $\alpha$  con el receptor de IGF-I a través de las vías de señalización MAPK y PI3-K. Estas pueden representar un punto de convergencia usado por estos dos factores para modular de forma cooperativa el crecimiento neurítico, la plasticidad sináptica, ciertos eventos neuroendocrinos, el comportamiento reproductivo y la supervivencia neuronal (Mendez et al., 2005), aunque puede que no siempre sea necesaria dicha cooperación para que los estrógenos puedan desempeñar efectos neurotróficos a través de esas vías.

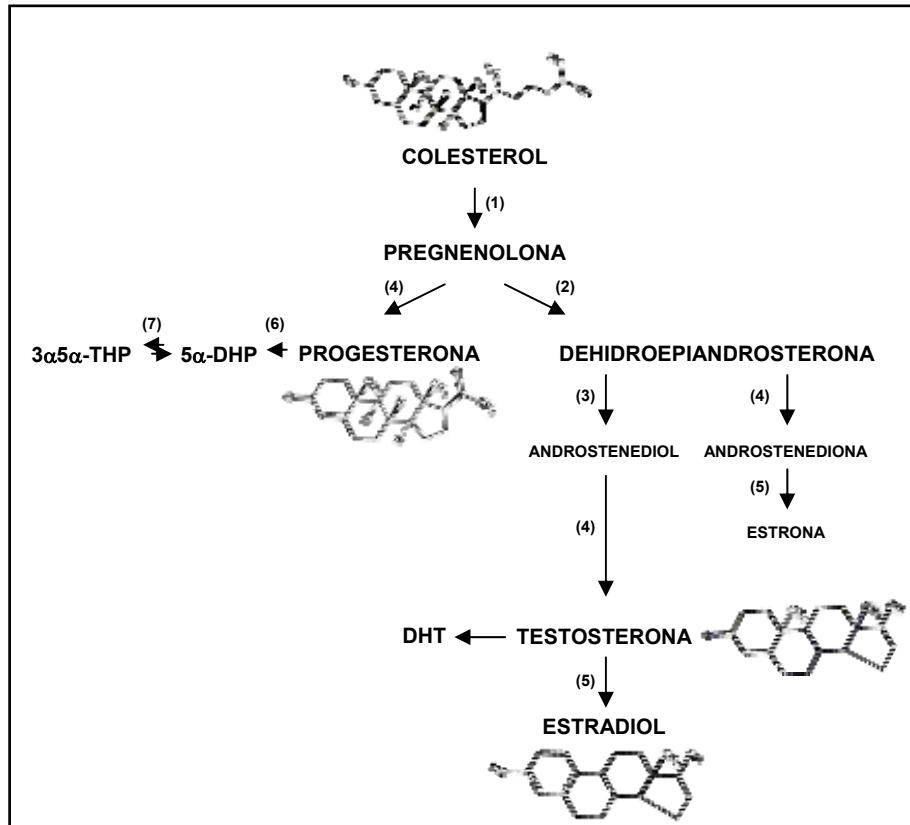
### **4.3. El estradiol como neuroprotector frente a procesos de muerte celular.**

#### **4.3.1. Síntesis de 17- $\beta$ -estradiol (E2).**

El cerebro es capaz de sintetizar esteroides a partir del colesterol y de metabolizar los esteroides hormonales en derivados que pueden ser potentes neuromoduladores. La existencia de una síntesis local de esteroides por el cerebro ha llevado a utilizar el término neuroesteroide y a hacer la distinción entre neuroesteroides y esteroides neuroactivos. Neuroesteroide es aquel esteroide que se sintetiza en el SN a partir del colesterol y que actúa localmente. Un esteroide neuroactivo es aquel esteroide, ya sea hormona o neuroesteroide, que actúa sobre el SN.

En diversos estudios de varios laboratorios han demostrado la presencia de enzimas esteroideogénicas funcionales en el SN. Éstas son capaces de sintetizar esteroides a partir del colesterol y de metabolizar los esteroides periféricos que alcanzan el SN por la circulación sanguínea, transformando, por ejemplo, la testosterona en estradiol. La figura 17 recoge un esquema de las principales rutas de síntesis de esteroides en el SN y de enzimas que participan en ellas. La presencia de enzimas sintetizadores o modificadores de esteroides es lo que hace del tejido nervioso un tejido esteroideogénico. Se acepta que las principales células esteroideogénicas en el SN son las células gliales (Zwain and Yen, 1999; Tsutsui et al., 2000). Sin embargo, en el sistema nervioso central (SNC), a parte de los oligodendrocitos y los astrocitos, las neuronas también presentan capacidad esteroideogénica. La P450c17, que

participa en la formación de dehidroepiandrosterona (DHEA) y la P450arom, o aromatasa, que cataliza la conversión de testosterona en estradiol, únicamente se ha encontrado en astrocitos y neuronas, no en oligodendrocitos. Aunque en condiciones normales, son las neuronas las que presentan una mayor capacidad de aromatización de la testosterona para producir estradiol. La figura 18 resume esta distribución enzimática en el SNC.



**Figura 17. Esquema general de la síntesis de esteroides en el sistema nervioso.** Los números entre paréntesis hacen referencia a los enzimas que llevan a cabo la reacción: (1): P450scc; (2): P450c17; (3): 17β-HSD; (4): 3β-HSD; (5): P450arom; (6): 5α-reductasa; (7): 3α-HSD. P450 side-chain cleavage (P450scc), 17α-hydroxylase/C17–20-lyase (P450c17), 3β-hydroxysteroid dehydrogenase (3β-HSD), 17β-hydroxysteroid dehydrogenase (17β-HSD), and cytochrome P450 aromatase (P450arom).

#### 4.3.2. Receptores y mecanismos de acción de los estrógenos.

El mecanismo clásico de acción de las hormonas sexuales en el SN es a través de la interacción con sus receptores intracelulares: los receptores de estrógeno, el receptor de andrógenos y el receptor de progesterona. Estos receptores son factores nucleares de transcripción, se unen al DNA y regulan la transcripción de genes específicos. Nosotros nos centraremos en el estudio de los receptores de estrógenos y los mecanismos asociados a ellos, ya que muchos de los efectos de los estrógenos durante el desarrollo del SNC están mediados por los receptores de estrógenos neuronales que producen cambios en la expresión de genes de respuesta a estrógenos, los cuales finalmente influyen en importantes procesos del desarrollo como proliferación neuronal, migración, formación de sinapsis y apoptosis.

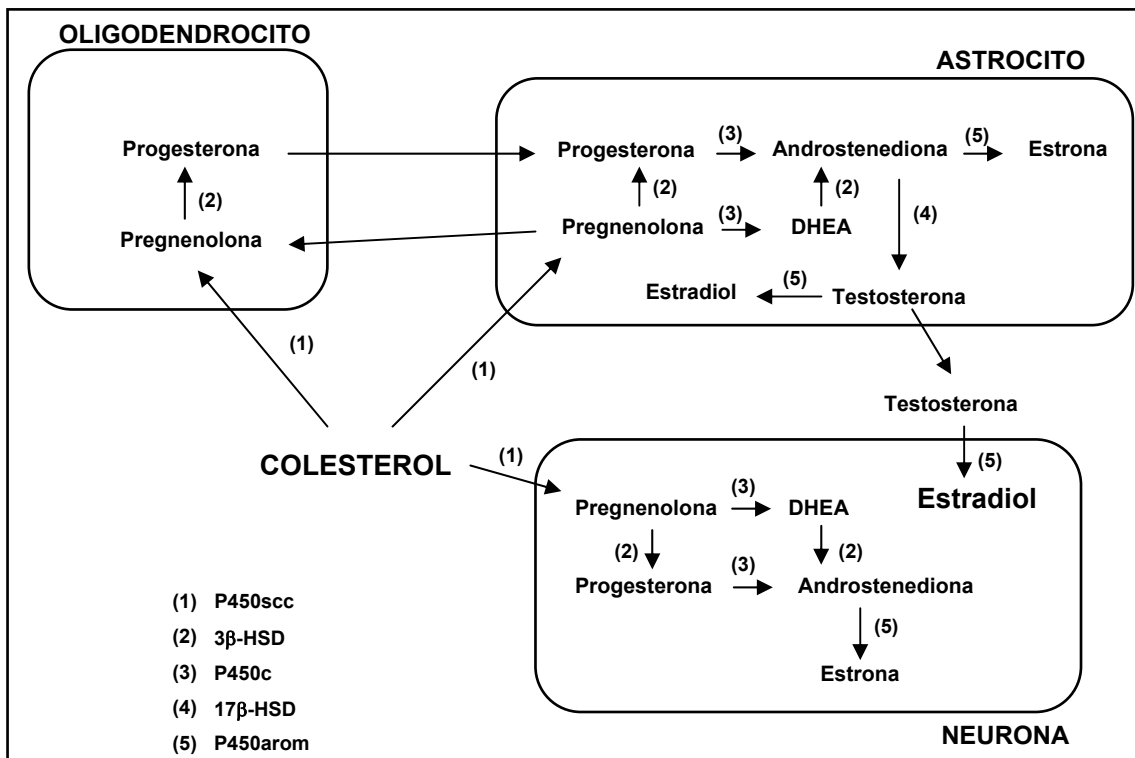
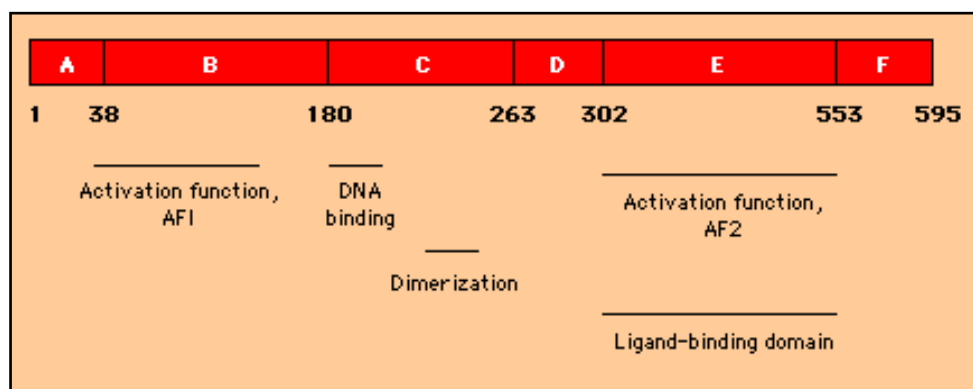


Figura 18. Participación de astrocitos, oligodendrocitos y neuronas en la síntesis de esteroides en cerebro de rata. Basado en Zwain and Yen, 1999.

Los receptores de estrógeno (ER) son miembros de la superfamilia esteroide/tiroide factores de transcripción activados por ligando que se unen como dímeros a secuencias específicas del DNA o dominios de unión al DNA (ver figura 19), conocidas como elementos de respuesta a estrógenos (ERE) y

así regulan la expresión de genes de respuesta a estrógenos (Evans, 1988). Las secuencias de regiones similares a estas pueden dar lugar a regiones ERE putativas, dando lugar a nuevos elementos de respuesta a estrógenos funcionales. Éstas se han encontrado en el cerebro, en promotores de múltiples genes que son esenciales para el funcionamiento normal del cerebro e implicados en diversas patologías, como por ejemplo en genes que codifican para BDNF (Sohrabji et al., 1995), TGF- $\alpha$  (El Ashry et al., 1996), Fos (Weisz and Rosales, 1990), Myc (Dubik and Shiu, 1992) y Bcl-2 (Teixeira et al., 1995), entre otras.



**Figura 19. Esquema de la estructura del receptor de estrógeno (ER).** De A a F representan diferentes dominios del ER. Los números indican los aminoácidos desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal.

Los ER también pueden influir en la transcripción de genes a través de interacciones con factores de transcripción con sitios de unión a regiones AP-1, como jun y fos (Paech et al., 1997). El clonaje de estos receptores ha revelado que hay al menos dos productos génicos primarios distintos, llamados ER $\alpha$  y ER $\beta$  (Koike et al., 1987; Kuiper et al., 1996; Mosselman et al., 1996). Ambos unen el estradiol con gran afinidad (Kd = 0.1 y 0.4nM, respectivamente) y activan la transcripción de genes de respuesta a estrógenos en construcciones expresadas en líneas celulares de mamífero (Kuiper et al., 1997; Kuiper et al., 1996). Aunque ER $\beta$  une estradiol y activa la transcripción de las construcciones con ERE, los niveles de activación son más bajos que los que se obtienen con ER $\alpha$  (Kuiper et al., 1996). Las respuestas de ER $\alpha$  y ER $\beta$  a los sitios AP-1 contrastan de manera interesante. Mientras que ER $\alpha$  estradiol dependiente activa la transcripción de genes a partir de elementos AP-1, con ER $\beta$ , el estradiol causa una inhibición de la transcripción (Paech et al., 1997). Estos



resultados sugieren una importante diferencia en las funciones reguladoras de genes de ER $\alpha$  y ER $\beta$ . Ambos receptores tienen un dominio de activación de función en el extremo N- terminal (AF-1) y un dominio de unión de ligando en el extremo C- terminal en el que se encuentra un segundo dominio de activación de función (AF-2; ver figura 19). *In vivo*, el receptor de estrógenos se encuentra en asociación con parte de un complejo protéico oligomérico que incluye proteínas como las hsp (*heat shock protein*) e inmunofilinas (Tsai and O'Malley, 1994). Una vez se une su ligando, o después de activación ligando-independiente, los ERs parcialmente se disocian del oligómero, forman homo- o heterodímeros (Cowley et al., 1997; Pettersson et al., 1997) que se unen a las secuencias específicas del DNA citadas anteriormente.

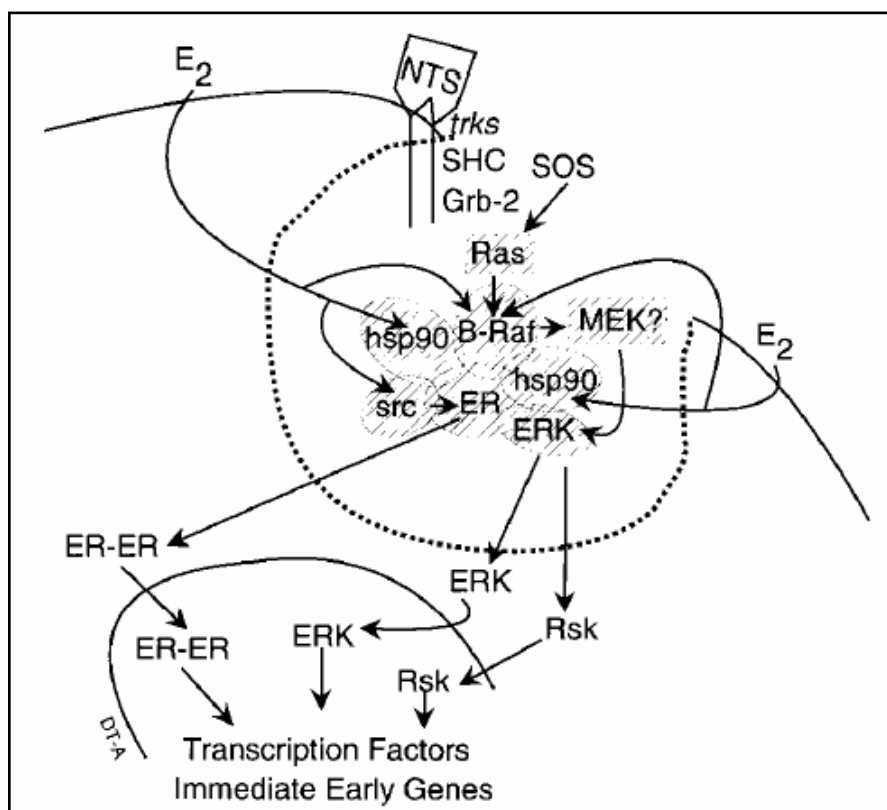
Los transcritos primarios tanto de ER $\alpha$  y de ER $\beta$  pueden dar lugar a *splicing* alternativo que dé lugar a la generación de múltiples isoformas de ambos receptores (Pfeffer et al., 1996; Petersen et al., 1998). El mRNA del ER $\beta$  se expresa principalmente en dos variantes de *splicing*, ER $\beta$ -1 y ER $\beta$ -2. En diferentes regiones del cerebro adulto, El mRNA de ER $\beta$ -1 se ha descrito que se expresa de 2 a 6 veces de forma más abundante que el mRNA de ER $\beta$ -2 (Petersen et al., 1998). Mientras que la distribución de ER $\alpha$  y ER $\beta$  pueden ser complementarias en el cerebro, hay diferencias específicas de región importantes en la expresión de los dos receptores (Shughrue et al., 1997). Estudios previos han centrado principalmente la localización de la expresión de ER $\alpha$  en hipotálamo, amígdala, y algunas neuronas esparcidas por el cerebro medio, hipocampo y corteza cerebral. ER $\beta$  se ha encontrado en hipotálamo e incluso más evidente en otras regiones como el cerebro medio, cerebelo, hipocampo y corteza cerebral. Aunque el cerebelo no ha sido tradicionalmente considerado una región del cerebro sensible a estrógenos, estudios previos han revelado que ERs se expresan en el cerebelo de roedores, principalmente en neuronas granulares (Fox, 1977), con variaciones significativas a lo largo del desarrollo (Belcher, 1999), indicando que los ERs pueden jugar un papel importante, todavía sin definir, en las vías de transducción de señales durante el desarrollo cerebelar. Además de las diferencias en la distribución de ambos receptores, existen diferencias en el impacto que causan cada uno de ellos en el sistema nervioso. Estudios con knockouts tanto de ER $\alpha$  como de ER $\beta$  muestran que la deficiencia del primero hace que los ratones macho sean incapaces de tener un comportamiento sexual normal (Ogawa et al., 1997),

(Ogawa et al., 1998) y las hembras no presentan ningún tipo de receptividad sexual (Rissman et al., 1997), mientras que el comportamiento sexual de los segundos parece ser esencialmente normal (Ogawa et al., 1999).

Además de los receptores nucleares, la existencia de receptores de membrana para estrógenos estaba descrita en pre-osteoclastos (Fiorelli et al., 1996), sugiriendo que los mecanismos por los que el E2 puede ejercer sus funciones no sean exclusivamente participar activamente en la regulación de la expresión génica. Recientemente aparecen numerosas y novedosas evidencias que implican esos ER en las membranas plasmáticas como punto de partida de importantes funciones. Estamos entrando en una nueva era del entendimiento de los mecanismos por los cuales las hormonas esteroideas, y en concreto los estrógenos, ejercen sus efectos en las células diana. Hasta la fecha, podemos encontrar que principalmente los mecanismos de acción de los estrógenos pueden ser principalmente genómicos, que implican cambios en la expresión génica y donde los principales protagonistas siempre han sido los receptores nucleares (nER).

El mecanismo genómico a través de esos receptores nucleares clásicos es el que hemos explicado anteriormente. Aunque está claro que los receptores nucleares traslocan entre el citoplasma y el núcleo, parece que el E2 también se une a receptores que pueden traslocar a la membrana plasmática (Pedram et al., 2002; Razandi et al., 2003b). El debate continúa sobre si esos receptores de membrana (mERs) son completamente indistinguibles de los nER excepto por su localización, si representan un nuevo receptor o si cambios estructurales los dirige formando un grupo propio a localizarlos en la membrana. Recientes publicaciones sobre la estructura de los mER mantiene el conflicto y aporta evidencias de posibles variantes de *splicing* de ER $\alpha$  (Figtree et al., 2003), sustituciones de aminoácidos (Razandi et al., 2003a), modificaciones post-traduccionales con ácidos grasos (Li et al., 2003) como posibles explicaciones de su direccionalidad a las membranas. Los mER se localizan frecuentemente en subdominios de la membrana plasmática ricos en caveolina, especialmente en células endoteliales, donde se ha estudiado en detalle (Zhu and Smart, 2003). En células en las que los niveles de caveolina son bajos o ausentes, como las neuronas, los mER se pueden asociar a otros subdominios de membrana especializados. Singh y colaboradores (Singh et al., 1999) documentaron la presencia de estos complejos en la corteza cerebral y

mostraron que entre otras proteínas, estaban presentes B-Raf, Hsp90, ER $\alpha$ , src (Nethrapalli et al., 2001) y ERK (Setalo, Jr. et al., 2002) (ver figura 20). Otro de los mecanismos que implica asociaciones de proteínas cerca de la membrana, son los que interaccionan con receptores de neurotrofinas, como IGF-IR, donde mediante adaptadores ER $\alpha$  activaría IGF-IR y este podría desencadenar las señales características de este tipo de receptores. Además de esto, ER $\alpha$  puede modular positivamente la actividad de proteínas kinasas como PKB, uniéndose a la subunidad reguladora de PI3-K, p85 (Mendez et al., 2003) y regular la actividad de GSK3 $\beta$  inhibiéndola (Cardona-Gomez et al.,



**Figura 20. Vía alternativa de señalización por estrógenos.** La ruta inicial que provocaría la rápida activación de ERK por estrógenos puede implicar la activación directa de un ER putativo formando parte de un complejo multimérico asociado con caveolas. Posteriormente a la exposición neuronal a estrógenos (E<sub>2</sub>), disociación de ER del complejo, debido a la fosforilación de src en tirosinas inducida por E<sub>2</sub>, el ER y hsp90, pueden provocar cambios conformacionales en el resto del complejo y disparar la activación secuencial de otras proteínas del complejo como B-Raf y ERK. Esquema propuesto y extraído de Toran-Allerand et al., 1999.

2004).

Este descubrimiento abre la puerta al entendimiento del papel de los complejos señalizadores de la membrana plasmática regulados por hormonas esteroideas

(signalosomas) formado por receptores, moléculas señalizadoras, segundos mensajeros y proteínas estructurales y de anclaje que conjuntamente facilitan respuestas rápidas en las células diana. Este tipo de mecanismo también genera cambios en la transcripción génica, dando lugar a lo que se conoce como mecanismo genómico indirecto.

Dentro del mecanismo genómico, podemos encontrar diferencias de tiempo en los efectos de los estrógenos, desde tiempos cortos (*short-term*) que van desde los milisegundos hasta minutos, a tiempos largos (*long-term*) que ocurren en algunas horas o incluso días después de producirse la exposición a estrógenos. También podemos encontrar tiempos intermedios, donde se incluyen aquellos eventos que ocurren en intervalos de pocas horas, comprendiendo acciones implicadas en procesos de entrecruzamiento entre respuestas genómicas y respuestas que no implican transcripción de nuevas moléculas de mRNA, en lo que conocemos como mecanismo no-genómico, donde se utiliza la maquinaria celular pre-sintetizada.

Estos efectos no-genómicos pueden ser diversos en función de las concentraciones de los estrógenos, así podemos encontrar que concentraciones del orden de nanomolar o inferiores potencian las corrientes inducidas por kainato en neuronas CA1 (Gu et al., 1999; Moss and Gu, 1999) o inhiben corrientes de calcio en neuronas estriatales (Mermelstein et al., 1996). Otro de los efectos no-genómicos implican concentraciones de estrógenos del orden de micromolar, y de otro mecanismo de acción más relacionado con la estructura de los esteroides que con el receptor nuclear. Se han observado efectos similares tanto en presencia de 17- $\beta$ -E2 como de 17- $\alpha$ -E2 los cuales están ampliamente descritos como neuroprotectores mediante este mecanismo en diversos modelos, como el descrito para neuroblastoma SK-N-SH en condiciones deprivadas de suero (Bishop and Simpkins, 1994; Green et al., 1997).

Existen numerosos estudios, todos ellos aportando datos de efectos neuroprotectores frente diversas condiciones y que a continuación detallaremos, viendo el amplio abanico de acción de los estrógenos, frente a mecanismos de muerte apoptótica, excitotoxicidad y necrosis, estrés oxidativo y daño neuronal asociado a enfermedades cardiovasculares o neurodegenerativas. Intentaremos asociar y encajar estos mecanismos de

acción de los estrógenos con los diferentes componentes celulares implicados en los grandes procesos comentados a lo largo de esta introducción, apoptosis, necrosis y vías de transducción de señales.

#### **4.3.3. ¿Cómo interviene el E2 en estos procesos de muerte celular? Relación de sus mecanismos de acción y las dianas moleculares implicadas en esos procesos.**

Existen variedad de estudios que han descrito que el E2 inhibe la muerte apoptótica incidiendo en diferentes tipos de dianas a través de sus diferentes mecanismos, regulando el proceso apoptótico impidiendo que las células mueran. Así pues, en miocitos regula negativamente el factor de transcripción NF- $\kappa$ B (Pelzer et al., 2000), en neuronas humanas activa un inhibidor de caspasas activas a través de su receptor sin necesidad de síntesis protéica (Zhang et al., 2001) que impide que continúe el proceso apoptótico, en neuronas de hipocampo a través de ER incrementa la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-X<sub>L</sub> mediante su unión a regiones ERE (Pike, 1999), en líneas celulares NT2, incrementa la expresión de otro gen anti-apoptótico, Bcl-2 frente a la muerte apoptótica inducida por estrés oxidativo (Singer et al., 1998), así como frente a procesos isquémicos a través de su ER $\beta$  (Dubal et al., 1999) e incluso sin necesidad de estímulos de muerte (García-Segura et al., 1998). En neuronas dopaminérgicas es mediante la unión de ER $\beta$  a sitios AP-1 que protege de la muerte apoptótica (Sawada et al., 2000) y dependiendo de la concentración los efectos pasan a ser independientes del receptor (Sawada and Shimohama, 2000). Estos efectos dependientes de la concentración también son evidentes en otros tipos celulares, neuronas de septum, corticales e hipocámpales, donde dependiendo del tipo de muerte, apoptosis o necrosis, concentraciones bajas de E2 a tiempos largos o concentraciones altas a tiempos cortos, tienen efectos antiapoptóticos o antinecróticos respectivamente (Harms et al., 2001). También en neuronas granulares de cerebelo, frente a la muerte apoptótica, el E2 puede actuar como neuroprotector mediante un mecanismo antioxidante (Dare et al., 2000; Harms et al., 2001). Por otro lado, las evidencias al respecto de efectos neuroprotectores del E2 en procesos de muerte neuronal necrótica, excitotóxica o estrés oxidativo mediante mecanismos que no implican a su estructura, comportan en la mayoría de los casos la activación de segundos mensajeros. Como por ejemplo, una sobreestimulación de receptores glutamatérgicos en rebanadas de hipocampo

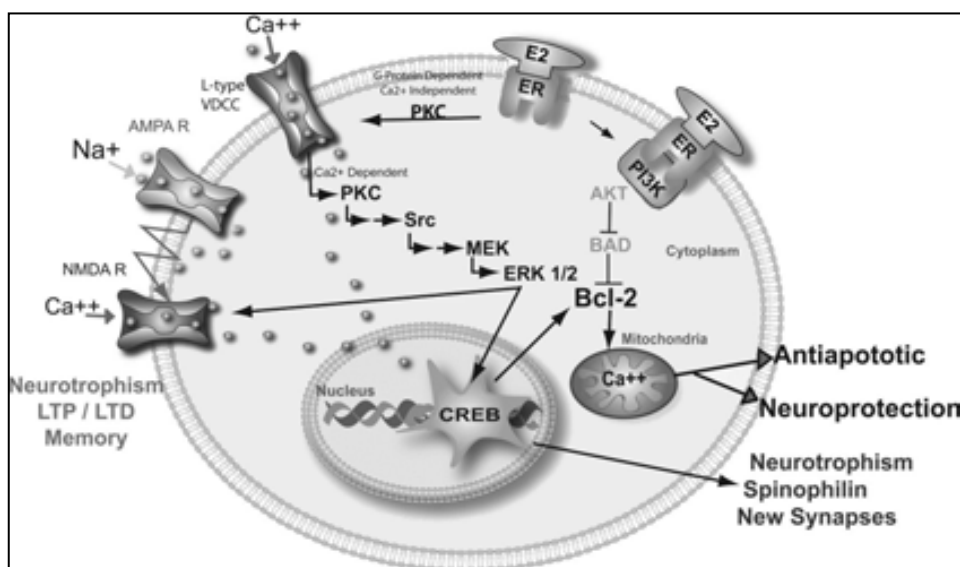
implican la activación de la vía Src-MAPK mediante mecanismos no-genómicos que modulan la actividad de los receptores NMDA (Bi et al., 2000), en neuronas corticales se activan tanto la vía MAPK (Singer et al., 1999) como PI3-K (Honda et al., 2000) que desencadenaran en la protección de estas. Aunque frente a este tipo de muerte, principalmente necrótica, el principal mecanismo de actuación es como comentamos anteriormente antioxidante (Goodman et al., 1996; Behl et al., 1997; Green et al., 1997; Bonnefont et al., 1998; Moosmann and Behl, 1999; Behl, 2000).

La existencia de estos mecanismos frente a estímulos concretos no implica que a cada uno se le asocie la protección frente a un tipo concreto de muerte. Se han descrito evidencias de protección frente a necrosis y apoptosis mediante un mismo mecanismo, como por ejemplo las acciones del E2 activando vías de transducción de señales como MAPK pudiendo unos casos activar proteínas inhibitoras de caspasas inhibiendo la muerte apoptótica (Zhang et al., 2001) o por otra parte proteger de la muerte excitotóxica modificando la expresión génica (Singer et al., 1999). También encontramos situaciones similares mediante el mecanismo no-genómico implicando acciones antioxidantes frente a muerte apoptótica y necrótica (Dare et al., 2000; Dluzen, 2000; Moosmann and Behl, 1999) y la acción de los receptores tanto se atribuye a la modificación de genes antiapoptóticos como a funciones implicadas en la inhibición de procesos excitotóxicos (Pike, 1999; Dubal et al., 1999; Campbell et al., 2001; Fournier et al., 2001; Belcher and Zsarnovszky, 2001). Así pues los mecanismos no parecen ser exclusivos de un tipo de muerte, sino que se pueden dar un mismo mecanismo para los dos tipos y varios mecanismos para un mismo tipo de muerte según el modelo de trabajo.

#### **4.3.4. Otras vías de señalización sustrato de los estrógenos.**

A pesar del papel predominante de las vías clásicas PI3-K/Akt y MEK/ERK en la señalización durante el desarrollo y en procesos de neuroprotección del cerebro, no podemos olvidarnos de la activación de otros sustratos señalizadores como el cAMP/ PKA, canales de  $Ca^{2+}$  o PKC que podrían actuar en paralelo o convergiendo en la vía de las MAPKs (Nabekura et al., 1986; Minami et al., 1990; Mobbs et al., 1991; Aronica et al., 1994; Gu et al., 1996; Zhou et al., 1996; Watters et al., 1997; Singh et al., 1999; Toran-Allerand et al., 1999; Qiu et al., 2003; Chaban et al., 2004). Estas vías de señalización intracelulares pueden modular receptores, canales y otros enzimas reguladores

así como varios factores de transcripción de los ya comentados (Weng et al., 1999; Deisseroth et al., 2003; Waltereit and Weller, 2003; Thomas and Huganir, 2004). Durante el último año han aparecido numerosas publicaciones, desvelando nuevas implicaciones de estos sustratos en los mecanismos de acción de los estrógenos, completando el puzzle de su señalización. Factores como CREB, activados por las vías principales ya estudiadas, puede ser activado por el E2 a través de mecanismos todavía no del todo claros y que impliquen nuevos elementos (ver figura 21), como receptores metabotrópicos de glutamato en cultivos de neuronas de hipocampo (Boulware et al., 2005), modulación de corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la regulación de sus canales, tanto en cultivos primarios de neuronas hipocampales y corticales (Lee et al., 2004; Wu et al., 2005) como en líneas neuronales (Sribnick et al., 2006), activación o inhibición de proteínas G en cultivos de neuronas cerebelares de rata (Belcher et al., 2005). Todos estos posibles nuevos mecanismos de acción de los estrógenos convergen en las principales vías de transducción y muestran la gran variedad de elementos que pueden estar regulados por los estrógenos y que todavía escapan a nuestro entendimiento, y el gran número de posibilidades de acción en el uso de los estrógenos como terapia de prevención o acción frente a enfermedades neurodegenerativas.



**Figura 21. Modelo esquemático de la iniciación de eventos que pueden dar lugar a fenómenos de neuroprotección inducidos por E2.** El estradiol se une al receptor de membrana. Puede interaccionar y activar PI3-K o proteínas G asociadas a receptores metabotrópicos modulando canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L. La entrada de calcio podría activar Src kinasa. Src activaría ERK induciendo su translocación al núcleo. ERK activada estimularía CREB que podría inducir genes implicados en procesos de neuroprotección o plasticidad sináptica. Esquema modificado a partir de Boulware et al., 2005 y Wu et al., 2005.

## II – OBJETIVOS

*[...]*  
*A Lestrigones y a Cíclopes*  
*o al airado Poseidón nunca temas,*  
*no hallarás tales seres en tu ruta*  
*si alto es tu pensamiento y limpia*  
*la emoción de tu espíritu y tu cuerpo.*  
*[...]*



## II – OBJETIVOS

En la presente tesis doctoral nos planteamos los siguientes objetivos:

1– Establecer los mecanismos moleculares implicados en la muerte apoptótica por C2-ceramida en cultivos primarios de CGCs de rata maduros.

1.1 – Caracterizar las caspasas implicadas en la muerte apoptótica.

1.2 – Establecer una relación entre las vías de muerte apoptótica y las principales vías de transducción de señales PI3-K/Akt y MEK/ERK.

2 – Explorar los posibles efectos neurotróficos y/o neuroprotectores de la hormona esteroidea, 17- $\beta$ -estradiol (E2), frente a los paradigmas de muerte apoptótica en el modelo de las CGCs de rata.

2.1 – Determinar posibles efectos neurotróficos y/o neuroprotectores del E2 en el desarrollo de las neuronas granulares de cerebelo de rata en cultivo.

2.2 – Determinar si las principales vías de transducción de señales, PI3-K/Akt y MEK/ERK, están implicadas en los diferentes mecanismos.

### III – MATERIALES Y MÉTODOS

*[...]  
Que sean muchas las mañanas de verano  
que, con que deleite, con que alegría!  
entrarás en un puerto que tus ojos ignoraban;  
que te puedas parar en mercados fenicios  
y comprar allí las buenas cosas que se exhiben.  
[...]*

### III – MATERIALES Y MÉTODOS

#### 1. MATERIAL BIOLÓGICO.

Los cultivos neuronales primarios de hipocampo y corteza cerebral se realizaron a partir de embriones (E) (E16-E18) de rata y los cultivos de neuronas granulares de cerebelo (CGCs) fueron obtenidos a partir de ratas de 7-8 días de edad postnatal (P7-P8). Las ratas pertenecían a la cepa OFA, eran proporcionadas por el Servicio de Estabulario de la propia Universitat Autònoma de Barcelona y seguían la normativa ética sobre manipulación de animales de experimentación y otros fines científicos.



**Figura 22. Fotografía de ratas de 8 días de edad postnatal (P8) de la cepa OFA.** Ratas como estas fueron utilizadas para el cultivo primario de neuronas granulares de cerebelo.

La línea celular MCF-7, procedente de un adenocarcinoma de pecho de mujer caucasiana de 69 años, fue proporcionada amablemente por el Dr. Miquel Saceda, investigador del Instituto de Neurociencias de la Universidad Miguel Hernández, Alicante. Por sus características, según la *European Collection of Cell Cultures* (ECACC), puede ser manipulada en laboratorios con nivel de seguridad P2, requisito que cumplen las salas de cultivo de la *Unitat de Bioquímica* del *Departament de Bioquímica i Biologia Molecular* de la *Facultat de Medicina* de la UAB, donde se realizó la presente tesis doctoral.

#### 2. METODOLOGÍA PARA LA OBTENCIÓN DE UN CULTIVO PRIMARIO DE NEURONAS DE RATA.

##### 2.1. Obtención de los cultivos primarios (Corticales, hipocampales y granulares de cerebelo).

###### 2.1.1. Reactivos.

Los reactivos químicos si no se indica lo contrario fueron de MERCK, PANREAC o FLUCKA.

### **2.1.2. Preparación de las soluciones necesarias para la elaboración del cultivo.**

Para la realización del cultivo primario mediante un método de disgregación enzimático - mecánico se necesitarán las siguientes soluciones que se filtrarán previamente a su uso:

- Solución 1: 50ml de tampón Krebs (de composición NaCl 120mM, KCl 4.8mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2mM,  $\text{NaHCO}_3$  25mM, Glucosa 14.3mM), 0.15g de albúmina bovina (BSA; Sigma) y 0.4ml de una solución 3.8% de  $\text{MgSO}_4$ .
- Solución 2: 10ml de la solución 1, 2.5mg de tripsina (Sigma).
- Solución 3: 10ml de la solución 1, 5.2mg de inhibidor de tripsina (Sigma), 0.8mg de Dnasa (Sigma), 0.1ml de la solución 3.8% de  $\text{MgSO}_4$ .
- Solución 4: 8.4ml de la solución 1, 1.6ml de la solución 3.
- Solución 5: 5ml de la solución 1, 40 $\mu\text{l}$  de la solución de 3.8% de  $\text{MgSO}_4$ , 6 $\mu\text{l}$  de una solución 1.2% de  $\text{CaCl}_2$ .

### **2.1.3. Composición de los medios de cultivo y del tampón fosfato.**

- Medio *Basal Eagle's Medium* (BME; Sigma) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FCS), 30mM de glucosa, 2mM de glutamina, 25.000u de penicilina y 25mg de estreptomina (GIBCO-Invitrogen).
- BME suplementado con 30mM de glucosa, 2mM de glutamina, 25.000u de penicilina y 25mg de estreptomina.
- BME suplementado con 5% de FCS y 5% de suero equino (HS; GIBCO), 30mM de glucosa, 2mM de glutamina, 25.000u de penicilina y 25mg de estreptomina.
- BME suplementado con 10% de HS, 30mM de glucosa, 2mM de glutamina, 25.000u de penicilina y 25mg de estreptomina.
- Medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado con 2% de suplemento B-27 (AO+; GIBCO), 30mM de glucosa, 2mM de glutamina, 25.000u de penicilina y 25mg de estreptomina.
- DMEM suplementado con 2% de B-27 sin antioxidantes (AO-; GIBCO), 30mM de glucosa, 2mM de glutamina, 25.000u de penicilina y 25mg de estreptomina.
- Tampón Fosfato (Phosphate Buffered Saline, PBS 1x; Sigma) suplementado con 30mM de glucosa, 100.000u de penicilina, 100mg de estreptomina.

#### **2.1.4. Disección, obtención y disgregación tisular.**

Los cultivos primarios de CGCs se realizaron a partir de ratas de 7-8 días de edad previa decapitación y extracción de los cerebelos. Las meninges fueron eliminadas para minimizar la contaminación por fibroblastos. Una vez los cerebelos están libres de meninges se trocean con un bisturí y se depositan en tampón Krebs (solución 1) previamente filtrada.

Los cultivos primarios de neuronas procedentes de diferentes regiones del cerebro de rata (hipocampo y corteza cerebral) se realizaron a partir de embriones de estadio E16-18, previa decapitación, extracción de los cerebros y separación de los hemisferios. Después de eliminar cuidadosamente las meninges, el hipocampo fue separado de la corteza cerebral después de haber descartado el estriado. Una vez separados cada uno de los tejidos se procesan por igual, la corteza y el hipocampo. Se trocean con un bisturí y se depositan en el tampón Krebs (solución 1) previamente filtrada.

Una vez obtenido el tejido (cerebelo, hipocampo o corteza) se procedió a la disgregación mecánico-enzimática. El tejido en el tampón Krebs se centrifuga a 1500 rpm durante unos 10-20 segundos (un pulso de centrifuga) y se elimina el sobrenadante. Se añade al precipitado una solución que contiene tripsina para disgregar enzimáticamente el tejido durante unos 10 minutos a 37°C (solución 2). Después de este tiempo se añade una solución diluída que contiene inhibidor de tripsina y DNasa (solución 4), inhibiendo la acción de la tripsina y degradando el DNA de las células que se hayan podido lisar por acción de la tripsina. Se vuelve a centrifugar a 1500 rpm para volver a eliminar el sobrenadante. Se añade una solución concentrada de inhibidor de tripsina y DNasa (solución 3) al pellet y se procede a la disgregación mecánica mediante, primeramente, una pipeta Pasteur de vidrio con la punta roma aspirando – soltando la suspensión celular unas 10 veces y posteriormente se hace pasar esta suspensión por una malla de nylon (con un diámetro de poro de 40µm) con la misma pipeta Pasteur otras 10 veces para conseguir una suspensión celular. Se repite este proceso dos veces.

La suspensión celular se transfiere a una solución con magnesio y calcio para restablecer la homeóstasis celular (solución 5) y se centrifuga a 1000 rpm durante 5 minutos. Se elimina el sobrenadante y se diluyen las células en el medio deseado suplementado para realizar el recuento celular mediante la exclusión del

colorante vital azul tripano (se diluye la suspensión celular con el azul tripano 1:1 para detectar las células muertas) en una cámara de Neubauer.

Las neuronas se sembraron a una densidad de  $300 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> en placas de cultivo que habían sido previamente tratadas, durante 24hr. a 37°C, con poli-L-lisina (10µg/ml para granulares y 50µg/ml para corticales e hipocampales; MW>300,000 Sigma). Las células se mantuvieron en el incubador con un 5% de CO<sub>2</sub> y a 37°C en una atmósfera saturada de humedad hasta el día de su utilización.

Al cabo de 20-24 horas (48h en el caso de las neuronas hipocampales y 7DIV en las corticales) se añade citosina-β-D-Arabinofuranoside (Ara-C; Sigma) 10µM a los cultivos que se mantuvieron en medio con suero como antimitótico impidiendo la proliferación de células gliales. A las células que se sembraron en medio con suplemento B-27 no es necesario ya que este medio no presenta los factores tróficos suficientes para la proliferación glial (Ricart and Fiszman, 2001). El cultivo de neuronas granulares de cerebelo presenta más de un 90% de neuronas (Rodriguez et al., 1991).

Los cultivos de CGCs se realizaron normalmente en un medio que contenía: DMEM + 2% de B-27, 30mM de glucosa, 2mM de glutamina, 25.000u de penicilina, 25mg de estreptomina y 25mM de KCl. La ausencia de suero se realiza para evitar que los componentes estrogénicos presentes en éste puedan enmascarar el posible efecto del tratamiento con estradiol. El rojo fenol utilizado como agente indicador de cambios en el pH del medio tiene una estructura molecular que le confiere ciertas propiedades y niveles de estrogenicidad importantes, según su reactividad en el medio de cultivo (MacGregor and Jordan, 1998). En nuestros experimentos evitaremos el uso de este componente. Las neuronas corticales se cultivaron en un medio que contenía BME suplementado con 5% de FCS y 5% de HS, 30mM de glucosa, 2mM de glutamina, 25.000u de penicilina y 25mg de estreptomina. A los 7DIV se realizó un cambio de medio de cultivo de composición similar al inicial pero careciendo de FCS y con un 10% de HS y 10µM Ara-C. Las neuronas hipocampales se cultivaron en un medio cuya composición era la siguiente: BME suplementado con 10% de FCS, 30mM de glucosa, 2mM de glutamina, 25.000u de penicilina y 25mg de estreptomina. A las 48hr. se añadió 10µM Ara-C y se realizó un cambio de medio de cultivo a los 7DIV.

### 3. MANTENIMIENTO Y SUBCULTIVO DE LA LÍNEA CELULAR MCF-7.

La línea celular de origen tumoral MCF-7 es una línea muy utilizada en el estudio de los mecanismos moleculares en los que están implicado los estrógenos, debido a que expresan ambos receptores clásicos de estrógenos, ER- $\alpha$  y ER- $\beta$ , así como el receptor de progesterona (PR). Está ampliamente descrita en la bibliografía como una línea celular de uso básico en el estudio con estrógenos.

Las células MCF-7 fueron mantenidas en cultivo en presencia de un medio completo (DMEM, 10% FCS, 2mM de glutamina, 25.000u de penicilina y 25mg de estreptomycin). Las células se mantuvieron en el incubador con un 5% de CO<sub>2</sub> y a 37°C en una atmósfera saturada de humedad (95%) hasta llegar a un nivel de confluencia del 70-80% con cambios de medio cada 2-3 días. A ese nivel de confluencia se subcultivaron para mantener la línea celular en crecimiento o se sembraron en diferentes placas de cultivo para la realización de los experimentos correspondientes.

Para ello se realizan dos lavados con PBS 1x para eliminar los restos de medio, se añade una solución de Tripsina al 0,25% y EDTA. Se incuba a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 1-2 min (proceso de tripsinización). Se para la acción de la tripsina añadiendo medio completo tres veces el volumen de la solución de tripsina. Se centrifuga la suspensión celular 5 min a 1000rpm y se resuspende el pellet en un volumen de medio conocido de medio completo. Se procede a realizar el recuento celular mediante la exclusión del colorante vital azul tripano (se diluye la suspensión celular con el azul tripano 1:1 para detectar las células muertas) en una cámara de Neubauer. Se sembraron  $2 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en las diferentes placas de cultivo en presencia de medio completo. Cinco días antes del tratamiento con estrógenos, se les cambió el medio de cultivo a un medio de cultivo DMEM sin rojo fenol suplementado con un 2,5% de FCS tratado con carbón activo (*Dextrane-coated charcoal stripped FCS*; DCC-FCS). Este medio se cambia cada dos días con idéntico medio fresco DMEM sin rojo fenol y 2,5% DCC-FCS. Al quinto día se realizaron los diferentes tratamientos.

El tratamiento con carbón activo del suero es un método necesario en el estudio con estrógenos. Como comentamos anteriormente, el suero contiene elevadas cantidades de agentes estrogénicos que podría falsear los efectos obtenidos en los diferentes experimentos. A diferencia de los cultivos primarios de CGCs, las células MCF-7 no pudieron ser cultivadas en ausencia de FCS y con B-27. Por

este motivo se utilizó una metodología basada en la absorción de los esteroides presentes en el suero mediante carbón activo para liberar a éste de estrógenos (Soto et al., 1997). El carbón vegetal (Sigma) fue lavado un par de veces con agua fría estéril inmediatamente antes de su uso. Se preparó una solución de un 5% de carbón vegetal – 0,5% dextrano T70 (Sigma) y en un volumen similar a las alícuotas de suero a procesar se centrifugaron a 100 X g durante 10 min. Se aspiraron los sobrenadantes, se añadieron las alícuotas de suero y se mezcló la suspensión. Esta mezcla de carbón-suero se mantuvo en suspensión y agitación a 4 ciclos/min y a 37°C durante 1hr. Al suspensión se centrifugó 2000 X g durante 20 min. El sobrenadante fue filtrado a través de un filtro con tamaño de poro de 0,45µm. Más del 99% de esteroides del suero son eliminados con este tratamiento, según Soto y colaboradores, mediante la determinación de <sup>3</sup>H-estradiol. La concentración de estradiol en el suero era menor de 0,01pg/mL medido por radioinmunoensayo.

#### **4. PARADIGMAS DE MUERTE NEURONAL Y DISEÑO EXPERIMENTAL.**

##### **4.1. Muerte apoptótica por privación de potasio.**

El modelo de las CGCs ya ha sido ampliamente descrito (Gallo et al., 1987a) y es utilizado en muchos trabajos, tanto para el estudio de la apoptosis como para el estudio de efectos y mecanismos moleculares antiapoptóticos. Para realizar el cultivo *in vitro*, las neuronas granulares de cerebelo necesitan elevadas concentraciones de potasio para sobrevivir (25mM por ejemplo; K25). Concentraciones fisiológicas de potasio en el medio de cultivo (5mM; K5) producen la muerte apoptótica (D'Mello et al., 1993).

Sólo durante los dos primeros días *in vitro* (DIV), parece que la supervivencia de las neuronas es independiente de las concentraciones extracelulares de potasio (Gallo et al., 1987a). En presencia de factores tróficos, como por ejemplo IGF-I (*Insulin-like growth factor*), BDNF (*Brain-derived neurotrophic factor*), NMDA (*N-methyl-D-aspartic*) o PACAP (*Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*) entre otros, las neuronas sobreviven (Galli et al., 1995, Kubo et al., 1995, Balász et al., 1998, Villalba et al., 1997)



La apoptosis por privación de potasio fue inducida en las CGCs tal y como se había descrito previamente (D'Mello et al., 1993). Se sembraron las CGCs directamente en medio K5 o en medio K25 y a los 6-7 DIV las células fueron lavadas una vez y cambiadas a un medio BME K5 libre de suero (o DMEM K5 libre de B-27) suplementado con 30mM de glucosa, 2mM de glutamina, 25.000u de penicilina y 25mg de estreptomycin. Los controles fueron tratados idénticamente pero mantenidas en los mismos medios suplementados con K25. La muerte celular debida a la apoptosis fue evaluada en los diferentes días después del cambio en la concentración de potasio (de K25 a K5).

#### **4.2. Muerte apoptótica por C2-ceramida.**

La ceramida es una molécula señalizadora de origen lipídico de la familia de los esfingolípidos que está implicada en la regulación de diferentes procesos celulares como proliferación, senescencia, diferenciación y ciclo celular (Kolesnick, 1991; Hannun, 1994). La ceramida parece estar implicada en la muerte apoptótica por privación de potasio ya que incrementos en los niveles de esta se han observado en el cambio a K5 (Toman et al., 2002). Por otra parte también se ha descrito que la muerte apoptótica por ceramida puede estar mediada por mecanismos que son independientes de aquellos que están implicados en la muerte apoptótica por privación de potasio (Monti et al., 2001). Por estos motivos fue interesante utilizar este paradigma de muerte apoptótica en nuestro modelo de neuronas granulares de cerebelo para su estudio. Éstas neuronas mueren por apoptosis de manera concentración y tiempo dependiente cuando son expuestas a C2-ceramida (Manev and Cagnoli, 1997; Centeno et al., 1998). Las CGCs se sembraron en medio BME + FCS ó DMEM + B27 y se trataron con C2-ceramida a los 7-8 DIV durante 24hr o 48hr tanto en medio con suero como medio sin suero.

#### **4.3. Muerte excitotóxica inducida por glutamato.**

Una sobrecarga de calcio intracelular, la consecuente generación de radicales libres y la depleción del metabolismo energético ha llevado a pensar que juegan papeles importantes en la muerte neuronal. Se ha observado muerte neuronal de características similares posterior a la exposición a aminoácidos excitadores como el glutamato en CGCs (Manev et al., 1989). Las características morfológicas del daño excitotóxico son similares con la muerte de tipo necrótico aunque existen estudios que aportan evidencias de que algunas neuronas podrían poner en

marcha mecanismos de muerte celular programada (Kure et al., 1991). En nuestro modelo de cultivo primario de neuronas granulares de cerebelo, la exposición a glutamato se realizó para la inducción de muerte excitotóxica según Ankarcona y cols. (Ankarcona et al., 1995). La sensibilidad a la muerte excitotóxica por glutamato de las neuronas granulares de cerebelo se incrementa con el número de días en cultivo (Frandsen and Schousboe, 1990).

Es por ello que se usaron cultivos de 8-9 DIV compuestos de >95% de neuronas (Vaccarino et al., 1987). La inducción de muerte excitotóxica en neuronas corticales se realizó según estaba descrito previamente por (Singer et al., 1999), a los 12DIV, durante 24hr.

#### **4.4. Muerte necrótica inducida por peróxido de hidrógeno.**

Tal y como comentábamos anteriormente, la muerte por excitotoxicidad inducida por glutamato tiene componentes que nos llevan a pensar en una tipología de muerte necrótica. Aún así como está descrito y ya hemos comentado, puede que este tipo de muerte excitotóxica ponga en marcha otra serie de mecanismos no enteramente necróticos. Es por ello que quisimos en nuestro modelo de las neuronas granulares de cerebelo tener otro paradigma de muerte que fuese claramente necrótico.

Para ello indujimos la muerte necrótica mediante el tratamiento con uno de los elementos que inducen este tipo de muerte, altas concentraciones de radicales libres, en este caso con peróxido de hidrógeno. La toxicidad por peróxido de hidrógeno se realizó en CGCs sembradas en medio de cultivo DMEM + B27 a los 7-8 DIV durante 24hr según (Behl et al., 1997).

#### **4.5. Tratamiento de los cultivos.**

En la mayoría de experimentos el 17- $\beta$ -estradiol ( $\beta$ -E2-soluble ciclodextrina-encapsulado; Sigma) fue disuelto en PBS o medio (concentración final de 10nM a 100 $\mu$ M) y añadido al cultivo celular 24hr (preincubación larga) o 3hr (preincubación corta) antes del inicio de la inducción de la muerte celular. El 17- $\alpha$ -Estradiol (isómero estructural biológicamente inactivo, Sigma;  $\alpha$ -E2) y el dietilstilbestrol (análogo del  $\beta$ -E2, Sigma; DES) fueron disueltos en etanol absoluto y añadidos al cultivo celular (10 $\mu$ M y 30 $\mu$ M) 24hr o 3hr antes del inicio de la inducción de muerte celular. El tratamiento durante 24hr con IGF-I (50ng/mL; R&D Systems) (D'Mello et

al., 1997) se utilizó como control de viabilidad y modelo de protección en neuronas granulares frente a la muerte apoptótica por privación de potasio.

Para estudios de inducción por E2 de vías de señalización en el modelo de muerte apoptótica por privación de potasio o ceramida, las CGCs en cultivo fueron sembradas en medio DMEM+B27. A los 7-8 DIV las células fueron privadas de B27 durante un mínimo de 2 horas. Pasado ese tiempo se procedió a los tratamientos según el experimento. Así pues las CGCs fueron tratadas con E2 (10nM), PPT (10nM; potente y selectivo agonista del receptor de estrógeno subtipo ER $\alpha$ ; Tocris; (Harris et al., 2002)), IGF-I (50ng/mL) o BDNF (50ng/mL). Los inhibidores utilizados fueron; de la vía MEK-ERK el PD98059 (50 $\mu$ M; Sigma), de la vía PI3K-Akt el LY294002 (20 $\mu$ M; Sigma), de la kinasa Src el PP2 (10 $\mu$ M; Alexis), el antagonista de gran afinidad del receptor de estrógenos ICI 182,780 (1 $\mu$ M; Tocris) y el análogo de IGF-I, el H-1356 (0,1 $\mu$ M; Bachem). Las células fueron pre-tratadas con los inhibidores durante 30 minutos antes de añadir los agentes neuroprotectores.

## **5. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD NEURONAL.**

### **5.1. Ensayo de la reducción del MTT, una medida de la actividad mitocondrial.**

La muerte neuronal fue cuantitativamente evaluada mediante el ensayo del MTT (Mosmann, 1983). El MTT (bromuro de 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio; Sigma) es una sal de tetrazolio hidrosoluble que se reduce a formazán, un compuesto de color lila insoluble en medio acuoso, al ser metabolizado por las deshidrogenasas mitocondriales de las células viables. El formazán solubilizado se puede medir espectrofotométricamente a una longitud de onda dual de 560nm y 620nm, correlacionando la absorbencia obtenida con la viabilidad celular. A pesar de que esta técnica permite detectar un porcentaje de células viables, no permite discriminar si las células muertas mueren por necrosis o apoptosis (Mosmann, 1983). A partir de una solución stock de MTT 5mg/ml diluida en agua destilada, se añade al cultivo (a una concentración final de 0.2mg/ml) durante 45 minutos. Se elimina el medio y se sustituye por igual volumen de DMSO para disolver el formazán formado. La medida espectrofotométrica se realizó en un lector de microplacas Labsystem Multiskan<sup>®</sup>.

### **5.2. Tinción de Hoechst 33258, observación del estado de la cromatina.**

El Hoechst 33258 o Bisbenzimidida (2-[4-hidroxifenil]-5-[4-metil-1-piperazinil]2,5-bis-1Hbenzimidazol; Molecular Probes) es un compuesto fluorescente que se une al DNA (Weisblum and Haenssler, 1974). Si la cromatina se encuentra condensada o fragmentada, tal como sucede en procesos de muerte celular por apoptosis, este compuesto se concentra en mayor proporción a causa de la condensación de las estructuras y la señal que se obtiene con el microscopio de fluorescencia es mucho más intensa. Por tanto, la observación de la condensación de la cromatina, una de las características morfológicas de la apoptosis, es un buen indicador del grado de muerte apoptótica presente en nuestros cultivos.

Los cultivos fueron lavados con TBS (Trizma Base 0,05 M; NaCl 0,15 M; H<sub>2</sub>O pH 7,3-7,4) pretemperado a 37°C y se fijaron con paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1 M pH 7,2 durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se lavó con TBS a 4°C dos veces y se añadió una solución de Hoechst 33258 1µg/mL. Se incubó 5 minutos y se realizaron dos lavados más con TBS a 4°C. Con unas gotas de medio de montaje *FluorSave™ Reagent* (Calbiochem), se procedió al montaje para su observación en el microscopio de fluorescencia (LEICA) a una longitud de onda de excitación/emisión de 350nm/460nm. Los núcleos laxos se consideraron neuronas viables, en cambio, los núcleos condensados y/o fragmentados se computaron como neuronas apoptóticas. Se contaron todas las células de un mínimo de 3 campos por cada pocillo (unas 600 células por cada condición de cada experimento). Los resultados se expresaron en forma de porcentaje de células apoptóticas versus el total de células contadas.

### **5.3. Tinción de Yoduro de Propidio, observación de la integridad membranal.**

Para evaluar la muerte de tipo necrótico utilizamos la tinción con yoduro de propidio (PI; Sigma). El PI es un colorante de ácidos nucleicos impermeable (Crissman et al., 1976). La incubación de las células con PI (10µM) antes de su fijación histológica nos permite poder detectar las células que no mantienen su integridad membranal (células positivas a PI, PI (+)) y que consideramos como necróticas.

El doble marcaje con Hoechst y con PI se realizó en estos casos para poder evaluar y comparar entre los dos tipos de muerte necrótico y apoptótico y poder así

discernir que el tipo de muerte que observábamos era necrótico y no un proceso apoptótico en fase avanzada.

Así pues, para observar el estado de los núcleos marcados (estado indirecto de las membranas celulares), se realizó una tinción de Hoechst (ver apartado 4.3 de materiales y métodos). Posteriormente se procedió a su observación en el microscopio de fluorescencia (LEICA) a una longitud de onda de excitación/emisión de 350nm/460nm para el Hoechst y 535nm/617nm para el PI.

## **6. FRAGMENTACIÓN DEL DNA.**

Un componente fundamental de las características de la muerte apoptótica es la degradación del DNA genómico en fragmentos oligonucleosomales (Jarvis et al., 1994). Este fenómeno nos permite utilizar el DNA como un marcador de apoptosis. Así pues se podrá visualizar un patrón de escalera de fragmentos oligonucleosomales característicos de la muerte apoptótica cuando este DNA pase por una electroforesis en gel de agarosa.

Para esta determinación, los cultivos fueron lisados con tampón de lisis (5mM Tris Base pH 7'5, 200mM EDTA, 0'5% Tritón X-100). Las células fueron lavadas con PBS (4°C), se aplicó el tampón de lisis y se dejó el lisado 20 minutos en hielo (4°C). Se centrifugó a 20.000g durante 30 minutos a 4°C. Acto seguido se separó el sobrenadante del precipitado (o pellet) y al sobrenadante se le añadió Proteinasa K 200µg/mL (sigma) y al pellet se le añadió tampón de lisis y Proteinasa K 200µg/mL. Se dejó a 60°C durante 1h 30min y en la estufa a 37°C toda la noche. Después de esto se procedió a la extracción con fenol : cloroformo (1:1) y cloroformo : isoamyl (24:1). Posteriormente se le añadió a la fase acuosa acetato potásico 5M y etanol absoluto a -20°C. Se guardaron las muestras a -20°C toda la noche. Al día siguiente se centrifugaron las muestras 10 minutos a 10.000rpms 4°C. El pellet se resuspendió en tampón TE/Rnasa (Tris-HCl 10mM pH 7'5 EDTA 1mM, Rnasa 20µg/mL) durante 1h a 37°C y después de ello el DNA se separó en un gel de agarosa al 1% en tampón TAE (Tris 0'8mM ácido acético 0'1% EDTA 20µM) teñidos con bromuro de etidio (0,5µg/mL; sigma) y visualizados bajo luz UV.

## **7. IMMUNOCITOQUÍMICA.**

Las inmunohistoquímicas se realizaron en cultivos de 7DIV de CGCs y 12DIV en el caso de corticales e hipocampales sembradas en cámaras pre-tratadas con poli-D-

Lisina (BIOCOAT<sup>®</sup> cellware poly-D-lysine 8-well CultureSlides, BECTON-DICKINSON) para microscopía. Las células se lavaron con PBS atemperado a 37°C y se incubaron con paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0.1M pH 7.2, durante 1h a 4°C. Se lavaron las placas dos veces con TBS-Tween 0.1% (TBS-T; Tris 20mM, NaCl 137mM, HCl 1M, pH 7.6, 0.1% Tween) a temperatura ambiente y se bloqueó con tampón de bloqueo (TBS-T, 5% FCS, 3% BSA) durante 45-60 min. a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron las células con el anticuerpo primario anti-caspasa-3 activa, anti-caspasa-9 activa, anti-c-myc (Cell Signalling Technology), anti-ER- $\alpha$  (SRA-1010, sc-542; StressGen Biotechnologies Corp., Santa Cruz Biotechnology Inc.), anti-ER- $\beta$  (sc-8974, H-150; Santa Cruz Biotechnology Inc.) y anti-MAP-2 (MAB 3418 MsX; Chemicon internacional) diluido 1:100 en TBS-T 5% BSA, durante 24h. a 4°C. Se hicieron dos lavados con TBS-T y se incubaron con el anticuerpo secundario (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) conjugado con fluoresceína (FITC) o con Texas Red diluido 1:500 en TBS-T 5% BSA, durante 1h. Después de dos lavados con TBS-T, se hizo un último lavado con TBS y se montaron las preparaciones con medio de montaje (VECTASHIELD, VECTOR). Se observaron las preparaciones bajo un microscopio de fluorescencia (LEICA) a una longitud de onda de 492nm o 596nm.

### **8. ANÁLISIS DE LA LOCALIZACIÓN DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS ER- $\alpha$ EN CGCs MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL.**

Las CGCs fueron sembradas en cámaras pre-tratadas con poli-D-Lisina (BIOCOAT<sup>®</sup> cellware poly-D-lysine 8-well CultureSlides, BECTON-DICKINSON) para microscopía. A los 7DIV las CGCs fueron lavadas con PBS frío (4°C) y fijadas con 4% paraformaldehído en PBS durante 1 h a 4°C. después de lavarlas, las células fueron incubadas en PBS - Glicina 0,1M durante 10 min para bloquear los grupos aldehído generados por el fijador, posteriormente lavadas con TBS-T y permeabilizadas con TBS-T + Triton X-100 0,1%. Después de lavar, se bloqueó a 4°C durante 1 h en TBS-T, 0,5% suero normal de cabra seguido de una incubación con Rnasa A (1mg/mL) durante 18 min a 37°C. Después de lavar dos veces, las células fueron incubadas toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario anti-ER- $\alpha$  (sc-542; Santa Cruz Biotechnology Inc.) diluido 1:100 en TBS-T, 0,5% suero de cabra. Las células fueron lavadas con TBS-T e incubadas durante 1h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario apropiado conjugado con fluoresceína (1:500; AlexaFluor<sup>®</sup>488 de Molecular Probes) en tampón de bloqueo. Después de lavar con TBS-T, las células fueron teñidas con yoduro de propidio (20 $\mu$ M) durante 2 min. Después de lavar un par de veces con TBS-T, se montaron las preparaciones con medio de montaje *FluorSave<sup>TM</sup> Reagent* y cells

se observaron en un microscopio confocal (LEICA). La localización del receptor de estrógenos ER- $\alpha$  se demostró por la aparición de fluorescencia verde no solapada con fluorescencia roja perteneciente al núcleo.

## 9. WESTERN BLOT.

El término *blotting* se refiere a la transferencia de muestras biológicas de un gel a una membrana y su subsiguiente detección en la superficie de la membrana. El *western blot* (también llamado inmunoblot porque un anticuerpo es usado específicamente para detectar su antígeno) fue introducido por (Towbin et al., 1979) en 1979 y actualmente es una técnica de rutina para el análisis de proteínas. La especificidad de interacción entre el complejo anticuerpo-antígeno permite a una simple proteína ser identificada entre una compleja mezcla de gran cantidad de proteínas.

### 9.1. Reactivos y fórmulas de los tampones utilizados.

Tampón de lisis protéica: 20mM Tris pH 7.5, 1% NP-40, 150mM NaCl y 5mM EDTA suplementado con inhibidores de proteasas (1mM PMSF, 10 $\mu$ g/ml Aprotinine, 20 $\mu$ g/ml Leupeptine, 1mM Na<sub>2</sub>VO<sub>4</sub>).

Tampón de carga 4X (tampón Laemmli-SDS): 250mM Tris-HCl pH 6.8, 5%(p/v) SDS, 2.5% glicerol, 1.4M  $\beta$ -mercaptoetanol y 0,01% (p/v) de azul de bromofenol.

Tampón de electroforesis: 25mM Tris 192mM glicina, 20%SDS.

Tampón de Transferencia: 25mM Tris 192mM glicina, 20% metanol.

Tampón Tris Salino (TBS): 20mM Tris 137mM NaCl pH 7.6.

TBS-Tween (TBS-T): TBS con 0.1% de Tween 20.

Tampón de bloqueo: TBS-T con 5% de albúmina bovina (BSA), TBS-T con 5% de leche en polvo o PBS-T con blotto (2% Leche en polvo y 0.5% BSA).

Anticuerpos primarios: anti-fosfo p44/42 MAP kinasa (Thr202/Tyr204; #9101), anti-MAP kinasa (#9102), anti-fosfo Akt (Ser473; #9271), anti-Akt (#9272), anti-fosfo CREB (Ser133; #9191), anti-CREB (#9192), anti-caspasa-3 activa (Asp175; #9661), anti-caspasa-9 activa (Asp353; #9507) y anti-fosfo Src (Tyr416; #2101) de Cell Signalling; anti-caspasa-1, -2, -3, -8, -9, Poly (ADP-ribosa) polimerasa (PARP),

Citocromo C, IGF-IR $\beta$  (sc-713), ER- $\alpha$  (sc-542), ER- $\beta$  (sc-8974) y Histona H1 (sc-8616, C-17) de Santa Cruz Biotechnology Inc., anti-Ras (610001) y anti- $\beta$ -tubulina (556321) de BD Biosciences, anti-MAP-2 (MAB3418) de Chemicon International Inc., anti-fosfotirosinas (clon 4G10, 05-321) de Upstate, anti-ER- $\alpha$  (SRA-1010) de StressGen Biotechnologies, anti-Sinaptotagmina 1 (clon 41.1, 105011) de Synaptics systems, anti-v-Src (clon 327, S1686; Sigma) y anti-GAPDH (clon 6C5, 4300; Ambion Inc).

Anticuerpos secundarios: Anticuerpo policlonal anti-rabbit peroxidasa conjugado (554021) y anticuerpo polioclonal anti-mouse peroxidasa conjugado (554002) de BD Biosciences.

### **9.2. Procesamiento por western blot.**

Una vez tratadas las CGCs se realizó un lavado con tampón PBS a 4°C, se lisaron y posteriormente se centrifugaron las muestras a 20.000 X g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante contiene las proteínas solubles y el precipitado los restos de células no lisadas y membranas del resto. Seguidamente se procedió a la determinación de la concentración de proteína mediante el método de Bradford (Bradford, 1976) y se realizaron los cálculos oportunos para preparar las muestras a una concentración 1 $\mu$ g/ $\mu$ L en tampón Laemmli-SDS. Seguidamente se sonicaron brevemente cada una de las muestras y se dejaron a 95°C durante 5 minutos.

Las proteínas se separaron mediante una electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (Poly Acrilamide Gel Electrophoresis-Sodium Dodecyl Sulfate; PAGE-SDS). La densidad de los geles fue variable, del 8%, 10%, 12% o 15% según la proteína a estudiar. En cada carril se cargó la misma cantidad de proteína de entre 20 y 40  $\mu$ g, según la proteína a detectar y se cargó un estándar de proteína pre-teñido con colorante azul (*Precision Plus Protein<sup>TM</sup> Standard All Blue*, Bio-Rad). La electroforesis se realizó a una intensidad de corriente constante de aproximadamente 80mA.

Una vez finalizada la electroforesis se transfirieron las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa (Amersham farmacia biotech) o PVDF (*Polyvinylidene difluoride, Hybond-P PVDF Membrana*; Amersham farmacia biotech) activada con metanol. La transferencia se realizó a 90V durante una hora y media o a 50V durante toda la noche a 4°C. Se lavaron las membranas con agua y TBS-T y se les aplicó el tampón de bloqueo durante una hora. Posteriormente se



incubaron con el anticuerpo primario pertinente (diluido en tampón de bloqueo) durante un mínimo de 4 horas o toda la noche a 4°C en agitación. Pasado ese tiempo, se lavaron las membranas abundantemente con TBS-T, dos lavados de 5 minutos y dos lavados de 10 minutos para después incubar la membrana durante una hora con el anticuerpo secundario correspondiente en tampón de bloqueo, a temperatura ambiente; y se repitieron los lavados con TBS-T.

Las proteínas se detectaron por quimioluminiscencia (*ECL<sup>TM</sup> Western Blotting Detection Reagent*; Amersham Pharmacia). La cuantificación de las bandas se hizo densitometrando las bandas a través del programa *Scion Image* (Scion Corporation). Una carga igual de proteínas en cada carril se verificó a través de la visualización de las formas totales de las proteínas estudiadas o por una tinción de Ponceau S (sigma) de la membrana al finalizar la transferencia.

#### **10. FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR PARA LA OBTENCIÓN DE UNA FRACCIÓN MITOCONDRIAL.**

Los cultivos se lavaron dos veces con PBS a 37°C y fueron homogeneizados con tampón de homogeneización (10mM Tris-HCl, 0.3mM ácido ethylenebis (oxyethylenitrilo)-tetra-acético (EGTA; sigma) y 0.25M sacarosa, pH 7.4, en presencia de 1µM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF; Applichem), 2 µg/ml aprotinina (sigma), 1µg/ml pepstatina (sigma) y 5 µg/ml leupeptina (sigma). El homogenado fue centrifugado a 5,000 X g durante 10 min y el sobrenadante resultante fue centrifugado a 14,500 X g durante 30 min. a 4°C para obtener las fracciones mitocondrial (pellet) y citosólica. Los pellets mitocondriales fueron lavados y resuspendidos en tampón de homogeneización.

Tanto para la fracción mitocondrial como para la fracción citosólica se procedió a la determinación de la concentración de proteína por el método de Bradford (Bradford, 1976) y posterior western blot (ver apartado 9 de materiales y métodos).

#### **11. FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR PARA LA OBTENCIÓN DE UNA FRACCIÓN ENRIQUECIDA EN MEMBRANAS.**

Las CGCs fueron lavadas dos veces con PBS. La homogeneización y subsiguientes pasos de fraccionamiento subcelular fueron realizados en tampón de homogeneización (10mM HEPES, 1'5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM KCl, cóctel de inhibidores de proteasas y pH 7'9). El homogenado fue centrifugado a 2,000 X g durante 15 min a

4°C. El pellet fue la fracción nuclear y el sobrenadante fue centrifugado a 100,000 X g durante 1 hr. a 4°C para obtener las fracciones membranal (pellet) y la citosólica (sobrenadante). Los pellets obtenidos fueron lavados un par de veces y resuspendidos en tampón de homogeneización. Posteriormente se procesaron las muestras mediante western blot (ver apartado 9 de materiales y métodos).

### **12. IMMUNOPRECIPITACIÓN DE COMPLEJOS PROTÉICOS.**

#### **12.1. Preparación de la proteína G Sepharose™**

La proteína G (Sephadex Sepharose™ 17-0618-01 Amersham Pharmacia) es una proteína recombinante, Mr 17000, producida en E.coli y que contiene dos regiones de unión a IgG. Esta proteína G se suministra en un 20% de etanol. Para preparar esta proteína se elimina el etanol después de centrifugar y aspirar la parte líquida y se repone con tampón de lisis (TL) NP-40 usado para obtener el homogenado de células (20mM Tris pH 7.5, 1% NP-40, 150mM NaCl y 5mM EDTA suplementado con inhibidores de proteasas (1mM PMSF, 10µg/ml Aprotinine, 20µg/ml Leupeptine, 1mM Na<sub>2</sub>VO<sub>4</sub>) en una relación 50% proteína G y 50% tampón de lisis. Esta será la solución de proteína G a utilizar.

Se calculó unos 60 µL de proteína G por ensayo en 1mL de TL. Se centrifugó a 300rpm 1-2 minutos. Se repitió el proceso 3 veces para eliminar los restos de metanol. Después del último centrifugado se añadió igual volumen de TL que de solución de proteína G teníamos.

#### **12.2. Procedimiento de la inmunoprecipitación.**

En placas de 10cm de diámetro se lisaron en frío las células con TL. El lisado se centrifugó a 12.000rpm durante 10 minutos. Seleccionamos el sobrenadante y determinamos la concentración de proteína por el método de Bradford (Bradford, 1976). Se utilizaron de 0.5 a 1mg (cantidad máxima) de proteína en 1mL de volumen final y se añadieron los 60 µL de proteína G que estuvieron durante 1h a 4°C en una rueda giratoria. A este proceso lo llamamos preclarado. Esto nos permitirá saber las uniones inespecíficas de la proteína de homogenado a la proteína G. Se centrifugó a 1000rpm 2 minutos y cogimos el sobrenadante. El pellet de la resina, con proteínas unidas inespecíficamente se lava con TL 3 veces

y se le añaden 30 $\mu$ L de Laemmli-SDS 4x + 1 $\mu$ L de DTT 1M. Se ponen a 95°C 5 minutos y se puede cargar en un gel de electroforesis para ver el rendimiento de la inmunoprecipitación.

Al sobrenadante se le añadió 1 $\mu$ g/ensayo de anticuerpo (1 $\mu$ g de anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina (4G10; Upstate Cell Signalling solutions), 1 $\mu$ g de anticuerpo policlonal anti-IGF-IR $\beta$  (sc-713, C-20; Santa Cruz Biotechnology, Inc.), 1 $\mu$ g de anticuerpo monoclonal anti-ER $\alpha$  (SRA-1010, C-542; StressGen Biotechnologies Corp.) y se incubó 1h a 4°C en la rueda.

Después se añadió a ese sobrenadante la proteína G que estuvo durante 1h a 4°C en la rueda giratoria. Se centrifugó a 300rpm 1-2 minutos y se lavó la proteína G 3 veces con TL. Al pellet final se añadió 30 $\mu$ L de Laemmli-SDS 4x + 1 $\mu$ L de DTT 1M. Se puso a 95°C 5 minutos, se centrifugó a 12.000rpm 2 minutos y las proteínas eluidas de la resina se analizaron mediante la técnica de western blot (ver apartado 9 de materiales y métodos).

### **13. MEDIDA FLUORIMÉTRICA DE LA ACTIVIDAD DE CASPASAS.**

Las CGCs se trataron a los 7DIV y se procesaron para el estudio de la cinética de activación de diferentes caspasas. Las células fueron lavadas con PBS y homogeneizadas con tampón de lisis (25 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 2% Nonidet P-40 (Merck), 0.2% SDS, 1 $\mu$ M PMSF, 2  $\mu$ g/ml aprotinina, 1 $\mu$ g/ml pepstatina y 5  $\mu$ g/ml leupeptina, pH 7.4). Los homogenados fueron diluidos 1:1 (volumen/volumen; v/v) con glicerol y guardados a -70°C.

Las actividades Caspasa fueron realizadas utilizando un método fluorimétrico en un espectrómetro de luminiscencia (Espectrómetro de Luminiscencia AMINCO Bowman Series2) usando los tetrapéptidos Ac-YVAD-AMC, Ac-VDVAD-AMC, Ac-DEVD-AMC, IETD-AMC y LEHD-AMC (Peptide International) como sustratos preferentes para detectar la actividad de caspasa-1, -2, -3, -8 y -9, respectivamente. Las reacciones fueron seguidas durante 15 min. después de la adición del sustrato (25  $\mu$ M) y el homogenado celular (30 mg/ml) en una solución estándar (100mM HEPES, 10% (peso/v; p/v) sacarosa, 0.1% (p/v) 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propane sulfonate (CHAPS), 10mM dithiothreitol (DTT; sigma), 1mM EDTA, 1mM PMSF, 2 $\mu$ g/ml aprotinina, 1 $\mu$ g/ml pepstatina, and 5 $\mu$ g/ml leupeptina). Los resultados están expresados como cambio en la intensidad de fluorescencia por hora por miligramo de proteína ( $\Delta F/h/mg$  prot).

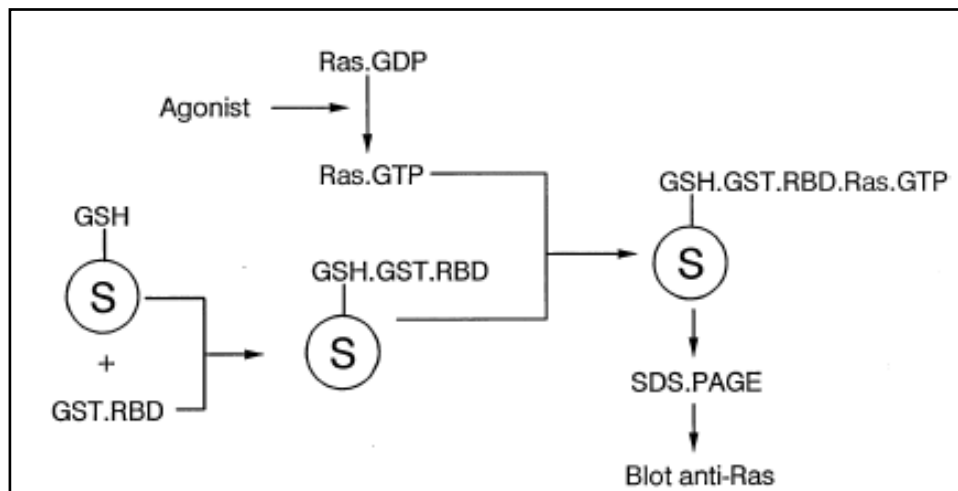
**14. EXTRACCIÓN DE RNA Y AMPLIFICACIÓN POR RT-PCR.**

A los 7 DIV se lavaron las células con PBS (4°C) y se procedió a la extracción del mRNA mediante la utilización de la solución TRIzol™ (INVITROGEN) de isotiocianato de guanidina siguiendo el protocolo indicado. Posteriormente se determinó la concentración de RNA para normalizar las muestras e igualar concentraciones. Se realizó midiendo su absorbencia en un biofotómetro (Eppendorf) a 260nm y relacionándola con la absorbencia a 280nm para obtener un valor que nos indicase su estado de pureza. Así pues, para un grado de pureza óptimo e indicativo de no degradación de RNA deberíamos encontrar un valor 260nm/280nm superior a 1'8 e inferior a 2'1. La contaminación de proteínas o de fenol disminuye la relación. Se aplicó la relación existente para la cuantificación espectrofotométrica de ácidos nucleicos, en este caso RNA, de 1unidad de densidad óptica (1 UDO) equivale a 40µg/mL de RNA.

La síntesis de cDNA y posterior transcripción reversa (RT) se realizó con el kit *SuperScript™ One-Step RT-PCR with Platinum®Taq* (INVITROGEN) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Como control para las diferencias en la cantidad de RNA presente en cada reacción de RT y diferencias en la eficiencia de la RT, los resultados fueron normalizados con el nivel de expresión del rRNA 18s (RNA 18s: (+) 5'-TCAAGAACGAAAGTCGGAGG-3'; (-) 5'-GGACATCTAAGGGCATCACA-3'). Para la amplificación del RNA correspondiente al receptor de estrógeno ER- $\alpha$  se sintetizaron unos oligonucleótidos específicos con la función de *primer* (o cebador) para cada uno de ellos. ER- $\alpha$  (acceso NM\_012689: 5'-<sub>62</sub> TTCCGTCTTACTGTCTCAGC-3'<sub>81</sub>; 5'-<sub>1460</sub> CCTGTCCAAGAGCAAGTTAG-3'<sub>1441</sub>). Las condiciones para la reacción de PCR en volumen final 50µL consistieron en las indicadas en el protocolo con 0,8µM *primer* ER $\alpha$ , 15 min de incubación a 50°C para la síntesis del cDNA seguido del programa: 5 min 95°C + 35x [30 sec 94°C+ 30 sec 60°C+ 45 sec 72°C] + 5 min 72°C. Los productos de la amplificación por PCR fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón TAE teñidos con bromuro de etidio (0,5µg/mL) y visualizados bajo luz UV.

## 15. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA PROTEÍNA G MONOMÉRICA RAS.

Las proteínas G monoméricas de la familia de ras son proteínas G la actividad de las cuales dependerá de su unión a GTP o a GDP. De esta manera, cuando tienen unido GTP, se presentan activas y, cuando tienen unido GDP, se presentan inactivas. Los anticuerpos existentes contra estas proteínas son incapaces de distinguir entre la forma activa y la forma inactiva. Por esta razón, para el estudio de las activaciones de las proteínas G monoméricas, antes de realizar el western blot, los lisados celulares se hicieron pasar por una resina que tenía unida la proteína de fusión específica para la proteína G monomérica ras (ver figura 23), que se une con mucha afinidad a la forma activa (GTP), y con poca afinidad para la forma GDP, la inactiva. Para analizar la activación de la proteína G pequeña ras se purificó la proteína de fusión GST-c-Raf-1-RBD.



**Figura 23. Esquema del ensayo de unión por afinidad para Ras-GTP.** El dominio de unión a Ras-GTP de c-Raf (RBD, residuos 51–131 de c-Raf) fusionado a *glutathione-S-transferase* (GST) se une a la resina *glutathione-(GSH-) Sepharose* (S). Las células son tratadas y Ras se activa. Las células son lisadas y los extractos mezclados con la resina *Sepharose*. Ras-GTP se une a la immobilizada GST-RBD. La resina se lava, se le añade tampón laemli y se procesa mediante una electroforesis (SDS-PAGE). Después del SDS-PAGE, Ras (representando la fracción de Ras presente como Ras-GTP) se cuantifica por Western blot. Esquema extraído de (Sugden and Clerk, 2000).

### 15.1. Purificación de la proteína de fusión GST-c-Raf-1-RBD.

Bacterias transformadas con el plásmido pGEX-GST-c-Raf-1-RBD fueron cedidas amablemente por el doctor Néstor Gómez (Universitat Autònoma de Barcelona). El

plásmido contiene el operón Lac y por tanto su expresión será inducida utilizando IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-galactopyranoside; sigma). El procedimiento de purificación fue el siguiente:

Primeramente se procedió a lanzar un precultivo de bacterias. Se picó una de las colonias de bacterias transformadas cedidas a 10mL de medio de cultivo LB (Lauria-Bertani) con ampicilina 50 $\mu$ g/mL (LBA) y se dejaron crecer toda la noche a 37°C en agitación. Al día siguiente, los 10mL de precultivo se pasaron a 500mL de LBA. Después de 2 horas en agitación a 37°C se añadió el IPTG hasta una concentración final de 0,2mM. Se incubó de nuevo a 37°C en agitación hasta llegar a una densidad óptica (DO) de 1,2. Seguidamente, se centrifugó a 2600g durante 20 minutos a 4°C. El pellet resultante de la centrifugación se lavó con una solución STE (10mM Tris ph 8; 150mM NaCl y 1mM EDTA) se centrifugó a 2600g durante 10 minutos a 4°C y se homogeneizó el pellet con la solución STE. Se realizó una centrifugación a 1750g durante 7 minutos.

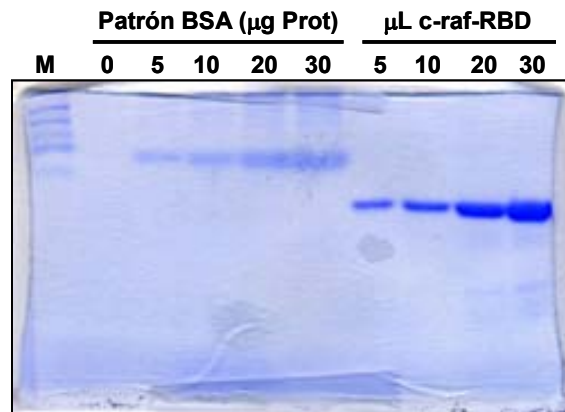
El pellet bacteriano resultante se lisó en 20mL de STE con los inhibidores de proteasas (1mg/mL de lisozima; 10 $\mu$ g/mL de inhibidor de tripsina; 1mM de PMSF; 10 $\mu$ g/mL de aprotinina y 10 $\mu$ g/mL de leupeptina), dejándolo 20 minutos a 4°C. Posteriormente, se añadió 1mM de DTT y 1'5% de N-lauryl-sarcosyl. Se dejó 10 minutos a 4°C y se sonicó hasta que el lisado se volvió traslúcido. Se añadió de nuevo PMSF y 2% de Tritón X-100. Posteriormente se centrifugó a 5000g durante 1 hora a 4°C. Al sobrenadante bacteriano resultante de la centrifugación, se le añadió la resina de glutatión-sefarosa.

### **15.2. Preparación de la resina de glutatión-sefarosa e incubación de la resina con la proteína de fusión.**

La resina de glutatión-sefarosa (Glutathione Sepharose<sup>TM</sup> 4B; Amersham Pharmacia) se lavó dos veces con PBS a 4°C y centrifugó a un máximo de 1500 rpm durante 1 minuto, y se añadió a la resina el sobrenadante bacteriano resultante de la última centrifugación del apartado anterior. Se dejó toda la noche a 4°C en agitación orbital para facilitar la unión entre la cola GST de la proteína de fusión con la resina de glutatión-sefarosa y se lavó 3 veces con PBS a 4°C la resina con la proteína de fusión unida.

Finalmente, se realizó una cuantificación por tal de estimar la concentración de proteína de fusión que se obtuvo (figura 24). Para eso se realizó un patrón de BSA

de 5 a 30 $\mu$ g y se miró en un gel de poliacrilamida al 10% de densidad. Además se realizó una migración de una muestra de resina on proteína de fusión de 5, 10, 20 y 30 $\mu$ L. En todos los casos se diluyeron las muestras de BSA y resina con tampón Laemmli (ver apartado 11.1) El gel se tiñó con azul de Coomassie (0.5% (p/v) Coomassie Brilliant Blue R, 45% (v/v) etanol y 10% (v/v) ácido acético; sigma) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron diferentes lavados con agua destilada caliente hasta que quedó transparente.



**Figura 24. Ejemplo de cuantificación de la proteína de fusión GST-c-Raf-1-RBD.**

(M) Marcador de peso molecular. Los primeros carriles corresponden a un patrón de concentraciones de proteína Albúmina (BSA) que va desde 0 a 30 $\mu$ g. Los últimos carriles corresponden a la proteína c-Raf-1-RBD después de todo el proceso de purificación. Se añadieron de 5 a 30 $\mu$ L. Por extrapolación con el patrón de BSA, en esta cuantificación se consideró que la concentración de proteína c-Raf-1-RBD era de 2 $\mu$ g/ $\mu$ L.

### 15.3. Aislamiento de la proteína monomérica G del lisado celular.

La proteína G ras-GTP (forma activa) tiene una fuerte afinidad por el dominio RBD de la proteína c-Raf-1, no así la forma ras-GDP. De esta manera, la resina que tiene unida la proteína de fusión GST-c-Raf-1-RBD se utilizó para aislar la proteína ras.

Después de realizar los diferentes tratamientos en los cultivos de neuronas granulares de cerebelo que crecieron en placas de 100mm  $\varnothing$ , se lavaron las placas una vez con PBS a 4°C. Seguidamente, se lisaron las células con 500 $\mu$ L de tampón de lisis (10% glicerol; 1% NP-40; 50mM Tris-HCl pH 7,4; 200mM NaCl; 2,5mM MgCl<sub>2</sub>; 10mM NaF; 1mM ortovanadato; 0,1 $\mu$ M aprotinina; 250 $\mu$ M de PMSF

y 1  $\mu$ M leupeptina). Se cuantificó la concentración de proteínas por el método de Bradford (Bradford, 1976).

Antes de añadir el lisado celular a la resina con la proteína de fusión, se realizaron 3 lavados con PBS frío de la resina (centrifugación de 1500rpm durante 1 minuto a 4°C). Posteriormente, se incubó durante una hora en agitación orbital a 4°C, 700  $\mu$ g de proteína del lisado celular de cada muestra en 150  $\mu$ g de proteína de fusión presente en la resina de glutatión-sefarosa. La proteína restante se guardó para la realización de un western blot para la forma total de la proteína G. Seguidamente se lavó 3 veces con PBS y el pellet resultante se diluyó en 30  $\mu$ L de tampón de Laemmli (ver apartado 9.1 de materiales y métodos). Posteriormente, se separaron las proteínas por electroforesis en un gel de poliacrilamida-SDS al 12% para después realizar un western blot. (ver apartado 9 de materiales y métodos). El tampón de bloqueo, así como el tampón de dilución para el anticuerpo anti-ras fue tampón blotto (ver apartado 9.1 de materiales y métodos). La dilución realizada del anticuerpo fue de 1/1000 para el primario y de 1/2000 para el secundario.

### **16. PLÁSMIDOS Y TRANSFECCIONES.**

Para diferentes ensayos se transfectaron las CGCs con diferentes vectores. Los vectores de expresión de mamífero codificantes para c-myc-ERK, YFP (Yellow Fluorescent Protein), Ras-YFP, RasV12-YFP (mutación que transforma la proteína ras en constitutivamente activa) y RasN17-YFP (mutación que transforma la proteína ras en constitutivamente inactiva) fueron cedidos por el Dr. Pablo Rodríguez-Viciano.

Las CGCs fueron sembradas en cubreobjetos de 12mm  $\varnothing$  tratados con 50  $\mu$ g/mL de poly-L-Lisine y transfectadas a los 5DIV con 1  $\mu$ g de c-myc-ERK y 5  $\mu$ g de cada vector de expresión de Ras o GFP usando Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 (Invitrogen).

Es importante el cambio de medio que sufrirán las células una vez transfectadas, para ello se les aplicó el mismo medio que tenían hasta ese momento. Se recogió el medio en el que estaban (Medio Condicionado), se centrifugó y se conservó en condiciones de esterilidad en el incubador a 37°C. Se preparó un medio de transfección: Medio A (Medio DMEM sin B27 y 25mM KCl)



Para cada tratamiento se preparó:

250 $\mu$ L (1) de Medio A + X  $\mu$ L de Plásmido en Stock 1 $\mu$ g/ $\mu$ L (Para GFP o vector de expresión de ras 5 $\mu$ g, para c-myc-ERK 1 $\mu$ g). Se agitó de forma suave durante 5 minutos a temperatura ambiente.

250 $\mu$ L (2) de Medio A + 15 $\mu$ L de Lipofectamine 1mg/mL de Invitrogen. Se agitó de forma suave durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Una vez teníamos preparados estos medios, se añadió el contenido de 1 en 2, agitando suavemente y dejando 30 minutos a temperatura ambiente. Este será el medio de Transfección Completo. Se transfectó con 150 $\mu$ L de este Medio de Transfección Completo y se dejó en el incubador durante 4 horas. A los 20-30 minutos se miró el estado de las células y se añadió 650 $\mu$ L de Medio A. se lavó con Medio A 2 veces y se añadió el Medio Condicionado a 37°C durante 24h-48h cuando se realizó el tratamiento pertinente. Acabado el tratamiento las células fueron procesadas por inmunocitoquímica (ver apartado 7).

#### **17. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Los resultados están expresados como una media  $\pm$  SEM. Los grupos experimentales fueron comparados por un test ANOVA de una vía, seguido por el test de multicomparación de Tukey. Los valores  $p < 0,05$  fueron considerados significativos.

## IV – RESULTADOS

*[...]*  
*Ten siempre en el corazón la idea de Itaca.*  
*Tienes que llegar, es tu destino.*  
*Pero no fuerces en absoluto la travesía.*  
*Es preferible que dure muchos años*  
*y que ya seas viejo cuando fondees en la isla,*  
*rico de todo lo que habrás ganado haciendo el camino,*  
*sin esperar que te tenga que dar riquezas Ítaca.*  
*[...]*

**1- Trabajo 1: *Caspase activation in ceramide-mediated apoptosis of cerebellar granule cells in culture.***

Enviado a *Neuroscience*

## **Caspase activation in ceramide-mediated apoptosis of cerebellar granule cells in culture.**

Andrea Caballero-Benítez <sup>a,b,1</sup>, Alfredo Miñano <sup>a,1</sup>, Mónica Lluch <sup>a</sup>,  
Julio Morán <sup>b</sup> and José Rodríguez-Alvarez <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Institut de Neurociències and Department de Bioquímica i Biologia Molecular,  
Universitat Autònoma de Barcelona, Spain;

<sup>b</sup> Departamento de Neurociencia, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional  
Autónoma de México, Ciudad de México, México.

<sup>1</sup> *These authors contributed equally to this work*

**Running title** – Caspase activation by ceramide in CGC

**Address correspondence and reprints request to** José Rodríguez-Alvarez, Institut de Neurociències, Edifici M, Universitat Autònoma de Barcelona, Campus de Bellaterra, 08193 Cerdanyola del Vallés, Barcelona, Spain.

Phone: (34) 935 811 910; Fax: (34) 935 811 573; Email: [jose.rodriquez@uab.es](mailto:jose.rodriquez@uab.es)

**Abstract**

Ceramide is able to induce the apoptotic death of cerebellar granule cells (CGC) in culture. However previous reports did not agree whether ceramide-induced apoptosis of CGC requires caspases activation. Here we have shown that addition of C<sub>2</sub>-ceramide is able to produce extensive death of cultured CGC which is associated to chromatin condensation, ladder-like DNA fragmentation and activation of caspases. Our results show that C<sub>2</sub>-ceramide activates caspase-3, -9 and -2 but not caspase-1 and -8. Caspase-9 activation was associated to cytochrome c release from mitochondria towards the cytosol and was followed by activation of caspase-2 and -3. PARP proteolysis was also observed after caspase-3 and -2 activation. The involvement of caspase-9, -3 and -2 in ceramide-mediated apoptotic death of CGC was further supported by the use of specific inhibitors.

**Keywords** : Ceramide, caspases, neurons, apoptosis, cerebellum.

**Abbreviations used**: CGC, cerebellar granule cells; K5, 25 mM KCl; K25, 25 mM KCl; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium; PARP, poly (ADP-ribose) polymerase; PBS; phosphate buffer saline; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride ; TTBS, Tris-buffered saline/Tween 20 buffer; SMAse, sphingomyelinase; STS, staurosporine ;

## Introduction

Apoptosis is a normal event during the development of nervous system and it has been also associated to several pathologic processes (Thompson 1995;Mattson 2000) Apoptosis is an active death process characterized by the activation of several intracellular signalling pathways and the expression of specific genes, playing some (Thompson 1995) proteases a key role in the execution of apoptosis. These proteases are mainly members of a family of aspartate-specific cystein proteases known as caspases (Lazebnik *et al.* 1994;Alnemri 1997). Typical morphological changes of apoptotic death, like nuclear condensation, chromatin fragmentation and DNA degradation, are controlled by effector caspases like caspase-3 or -7, which disassemble subcellular structures and that are activated by initiator caspases like caspase-8 or -9.

Ceramide is a sphingosine-based lipid signalling molecule that is involved in the regulation of different cellular processes like proliferation, senescence, differentiation and cell cycle arrest (Kolesnick 1991;Hannun 1994). However, during the past years several evidences had proposed that ceramide could be a major regulator of apoptotic death (Obeid *et al.* 1993;Kolesnick and Hannun 1999). There are two main pathways for intracellular ceramide formation: *de novo* synthesis via the condensation of serine and palmitoyl-CoA, which is converted to dihydroceramide and then to ceramide and/or the hydrolysis of sphingomyelin by sphingomyelinase (SMAse). De novo synthesis of ceramide is mainly produced in the cytosolic side of the endoplasmic reticulum membrane whereas SMAse activity is found in lysosomes, secretory vesicles and in microdomains of the plasma membrane.

In the nervous system the role of ceramide in apoptotic cell death has been more controversial. As in peripheral tissues, several reports have suggested that ceramide is a potent inducer of cellular apoptosis. For example ceramide induces apoptosis in PC12 cells (Hartfield, Mayne, and Murray 1997), mesencephalic and cortical neurons in culture (Brugg *et al.* 1996;Stoica *et al.* 2003) and in embryonic chick neurons (Wiesner and Dawson 1996). However, other studies indicated that ceramide could have a neuroprotective effect against certain pro-apoptotic stimuli. The cell-permeable analogue C<sub>2</sub>-ceramide protected cultured sympathetic neurons from apoptosis triggered by nerve growth factor deprivation (Ito and Horigome 1995).

## RESULTADOS

Cultured cerebellar granule cells (CGC) have been shown to be a useful model to characterize and study the apoptotic death induced by a large variety of experimental conditions. CGC die by apoptosis during their migration towards the internal granular layer if they do not receive excitatory inputs from the mossy fibres (Williams and Herrup 1988; Wood, Dipasquale, and Youle 1993). This process could be mimicked *in vitro* since CGC die by apoptosis in the presence of physiological concentrations of KCl (5 mM or K5) but they survive in the presence of depolarizing KCl concentrations (25 mM or K25; Gallo *et al.* 1987). Ceramide seems to be involved in CGC apoptosis induced by KCl deprivation. An increase in the intracellular concentration of ceramide has been described when CGC are switched to K5 medium (Toman *et al.* 2002). Accordingly it has been shown that CGC die apoptotically in a concentration and age dependent manner when exposed to C<sub>2</sub>-ceramide (Manev and Cagnoli 1997; Centeno *et al.* 1998). However, although the role of caspases induced by different stimuli has been evaluated with detail in CGC (D'Mello *et al.* 1998; Moran *et al.* 1999; Caballero-Benitez and Moran 2003), few data exist about the activation of caspases by ceramide in CGC. A recent report had shown that caspase-3 activation is involved in C<sub>2</sub>-ceramide mediated apoptosis of CGC (Vaudry *et al.* 2003). By contrast, another report suggested that C<sub>2</sub>-ceramide-mediated apoptosis was caspase-3 independent (Monti, Zanghellini, and Contestabile 2001), accordingly with recent data obtained in jurkat cells (Thon *et al.* 2005).

In the present study we decided to further characterize the effect of C<sub>2</sub>-ceramide on the activation of several caspases in cultured CGC. We found an activation of caspase-9, -3 and -2 after 3-24 hr of ceramide addition to culture media. The caspases activation was preceded by the translocation of cytochrome c to the cytosol and was associated to the hydrolysis of PARP. Moreover, the blockade of the activation of these caspases protected the cultures from apoptosis by ceramide.

## Results

### *C<sub>2</sub>-ceramide induced CGC apoptotic death.*

In previous studies, it was observed that the death-promoting effect of C<sub>2</sub>-ceramide in CGC was dependent on the developmental state of the neurons in cultures containing foetal calf serum (Taniwaki *et al.* 1999). By contrast, others studies (Monti, Zanghellini, and Contestabile 2001; Vaudry *et al.* 2003) have shown that C<sub>2</sub>-ceramide induces apoptosis independently of the culture maturation state when grown in medium without

foetal calf serum. In this study, we confirmed the pro-apoptotic effect of C<sub>2</sub>-ceramide in serum containing (Fig. 1) and serum-free (data not shown) mature CGC cultures by testing the effect of different concentration of C<sub>2</sub>-ceramide (3, 10, 30, 40 and 60 µM) on the viability of CGC at 24 and 48 h. In CGC grown in serum containing media treatment for 24 h with C<sub>2</sub>-ceramide did only have a significant cell death effect above 30 µM (Fig. 1a). We observed that CGC viability was reduced by 20% and 50% at 40 and 60 µM of C<sub>2</sub>-ceramide respectively. In contrast, after 48h, C<sub>2</sub>-ceramide-mediated cell death was already observed at 3µM. When CGC were treated for 48 h with 30, 40 or 60 µM of C<sub>2</sub>-ceramide, cell viability was significantly reduced up to 50, 80 or 90%, respectively (Fig. 1a). When CGC were cultured in serum-free media, C<sub>2</sub>-ceramide produced a bigger decrease in cell viability than in serum containing media. For example, 30 µM of C<sub>2</sub>-ceramide produced a 40% and a 75% decrease in CGC viability at 24 and 48 h respectively (data not shown).

Cell viability results observed with C<sub>2</sub>-ceramide were supported by the morphological appearance of CGC treated with the lipid and observed by phase contrast microscopy (Fig. 1b). For example, in serum containing media, the morphological appearance of the cultures treated with 30 µM C<sub>2</sub>-ceramide for 24 h was similar to control cells (K25), however after 48 h, when the MTT assay indicated a important decrease in cell viability (50%; Fig. 1a), CGC showed marked morphological alterations, characterized by a decreased cell volume and an appreciable degeneration of CGC soma and neuritic processes, as well as an evident number of dead cells (Fig. 1b).

Oligonucleosomal fragmentation of DNA is considered a characteristic feature of apoptotic cell death. As it could be observed in Figure 2a, C<sub>2</sub>-ceramide (40µM) produced DNA laddering after 24 or 48 h. Similar DNA laddering pattern was observed in K5 cultured CGC, whereas no DNA laddering was observed in control (K25) CGC. To further confirm the apoptotic nature of C<sub>2</sub>-ceramide-mediated death in CGC, we observed the nuclear morphology by Hoechst staining. In Figure 2b is clearly shown the significant increase in condensed or fragmented nuclei in C<sub>2</sub>-ceramide (40 µM) treated CGC when compared with control (K25) cultures.

#### *Caspase activation by C<sub>2</sub>-ceramide*

Caspase activation is considered to be a key factor leading to cell apoptosis. Previous results have shown that caspase-3 activation was observed in KCl-deprived or C<sub>2</sub>-ceramide treated CGC (D'Mello *et al.* 1998;Vaudry *et al.* 2003). Supporting the



## RESULTADOS

involvement of caspase activation in C<sub>2</sub>-ceramide-mediated CGC apoptotic death, we observed that a pan-inhibitor of caspases, zVAD-CHO (10 μM) was able to reverse the morphological changes induced by C<sub>2</sub>-ceramide (Fig. 1b).

In order to study which caspases were activated by C<sub>2</sub>-ceramide we decided to evaluate the activity of caspases-1, -2, -3, -8 and -9 by using fluorogenic substrates. These substrates have been demonstrated to be specifically cleaved by the different caspases (Thornberry *et al.* 1997). DEVD-AMC was used to determinate the activation of caspase-3. When CGC were treated with 40 μM C<sub>2</sub>-ceramide we detect a maximal increase (250% vs. control) in DEVD cleavage at 12 h. DEVD cleavage remained increased until 36 hr after treatment (Fig. 3a). No significant DEVD cleavage (vs. control) was observed before 12 h (data not shown). As previously shown (Caballero-Benitez and Moran 2003) staurosporine (0.5 μM) produced an increase in DEVD cleavage (400% vs. control) after 8-12 h. In order to confirm the results obtained by fluorimetric analysis, we evaluated by western blot analysis the generation of the active fragment of caspase-3 in homogenates obtained from cells treated with C<sub>2</sub>-ceramide at different times. Figure 3b shows the appearance of the active fragment of caspase-3 (17 kDa) from 12 hr until 36 hr after application of C<sub>2</sub>-ceramide. To further confirm the activation of caspase-3 in this model, we determined by Western blot the proteolytic cleavage of PARP, a natural substrate of caspase-3, by detecting the characteristic fragment of 85 kDa (Fig. 3c). The PARP processing in homogenates from CGC treated with C<sub>2</sub>-ceramide was similar to that observed in the other studies (Eldadah, Yakovlev, and Faden 1997). In our conditions we found the appearance of an 85kDa fragment, corresponding to one of product of the PARP proteolysis by caspase-3 (Fig. 3c), concomitantly with a decrease in the density of the 116 kDa band. The 85 kDa fragment was observed from 16 to 28 h after application of C<sub>2</sub>-ceramide. Activation of caspase-3 by C<sub>2</sub>-ceramide was also studied by immunohistochemistry by using an antibody directed against the active fragment. Figure 4 shows that cells with activated caspase-3 were clearly observed after 12 hr of C<sub>2</sub>-ceramide addition to CGC cultures, whereas the maximal number of cells with active caspase-3 was seen at 24 hr. Afterwards, the number of cells immunoreactive for active caspase-3 declined and almost no positive cells were observed at 48 hr. As expected, CGC cultures treated with the pro-apoptotic agent, staurosporine, also presented cells with activated caspase-3 (Fig. 4). However, activation was observed earlier than with C<sub>2</sub>-ceramide since numerous positive cells were already observed at 8 hr.

Caspase-3 could be activated by different initiator caspases. The caspase responsible for the activation of caspase-3 in the intrinsic pathway to apoptosis is caspase-9. The activity of caspase-9 was measured as Ac-LEHD-AMC cleavage (Thornberry *et al.* 1997) as well as by the detection of the active fragments by western blot and immunohistochemistry. When CGC were treated with 40  $\mu$ M C<sub>2</sub>-ceramide, we detected a significant LEHD cleavage at 12 hr (150% over control), reaching a maximum at 32 h after treatment (400% over control; Fig 5a). In line with previous studies (Caballero-Benitez and Moran 2003), we found that staurosporine (0.5  $\mu$ M) also induced the fragmentation of LEDH after 6 h. The presence of the active fragment of caspase-9 (10 kDa) by immunoblotting was already observed at 3 hr (Fig 5b) and persisted until 36 hr after C<sub>2</sub>-ceramide addition. Slightly different results were observed when activation of caspase-9 was monitored by immunohistochemistry. As it is observed in figure 6, cells immunoreactive to active caspase-9 were observed at 3 and 8 hr after C<sub>2</sub>-ceramide treatment. However, almost no positive cells were observed at 12 hr and onwards. Similar results were observed with staurosporine-treated CGC cultures (Fig. 6).

It has been suggested that caspase-9 is activated by the release of cytochrome-c from mitochondria to cytosol (Krajewski *et al.* 1999). Figure 7 shows the western blot analysis for cytochrome-c, detected as a 17-kDa band, in the mitochondrial and the cytosolic fractions of CGC homogenates treated with 40  $\mu$ M C<sub>2</sub>-ceramide during 12, 24, 36 y 48h. Under these conditions, we found a decrease in the mitochondrial cytochrome-c from 12 hr after C<sub>2</sub>-ceramide addition (Fig. 7a). The decrease in the mitochondrial fraction was accompanied by an increase in the cytosolic cytochrome-c levels as compared to controls (Fig. 7b). No release of cytochrome-c from mitochondria was detected before 12 hr.

Activation of effector caspases, like caspase-3, by the extrinsic apoptotic pathway involves the activation of plasma membrane receptors from the TNF- $\alpha$  receptor superfamily and of initiator caspases like caspase-8 or -2 (Juo *et al.* 1998). In this study we have measured caspase-8 activity using the preferring substrate Ac-IETD-AMC (Thornberry *et al.* 1997). When CGC were incubated with 40  $\mu$ M C<sub>2</sub>-ceramide we did not observe any significant increase in IETD cleavage during the first 48 h when compared with control cultures (Fig 8a). Similar results were observed by western blot since no differences in the amount of the cleaved caspase-8 were observed in C<sub>2</sub>-ceramide treated cells vs. control cultures (Fig. 8b). By contrast, when caspase-2 activity was monitored by VDAD-AMC cleavage, an increase in the activity was observed from 8 until 48 hr post C<sub>2</sub>-ceramide addition when compared with control

## RESULTADOS

cultures (Fig. 9a). Similar results were observed when proteolysis of caspase-2 was determined by immunoblotting (Fig.9b). We did detect neither caspase-2 activity nor proteolysis of caspase-2 before 8 hr (data not shown). Staurosporine was also able to activate caspase-2 as determined both by measurement of activity (Fig. 9a) and immunoblotting (Fig. 9b). However, no activation of caspase-8 was observed in staurosporine-treated cultures (Fig. 8)

We have also monitored the activity of caspase-1 in C<sub>2</sub>-ceramide treated CGC cultures. Caspase-1 belongs to the subfamily of caspases involved in pro-inflammatory processes and as expected we did not detect its activation since no cleavage of Ac-YVAD-AMC was observed in ceramide (40 µM)-treated cells at the times studied (3-48 hr; data not shown).

### *Effect of caspase inhibitors on cell viability of CGC*

Previous results indicated that C<sub>2</sub>-ceramide activates caspase-2, -3 and -9 (but not caspase-8) in CGC. To further confirm these results we studied the morphological appearance of CGC treated with 40 µM C<sub>2</sub>-ceramide in the presence of these specific caspases. Inhibition of caspase-3 (DEVD-CHO; 10 µM), caspase-2 (VDVAD-CHO; 10 µM), and caspase-9 (LEHD-CHO; 10 µM) significantly reduced CGC death. In contrast, the inhibitor of caspase-8, IETD-CHO (10 µM) did not have any effect on the morphology of CGC (Fig. 10). When cell viability evaluated as MTT transformation was measured in the presence of these inhibitors, we found that the broad spectrum caspase inhibitor (ZVAD-CHO), caspase-3 inhibitor (DEVD-CHO) and caspase-9 inhibitor (LEHD-CHO) completely prevented the effect of 40 µM C<sub>2</sub>-ceramide after 48 h. Inhibition of caspase-2 with VDVAD-CHO reduced a 55% C<sub>2</sub>-ceramide-mediated CGC death (data not shown). By contrast, no decrease in C<sub>2</sub>-ceramide-mediated CGC death was observed with IETD-CHO (data not shown).

## **Discussion**

Apoptosis is an important physiological process that has a key role during CNS development maintaining cell homeostasis. Moreover, apoptosis has been involved in the neuronal death observed in several neurodegenerative disease and in cerebral ischemia (Chen *et al.* 1998). The molecular processes and the mechanisms involved in this type of death, have received great attention during the past decade. Caspases

have been demonstrated to be one of the main components of the apoptotic machinery (Cohen 1997; Nicholson and Thornberry 1997).

Deprivation of excitatory inputs had been shown to trigger massive apoptotic death of CGC during their postnatal migration towards the internal granule cell layer. Similarly, CGC apoptosis could be observed in cultures when they are switched from a medium with depolarizing potassium concentrations (25 mM; K25) to a normal potassium (5 mM; K5) medium. Several results have already shown that apoptosis triggered by deprivation of depolarizing inputs is mediated by caspase-9 and caspase-3 activation (Eldadah *et al.* 1997; D'Mello *et al.* 1998; Moran *et al.* 1999; Gerhardt *et al.* 2001). On the other hand, it has been reported an increase in the intracellular levels of ceramide and the disialoganglioside GD3 under this situation (Toman *et al.* 2002; Melchiorri *et al.* 2002; Castiglione *et al.* 2004). It is still not clear which is the pathway that link ceramide synthesis with deprivation of excitatory inputs in CGC, although it has been reported that could be mediated by activation of Fas receptor (Castiglione *et al.* 2004).

Since short chain analogs of ceramide, in particular C<sub>2</sub>-ceramide and C<sub>6</sub>-ceramide, may mimic some of the biological effects of endogenous ceramide, they have been used to study ceramide-mediated apoptosis in a variety of cell types. Several studies have shown that C<sub>2</sub>-ceramide elicits CGC apoptosis (Manev and Cagnoli 1997; Centeno *et al.* 1998; Monti *et al.* 2001; Vaudry *et al.* 2003). The effect of ceramide seems to depend on the concentration of exogenous ceramide and the maturation state of the cell. In this respect, it has been described (Taniwaki *et al.* 1999) that a cell permeable analogue, C<sub>2</sub>-ceramide, induce CGC apoptotic death only in immature but not in mature cultures. By contrast, in this study we found that C<sub>2</sub>-ceramide induced cell death in mature CGC (8 DIV).

We confirmed that the cell death of CGC induced by C<sub>2</sub>-ceramide is apoptotic because we were able to observe an internucleosomal cleavage of DNA and chromatin condensation and fragmentation. Apoptosis is also usually mediated by caspase activation and several reports have shown the activation of caspase-3 in ceramide-mediated apoptosis (Keane *et al.* 1997; Movsesyan *et al.* 2002; Vaudry *et al.* 2003). However the role of caspases in C<sub>2</sub>-ceramide-mediated apoptotic death of CGC is controversial. It has been reported that when CGC are cultured in serum-free medium, C<sub>2</sub>-ceramide-mediated cell death is independent of caspases activation (Monti *et al.* 2001). By contrast, Vaudry and co-workers (2003) have reported that caspase-3 activation is involved in C<sub>2</sub>-ceramide-mediated apoptosis in CGC grown in serum

## RESULTADOS

containing medium. In the present study we wanted to further explore the eventual involvement of different caspases in C<sub>2</sub>-ceramide-mediated apoptosis in CGC by using different technical approaches such as fluorimetric enzyme assays, western blot determination of caspases proteolysis and the immunohistochemical detection of caspase active fragments. Our results clearly show that C<sub>2</sub>-ceramide produces an increase in caspase-3 activity. Activation of caspase-3 begins 12 hr after C<sub>2</sub>-ceramide administration to CGC. Maximal activation is observed between 24 and 36 hr. The time-course of caspase-3 activation agrees with the observed proteolysis of the caspase-3 substrate PARP. Western blot analysis showed that PARP proteolysis is firstly observed after 16 hr of C<sub>2</sub>-ceramide treatment, 4 hours after the detection of caspase-3 activation. Our results agree with the previous observation (Vaudry *et al.* 2003) that C<sub>2</sub>-ceramide activates caspase-3 in CGC. Activation of caspase-3 is related to C<sub>2</sub>-ceramide-mediated CGC death since we were able to block it with an inhibitor of caspase-3.

Caspase-3 is an effector caspase that triggers the proteolysis of several cellular substrates leading to apoptotic death. Activation of caspase-3 is usually mediated by upstream caspases (or initiator caspases) such as caspase-2, -8 or -9. Caspase-9 activation, observed in the so-called intrinsic apoptotic pathway, requires the formation of the apoptosome by interaction between caspase-9, apoptosis activating factor-1, ATP and cytochrome-c released from the mitochondria (Cecconi *et al.* 1998; Yoshida *et al.* 1998; Krajewski *et al.* 1999). Caspase-2 and -8 activation are considered to be involved in the extrinsic apoptotic pathways which is usually triggered by activation of plasma membrane receptors (Juo *et al.* 1998; Wagner, Engels, and Deveraux 2004). In our experimental conditions, we have found that C<sub>2</sub>-ceramide activates caspase-2 and -9 but not -8. Accordingly, inhibition of caspase-2 and -9 with VDVAD-CHO and LEDH-CHO respectively, blocked C<sub>2</sub>-ceramide-mediated CGC death but inhibition of caspase-8 did not protect CGC from C<sub>2</sub>-ceramide-mediated apoptosis. We have detected that activation of caspase-2 starts 8 hr after C<sub>2</sub>-ceramide addition and remains activated until 48 hr. A similar time-course was observed when proteolysis of caspase-2 was determined by western blot. On the other hand, we observed an earlier activation of caspase-9. Immunodetection of proteolysed caspase-9 by western blotting or immunohistochemistry was evident after 3 hr of C<sub>2</sub>-ceramide addition whereas caspase-9 activity was not detected earlier than 6 hr after treatment of CGC cultures with the lipid. It was unexpected to find that release from mitochondria of cytochrome-c started at 12 hr, after the activation of caspase-9. The fact that caspase-9 was activated before caspase-2 does not mean that caspase-2 is activated by caspase-9 as

described previously in the human neuroblastoma cell line SK-N-MC (Ito and Horigome 1995), because the inhibition of caspase-9 with LEDH-CHO did not affect the activation of caspase-2 by C<sub>2</sub>-ceramide. Also, the inhibition of caspase-2 with VDVA-CHO did not modify the activation of caspase-9 by the lipid (data not shown), suggesting that C<sub>2</sub>-ceramide activates both caspases by different pathways. It has been described that C<sub>2</sub>-ceramide is able to activate caspase-9 in cortical neurons by a pathway that mediates the inactivation of Akt activity and the dephosphorylation of Bad (Zhou *et al.* 1998; Stoica *et al.* 2003; Stoica *et al.* 2003). Dephosphorylated BAD is believed to translocate to the mitochondria where it will promote cytochrome c release and subsequent caspase-9 activation (Datta *et al.* 1997). Caspase-2 has a CARD domain and could interact with several adaptor proteins implicated in the pathways associated to cell surface receptors of the TNF- $\alpha$  receptor superfamily (Wagner *et al.* 2004). Also, it is believed that dimerization triggers initial caspase-2 activation (Butt *et al.* 1998). However, the mechanism involved in caspase-2 activation by ceramide is uncertain and further experiments are necessary to fully address this issue.

## Material & Methods

### *Materials*

Foetal calf serum and penicillin/streptomycin were obtained from GIBCO. Poly-L-lysine (MW>300,000), trypsin, soybean trypsin inhibitor, DNAase, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and reagents for polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) were obtained from Sigma Chemical Company. C<sub>2</sub>-ceramide (N-Acetyl-D-sphingosine) was obtained by Tocris. Enhanced chemiluminescence detecting agent for phosphatase alkaline-conjugated antibodies and molecular weight markers (kaleidoscope) were purchased from Bio-Rad Laboratories, and polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes were from Millipore. Antibodies against caspase-1, -2, -3, -8 and -9, poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) and cytochrome-c were purchased from Santa Cruz. Antibodies against cleaved caspase-3 and -9 were purchased from Cell Signalling. Caspase substrates and inhibitors were from Peptides International. All others chemicals were of the purest grade available from regular commercial sources.

### *Cell Cultures*

Cerebellar granule cells were obtained as previously described by Moran and Patel (1989). Briefly, the dissociated cell suspensions from the cerebella of 8-days-old rats

## RESULTADOS

were plated at a density of  $2,65 \times 10^5$  cell/cm<sup>2</sup> in plastic dishes previously coated with poly-L-lysine (5 µg/ml). The culture medium contained basal Eagle's medium supplemented with 10% heat-inactivated foetal calf serum, 2 mM glutamine, 25 mM KCl, 50 µg/ml streptomycin and 50 U/ml penicillin. The culture dishes were incubated at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub>/95% air atmosphere and cytosine arabinoside (10 µM) was added after 20 h. After 7-8 DIV, CGC were treated with C<sub>2</sub>-ceramide (3, 10, 30, 40 and 60 µM) for different times. In some experiments, cells were incubated with 10 or 100 µM of the broad spectrum caspase inhibitor ZVAD or the preferring inhibitors of caspase-1, -3, -2, -8 and -9, YVAD-CHO, DEVD-CHO, VDVAD-CHO, IETD-CHO and LEHD-CHO, respectively. Inhibitors were added simultaneously to the treatment with ceramide and they were present until the end of the experiment.

### *Cell viability*

Cell viability was estimated by MTT assay (Mosmann 1983). Yellow MTT is converted to the formazan blue product by metabolically active mitochondria, and the absorbance is directly proportional to the number of the viable cells. MTT (0.2 mg/ml) was added to the cultures and the cells were incubated 1 h at 37°C. After aspiration of the medium containing the remaining MTT, dimethyl sulfoxide was used to extract the formazan blue produced. Samples were read at a wavelength of 570 nm and a reference wavelength of 630 nm. The data were calculated as the absorbance at 570 nm minus the absorbance at 630 nm and expressed as percentage of control groups.

### *Hoechst staining*

Nuclear morphology was assessed after Hoechst staining. Briefly, cells were harvested and fixed with 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) for 10 min and stained with Hoechst 33258 (1µg/ml) for 5 min. Nuclear staining was observed with a fluorescence microscope (Leica). Condensed and/or fragmented nuclei were considered as apoptotic nuclei.

### *DNA laddering*

CGCs were grown on 6-cm culture dishes for DNA laddering determination. Cultures were washed twice with PBS, lysed in Tris-EDTA buffer (5mM Tris-HCl, 200mM EDTA and 0,5% Triton X-100) and maintained for 20 min at 4°C. Lysates were then

centrifuged at 20.000 xg for 30 sec at 4°C and supernatant was treated with proteinase K (200µg/ml) and pellet was added lysis buffer and proteinase K 200µg/mL incubating 30 min at 60°C and overnight at 37°C. DNA was purified using phenol/chloroform (1:1) extraction and precipitated with ethanol at -20°C overnight. DNA was resuspended in Tris-EDTA buffer containing Dnase-free RNase (20µg/ml) during 1h at 37°C. DNA (1 µg) were loaded onto 1% agarose gels and stained with ethidium bromide (0.5 µg/ml).

#### *Immunohistochemistry assay*

Cultures were rinsed twice with phosphate-buffer saline (PBS) at 37°C and fixed in 4% of paraformaldehyde in PBS 0.1 M, pH 7.2 for 1 h at 4°C. The plates were washed 2 times with Tris-buffered saline/Tween 20 (TTBS) buffer (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl and 0.1% Tween, pH 7.5) at room temperature and blocked with TTBS buffer, containing 0.05 % FCS and 0.03 % BSA, for 45-60 min at room temperature. Cells were incubated with the primary antibody directed against the active fragment of caspase-3 or caspase-9 (1:100) in TTBS/5% BSA for 24 h at 4°C, washed two times with TTBS and incubated with FITC-conjugated secondary antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc) (1:500) in TTBS/5% BSA for 1h. After washing, the preparations were processed for visualization. Cultures were examined in an epifluorescence microscope (Leica) using a wavelength of 490 nm.

#### *Subcellular fractionation*

Cultures were rinsed twice with PBS at 37°C. Homogenization and subsequent stages of subcellular fractionation were performed in a homogenization buffer containing 10 mM Tris-HCl, 0.3 mM ethylenebis(oxyethylenitrilo)-tetra-acetic acid (EGTA) and 0.25 M sucrose, pH 7.4, in the presence of 1µM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 2 µg/ml aprotinin, 1µg/ml pepstatin and 5 µg/ml leupeptin. The homogenate was centrifuged at 5,000 X g for 10 min and the supernatant was then centrifuged at 14,500 X g for 30 min at 4°C to yield mitochondrial (pellet) and cytosolic fractions. The mitochondrial pellets were washed and resuspended in homogenization buffer.

#### *Immunoblotting*

Cells were rinsed twice with PBS at 37°C, homogenized, sonicated in a lysis buffer (25 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 2% Nonidet P-40, 0.2% SDS, 1µM PMSF, 2 µg/ml



## RESULTADOS

aprotinin, 1 µg/ml pepstatin and 5 µg/ml leupeptin, pH 7.4) and centrifuged at 3,400 X g for 20 min at 4°C. The protein concentrations of the cell homogenates were determined by the method of Bradford. Homogenates (50 µg of protein per lane) were run under non reducing conditions in a one dimensional SDS-PAGE and then electroblotted onto PVDF membranes at 100 V for 1 h. Blots were blocked with TTBS/5% non fat dry milk for 3 h at 4°C, washed three times with TTBS and incubated overnight with the primary antibody at 4°C. After further washing, the blots were incubated with alkaline phosphatase-conjugated secondary antibody for 1 h at room temperature. After washing, the blots were processed for visualization using the enhanced chemiluminescence system according to the manufacturer's recommendations (Bio-Rad Laboratories) and exposed to Kodak XAR-5 film.

### *Caspase activity measurement*

CGC were washed with PBS and then homogenized in lysis buffer. The homogenates were diluted 1:1 (vol/vol) with glycerol and stored at -70°C. Caspase activities were assayed by a fluorimetric method in a luminescence spectrometer (Luminescence Spectrometer AMINCO-Bowman Series2) using the tetrapeptides Ac-YVAD-AMC, Ac-VDVAD-AMC, Ac-DEVD-AMC, IETD-AMC and LEHD-AMC as preferring substrates to detect the activity of caspase-1, -2, -3, -8 and -9, respectively. The reactions were followed for 15 min after addition of substrate (25 µM) and cell homogenate (30 mg/ml) in a standard solution (100 mM HEPES, 10% (wt/vol) sucrose, 0.1% (wt/vol) 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propane sulfonate (CHAPS), 10 mM dithiothreitol, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 2 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml pepstatin, and 5 µg/ml leupeptin). Results are expressed as change of fluorescence intensity/h/mg prot.

### *Statistical analysis*

Statistical significance was determined by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparison test. A value of  $p < 0.05$  was accepted as denoting statistical significance.

## References

1. Thompson CB (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, **267**: 1456-1462.

2. Mattson MP (2000) Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*, **1**: 120-129.
3. Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG, Earnshaw WC (1994) Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature*, **371**: 346-347.
4. Alnemri ES (1997) Mammalian cell death proteases: a family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases. *J. Cell Biochem.*, **64**: 33-42.
5. Kolesnick RN (1991) Sphingomyelin and derivatives as cellular signals. *Prog. Lipid Res*, **30**: 1-38.
6. Hannun YA (1994) The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide. *J Biol Chem*, **269**: 3125-3128.
7. Obeid LM, Linardic CM, Karolak LA, Hannun YA (1993) Programmed cell death induced by ceramide. *Science*, **259**: 1769-1771.
8. Kolesnick R, Hannun YA (1999) Ceramide and apoptosis. *Trends Biochem Sci*, **24**: 224-225.
9. Hartfield PJ, Mayne GC, Murray AW (1997) Ceramide induces apoptosis in PC12 cells. *FEBS Lett.*, **401**: 148-152.
10. Brugg B, Michel PP, Agid Y, Ruberg M (1996) Ceramide induces apoptosis in cultured mesencephalic neurons. *J Neurochem*, **66**: 733-739.
11. Stoica BA, Movsesyan VA, Lea PM, Faden AI (2003) Ceramide-induced neuronal apoptosis is associated with dephosphorylation of Akt, BAD, FKHR, GSK-3beta, and induction of the mitochondrial-dependent intrinsic caspase pathway. *Mol. Cell Neurosci*, **22**: 365-382.
12. Wiesner DA, Dawson G (1996) Staurosporine induces programmed cell death in embryonic neurons and activation of the ceramide pathway. *J Neurochem*, **66**: 1418-1425.
13. Ito A, Horigome K (1995) Ceramide prevents neuronal programmed cell death induced by nerve growth factor deprivation. *J Neurochem*, **65**: 463-466.

## RESULTADOS

14. Williams RW, Herrup K (1988) The control of neuron number. *Annu. Rev. Neurosci*, **11**: 423-453.
15. Wood KA, Dipasquale B, Youle RJ (1993) In situ labeling of granule cells for apoptosis-associated DNA fragmentation reveals different mechanisms of cell loss in developing cerebellum. *Neuron*, **11**: 621-632.
16. Gallo V, Kingsbury A, Balazs R, Jorgensen OS (1987) The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J Neurosci*, **7**: 2203-2213.
17. Toman RE, Movsesyan V, Murthy SK, Milstien S, Spiegel S, Faden AI (2002) Ceramide-induced cell death in primary neuronal cultures: upregulation of ceramide levels during neuronal apoptosis. *J Neurosci Res*, **68**: 323-330.
18. Manev H, Cagnoli CM (1997) Ceramide-mediated and isoquinolinesulfonamide-sensitive pathways of neuronal death: anything in common? *Neurochem Int.*, **31**: 203-206.
19. Centeno F, Mora A, Fuentes JM, Soler G, Claro E (1998) Partial lithium-associated protection against apoptosis induced by C2- ceramide in cerebellar granule neurons. *Neuroreport*, **9**: 4199-4203.
20. D'Mello SR, Aglieco F, Roberts MR, Borodezt K, Haycock JW (1998) A DEVD-inhibited caspase other than CPP32 is involved in the commitment of cerebellar granule neurons to apoptosis induced by K<sup>+</sup> deprivation. *J Neurochem*, **70**: 1809-1818.
21. Moran J, Itoh T, Reddy UR, Chen M, Alnemri ES, Pleasure D (1999) Caspase-3 expression by cerebellar granule neurons is regulated by calcium and cyclic AMP. *J Neurochem*, **73**: 568-577.
22. Caballero-Benitez A, Moran J (2003) Caspase activation pathways induced by staurosporine and low potassium: role of caspase-2. *J Neurosci Res*, **71**: 383-396.
23. Vaudry D, Falluel-Morel A, Basille M, Pamantung TF, Fontaine M, Fournier A, Vaudry H, Gonzalez BJ (2003) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide prevents C2-ceramide-induced apoptosis of cerebellar granule cells. *J Neurosci Res*, **72**: 303-316.

24. Monti B, Zanghellini P, Contestabile A (2001) Characterization of ceramide-induced apoptotic death in cerebellar granule cells in culture. *Neurochem Int.*, **39**: 11-18.
25. Thon L, Mohlig H, Mathieu S, Lange A, Bulanova E, Winoto-Morbach S, Schutze S, Bulfone-Paus S, Adam D (2005) Ceramide mediates caspase-independent programmed cell death. *FASEB J.*, **19**: 1945-1956.
26. Taniwaki T, Yamada T, Asahara H, Ohyagi Y, Kira J (1999) Ceramide induces apoptosis to immature cerebellar granule cells in culture. *Neurochem Res*, **24**: 685-690.
27. Monti B, Zanghellini P, Contestabile A (2001) Characterization of ceramide-induced apoptotic death in cerebellar granule cells in culture. *Neurochem. Int.*, **39**: 11-18.
28. Vaudry D, Falluel-Morel A, Basille M, Pamantung TF, Fontaine M, Fournier A, Vaudry H, Gonzalez BJ (2003) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide prevents C2-ceramide-induced apoptosis of cerebellar granule cells. *J Neurosci Res*, **72**: 303-316.
29. Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP, Rasper DM, Timkey T, Garcia-Calvo M, Houtzager VM, Nordstrom PA, Roy S, Vaillancourt JP, Chapman KT, Nicholson DW (1997) A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem*, **272**: 17907-17911.
30. Eldadah BA, Yakovlev AG, Faden AI (1997) The role of CED-3-related cysteine proteases in apoptosis of cerebellar granule cells. *J. Neurosci.*, **17**: 6105-6113.
31. Krajewski S, Krajewska M, Ellerby LM, Welsh K, Xie Z, Deveraux QL, Salvesen GS, Bredesen DE, Rosenthal RE, Fiskum G, Reed JC (1999) Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**: 5752-5757.
32. Juo P, Kuo CJ, Yuan J, Blenis J (1998) Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Curr. Biol*, **8**: 1001-1008.

## RESULTADOS

33. Chen J, Nagayama T, Jin K, Stetler RA, Zhu RL, Graham SH, Simon RP (1998) Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia. *J Neurosci*, **18**: 4914-4928.
34. Cohen GM (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*, **326 ( Pt 1)**: 1-16.
35. Nicholson DW, Thornberry NA (1997) Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci*, **22**: 299-306.
36. D'Mello SR, Aglieco F, Roberts MR, Borodezt K, Haycock JW (1998) A DEVD-inhibited caspase other than CPP32 is involved in the commitment of cerebellar granule neurons to apoptosis induced by K<sup>+</sup> deprivation. *J Neurochem*, **70**: 1809-1818.
37. Moran J, Itoh T, Reddy UR, Chen M, Alnemri ES, Pleasure D (1999) Caspase-3 expression by cerebellar granule neurons is regulated by calcium and cyclic AMP. *J. Neurochem.*, **73**: 568-577.
38. Gerhardt E, Kugler S, Leist M, Beier C, Berliocchi L, Volbracht C, Weller M, Bahr M, Nicotera P, Schulz JB (2001) Cascade of caspase activation in potassium-deprived cerebellar granule neurons: targets for treatment with peptide and protein inhibitors of apoptosis. *Mol. Cell Neurosci.*, **17**: 717-731.
39. Melchiorri D, Martini F, Lococo E, Gradini R, Barletta E, De Maria R, Caricasole A, Nicoletti F, Lenti L (2002) An early increase in the disialoganglioside GD3 contributes to the development of neuronal apoptosis in culture. *Cell Death Differ.*, **9**: 609-615.
40. Castiglione M, Spinsanti P, Iacovelli L, Lenti L, Martini F, Gradini R, Di GG, V, Caricasole A, Caruso A, De Maria R, Nicoletti F, Melchiorri D (2004) Activation of Fas receptor is required for the increased formation of the disialoganglioside GD3 in cultured cerebellar granule cells committed to apoptotic death. *Neuroscience*, **126**: 889-898.
41. Keane RW, Srinivasan A, Foster LM, Testa MP, Ord T, Nonner D, Wang HG, Reed JC, Bredesen DE, Kayalar C (1997) Activation of CPP32 during apoptosis of neurons and astrocytes. *J Neurosci Res*, **48**: 168-180.

42. Movsesyan VA, Yakovlev AG, Dabaghyan EA, Stoica BA, Faden AI (2002) Ceramide induces neuronal apoptosis through the caspase-9/caspase-3 pathway. *Biochem Biophys. Res Commun.*, **299**: 201-207.
43. Cecconi F, Alvarez-Bolado G, Meyer BI, Roth KA, Gruss P (1998) Apaf1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development. *Cell*, **94**: 727-737.
44. Yoshida H, Kong YY, Yoshida R, Elia AJ, Hakem A, Hakem R, Penninger JM, Mak TW (1998) Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. *Cell*, **94**: 739-750.
45. Wagner KW, Engels IH, Deveraux QL (2004) Caspase-2 can function upstream of bid cleavage in the TRAIL apoptosis pathway. *J Biol Chem*, **279**: 35047-35052.
46. Zhou H, Summers SA, Birnbaum MJ, Pittman RN (1998) Inhibition of Akt kinase by cell-permeable ceramide and its implications for ceramide-induced apoptosis. *J Biol Chem*, **273**: 16568-16575.
47. Stoica BA, Movsesyan VA, Lea IV PM, Faden AI (2003) Ceramide-induced neuronal apoptosis is associated with dephosphorylation of Akt, BAD, FKHR, GSK-3[ $\beta$ ], and induction of the mitochondrial-dependent intrinsic caspase pathway. *Mol Cell Neurosci*, **22**: 365-382.
48. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*, **91**: 231-241.
49. Butt AJ, Harvey NL, Parasivam G, Kumar S (1998) Dimerization and autoprocessing of the Nedd2 (caspase-2) precursor requires both the prodomain and the carboxyl-terminal regions. *J Biol Chem*, **273**: 6763-6768.
50. Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol. Methods*, **65**: 55-63.

**Titles and legends to figures**

**Figure 1.** Effect of C<sub>2</sub>-ceramide on the viability and morphology of CGC. At 7 DIV the cultures of CGC grown in K25 were treated with 3, 10, 30, 40 and 60  $\mu$ M of C<sub>2</sub>-ceramide. **A.** Cell viability of CGC was evaluated as MTT transformation (see details in Materials and Methods). MTT transformation was measured 24 (■) and 48 h (□) after application of different concentrations of C<sub>2</sub>-ceramide. Values are mean  $\pm$  S.E.M of 5 independent experiments performed in triplicate. Significantly different from control (0 h); \* (p<0.01), \*\* (p<0.001). **B.** Cultures were observed under phase contrast after 24 h or 48 h. Scale bar = 50  $\mu$ M.

**Figure 2.** Oligo-nucleosomal cleavage of genomic DNA and nuclear condensation in C<sub>2</sub>-ceramide-treated CGC. **A.** Cerebellar granule neurons were cultured in either medium alone (K25 control), low potassium medium (K5) or K25 plus 40  $\mu$ M C<sub>2</sub>-ceramide for 24 h or 48 h. Only genomic DNA from K5 and ceramide-treated CGC revealed the typical ladder-like pattern. In parallel, the amount of high-molecular-weight genomic DNA decreased with ceramide treatment. **B.** CGC were cultured in K25 until 8 DIV when the medium was either changed towards a K5-based medium or K25 with C<sub>2</sub>-ceramide 40  $\mu$ M. Chromatin condensation was determined at 9 DIV after Hoechst staining. Note the appearance of several condensed or fragmented nuclei in K5 or C<sub>2</sub>-ceramide vs. K25. Cells were counted from 3 independent experiments. In each experiment > 500 cells were examined from at least 3 culture wells for each condition. Results are mean  $\pm$  S.E.M.

**Figure 3.** Effect of C<sub>2</sub>-ceramide on the activation (DEVD cleavage) and proteolysis of caspase-3 in CGC. Cells maintained in K25 (C) for 7 DIV were treated with 40  $\mu$ M of C<sub>2</sub>-ceramide for the indicated periods of time. **A.** Time course of caspase-3 activity measured as the cleavage of Ac-DEVD-AMC. Results are expressed as delta of fluorescence per hour per milligram of protein. Values are mean  $\pm$  SD of 4 independent experiments performed in triplicate. \* denotes significant differences vs. control (K25) CGC (p<0.05). **B.** Time course of C<sub>2</sub>-ceramide-mediated procaspase-3 proteolysis. The appearance of the 17 kDa band was revealed by western blotting. A representative blot is shown. Densitometric analysis of the 17 kD band is the mean  $\pm$  S.E.M of 6 independent experiments. Analysis was done as detailed in Materials and Methods. \* p<0.05 vs. K25 cultures. **C.** Time course of PARP fragmentation induced by C<sub>2</sub>-ceramide in CGC revealed by western blot. Arrows indicate intact (116 kDa) and the 85

kDa fragment of PARP, generated by caspase-3 after different times of C<sub>2</sub>-ceramide application.

**Figure 4.** Determination of cleaved caspase-3 in C<sub>2</sub>-ceramide-treated CGC. 7 DIV cultures grown in K25 were treated with 40 μM of C<sub>2</sub>-ceramide for 8, 12, 24, 36 and 48 h and immunostained with an antibody against cleaved caspase-3. Immunoreactivity to active caspase-3 was observed in cultures exposed to C<sub>2</sub>-ceramide or staurosporine treatment. No activation of caspase-3 was evident in control (K25) cultures.

**Figure 5.** Effect of C<sub>2</sub>-ceramide on the activation (LEHD cleavage) and proteolysis of caspase-9 in CGC. Cells maintained in K25 (C) for 7 DIV were treated with 40 μM of C<sub>2</sub>-ceramide for the indicated periods of time. **A.** Time course of caspase-9 activity measured as the cleavage of Ac-LEHD-AMC. Results are expressed as delta of fluorescence per hour per milligram of protein. Values are mean ± S.E.M of 4 independent experiments performed in triplicate. \* p<0.05 vs. control (K25). **B.** Time course of C<sub>2</sub>-ceramide-mediated procaspase-9 proteolysis. The presence of the active fragment (10 kDa) of the caspase-9 was revealed by western blotting. A representative blot is shown. Densitometric analysis of the 10 kDa band is the mean ± S.E.M of 4 independent experiments. Analysis was done as detailed in Materials and Methods. \* p<0.05 vs. K25 cultures.

**Figure 6.** Determination of cleaved caspase-9 in C<sub>2</sub>-ceramide-treated CGC. 7 DIV cultures grown in K25 were treated with 40 μM of C<sub>2</sub>-ceramide for 3, 8, 12, 24 and 48 h and immunostained with an antibody against cleaved caspase-9. Immunoreactivity to active caspase-9 was observed in cultures exposed to C<sub>2</sub>-ceramide or staurosporine treatment. No activation of caspase-9 was evident in control (K25) cultures.

**Figure 7.** C<sub>2</sub>-ceramide induces the release of cytochrome-c from mitochondria in CGC. Cells maintained in K25 (C) for 7 DIV were treated with 40 μM of C<sub>2</sub>-ceramide for the indicated periods of time. Cells were fractionated to yield mitochondrial and cytosolic fractions as described in Materials and Methods. Representative western blot of cytochrome-c in the mitochondrial (**A**) and cytosolic (**B**) fractions of CGC are shown.

**Figure 8.** Effect of C<sub>2</sub>-ceramide on activation (IETD cleavage) and proteolysis of caspase-8 in CGC. Cells maintained in K25 (C) for 7 DIV were treated with 40 μM of C<sub>2</sub>-ceramide for the indicated periods of time. **A.** Time course of caspase-8 activation measured as cleavage of Ac-IETD-AMC. Results are expressed as delta of



## RESULTADOS

fluorescence per hour per milligram of protein. Values are mean  $\pm$  S.E.M of 4 independent experiments performed in triplicate. \*  $p < 0.05$  vs. control (K25). **B.** Time course of procaspase-8 proteolysis by 40  $\mu$ M of C<sub>2</sub>-ceramide was analyzed by western blot. Bands correspond to the cleavage product of caspase-8 proenzyme (20 kDa). A representative blot is shown. Densitometric analysis of the 20 kDa band is the mean  $\pm$  S.E.M of 4 independent experiments. Analysis was done as detailed in Materials and Methods. \*  $p < 0.05$  vs. K25 cultures

**Figure 9.** Effect of C<sub>2</sub>-ceramide on the activation (VDVAD cleavage) and proteolysis of caspase-2 in CGC. Cells maintained in K25 (C) for 7 DIV were treated with 40  $\mu$ M of C<sub>2</sub>-ceramide for the indicated periods of time. **A.** Time course of caspase-2 activation measured by the cleavage of Ac-VDVAD-AMC. Results are expressed as delta of fluorescence per hour per milligram of protein. Values are mean  $\pm$  S.E.M of 4 independent experiments performed in triplicate. \*  $p < 0.05$  vs. control (K25). **B.** Time course of procaspase-2 proteolysis by 40  $\mu$ M of C<sub>2</sub>-ceramide was analyzed by western blot. Bands correspond to the cleavage product of caspase-2 proenzyme (12 kDa). A representative blot is shown. Densitometric analysis of the 12 kDa band is the mean  $\pm$  S.E.M of 4 independent experiments. Analysis was done as detailed in Materials and Methods. \*  $p < 0.05$  vs. K25 cultures

**Figure 10.** Effect of caspase inhibitors on the morphology of C<sub>2</sub>-ceramide induced cell death. Cells were cultured for 7 DIV and then treated with 40  $\mu$ M of C<sub>2</sub>-ceramide for 48 h in the presence or absence of caspase inhibitors (10  $\mu$ M). Scale bar = 50  $\mu$ M.

### Supplemental Figure A

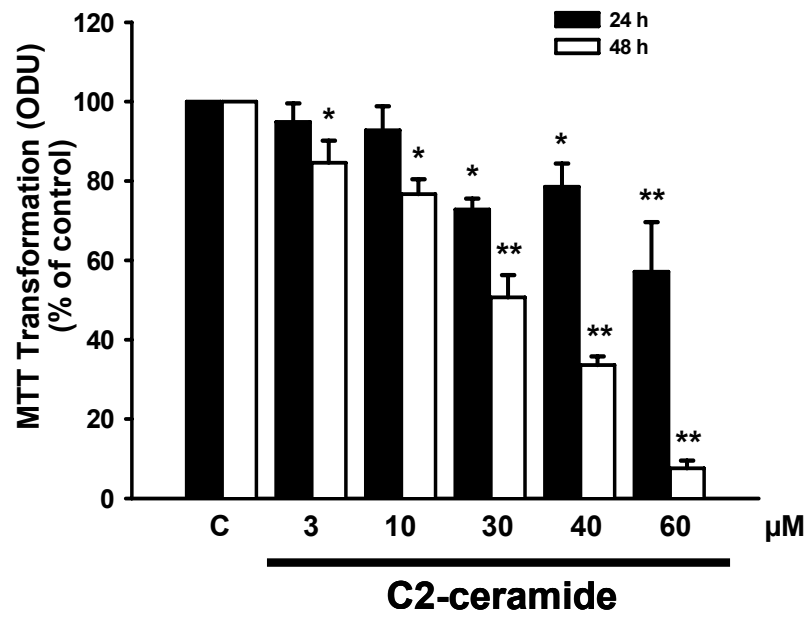
Effect of caspase inhibitors on CGC viability in cultures treated with C<sub>2</sub>-ceramide. Cells were grown for 7 DIV and then treated with 40  $\mu$ M of C<sub>2</sub>-ceramide for 48 h in the presence or absence of caspase inhibitors (10  $\mu$ M). Cell viability was determined by the MTT assay. Results are mean  $\pm$  S.E.M of three experiments performed in triplicate. \*  $p < 0.05$  vs. C<sub>2</sub>-ceramide treated cultures.

### Supplemental Figure B

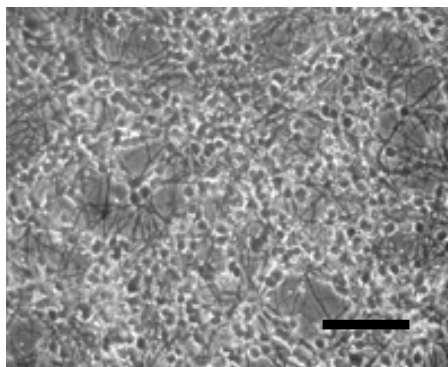
Caspase-2 and -9 are independently activated by ceramide. Cultures grown for 7 DIV were treated with 40  $\mu$ M of C<sub>2</sub>-ceramide for 48 h in the presence or absence of caspase-2 or -9 inhibitors (10  $\mu$ M). Caspase-2 and -9 activities were determined by the

cleavage of LEHD-AMC (caspase-9; A) or VDVAD-AMC (caspase-2; B). Results are expressed as delta of fluorescence per hour per milligram of protein. Values are mean  $\pm$  S.E.M of 2 independent experiments performed in triplicate. \*  $p < 0.05$  vs. control (K25).

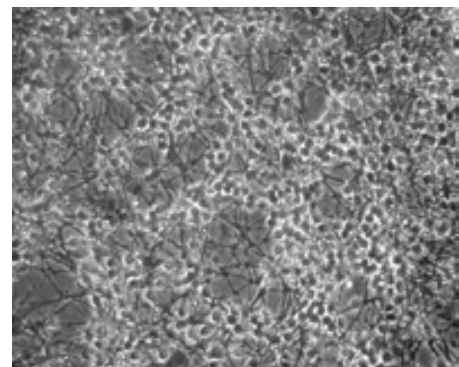
**A**



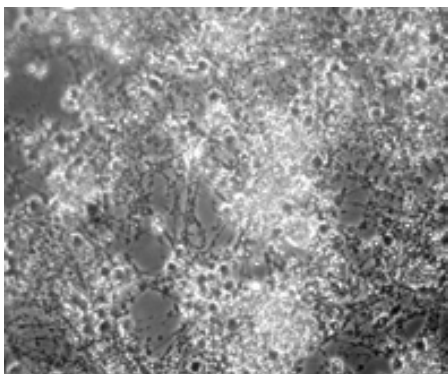
**B**



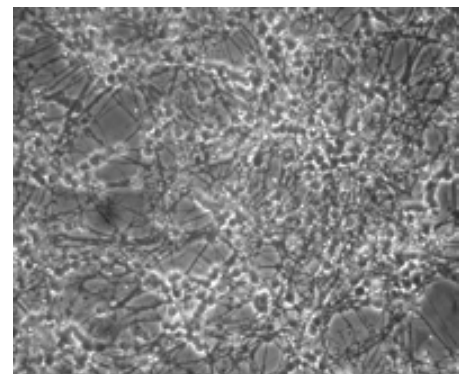
**K25**



**C2-ceramide 24h**



**C2-ceramide 48h**



**C2-ceramide+ZVAD-CHO 48h**

*Fig 1 – Caballero-Benitez*

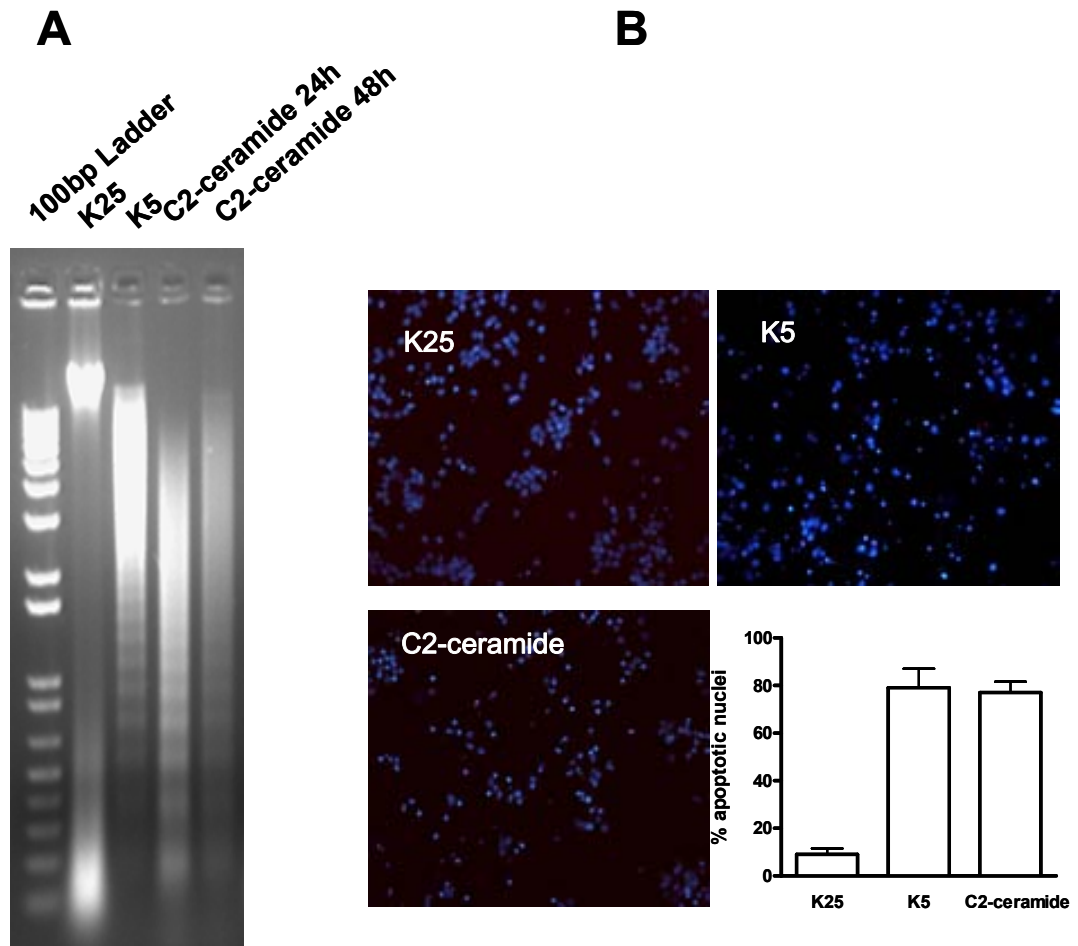
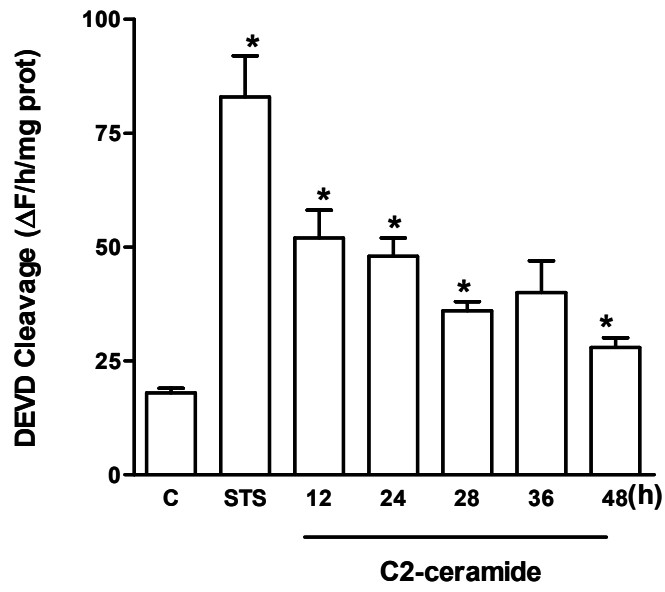
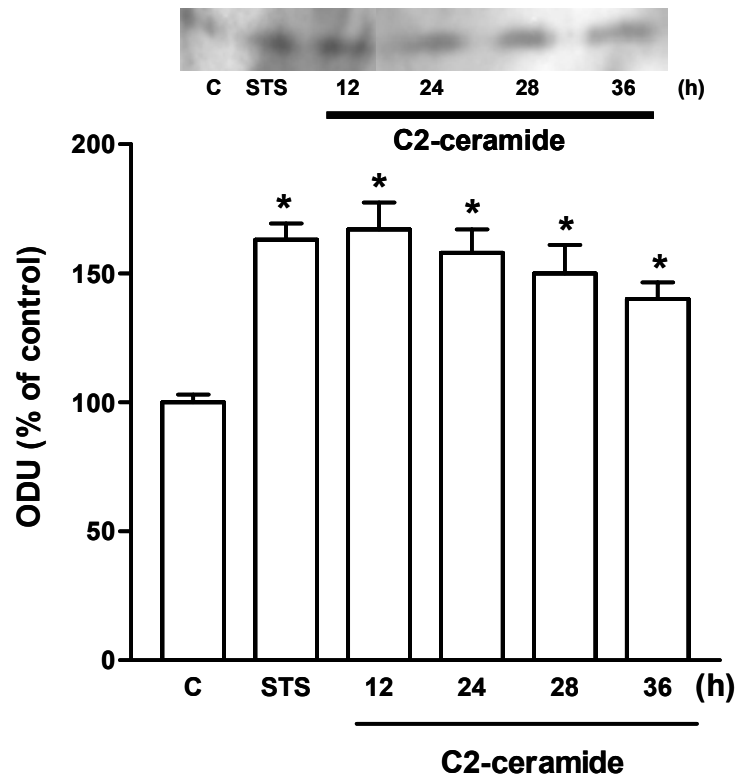


Fig 2 – Caballero-Benitez

**A**



**B**



**C**

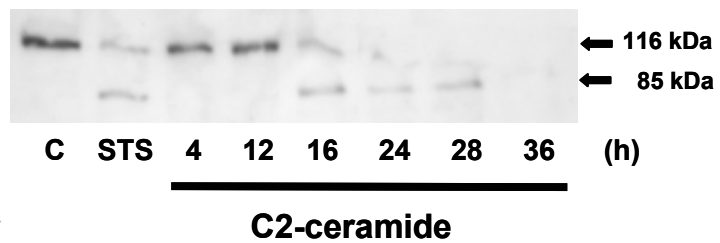


Fig 3 – Caballero-Benitez

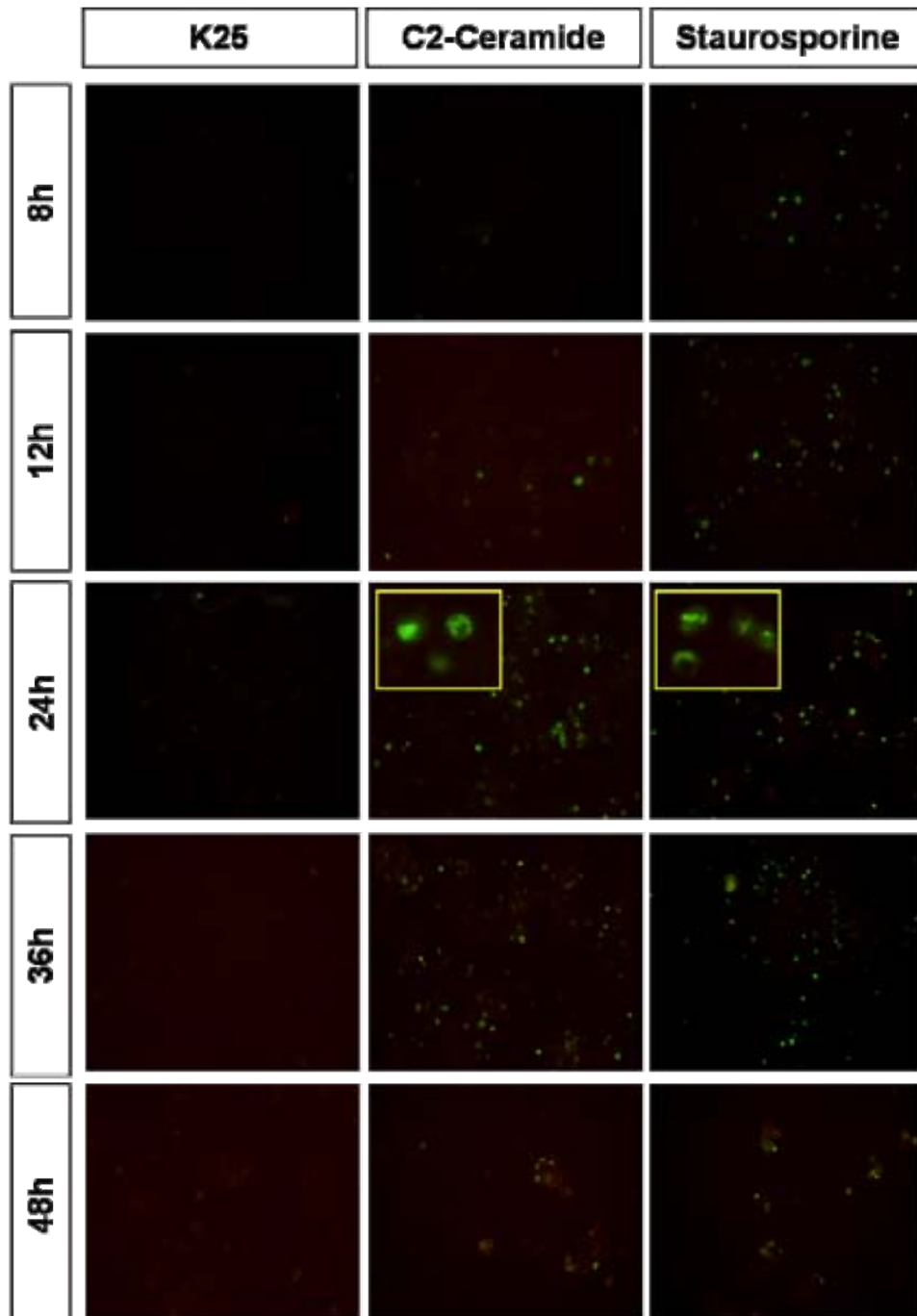
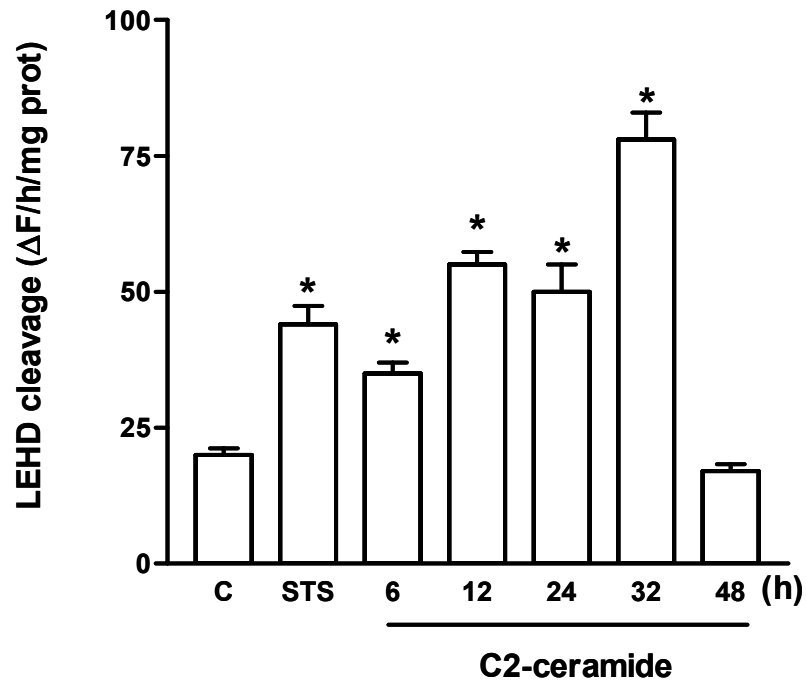


Fig 4 – Caballero-Benitez

**A**



**B**

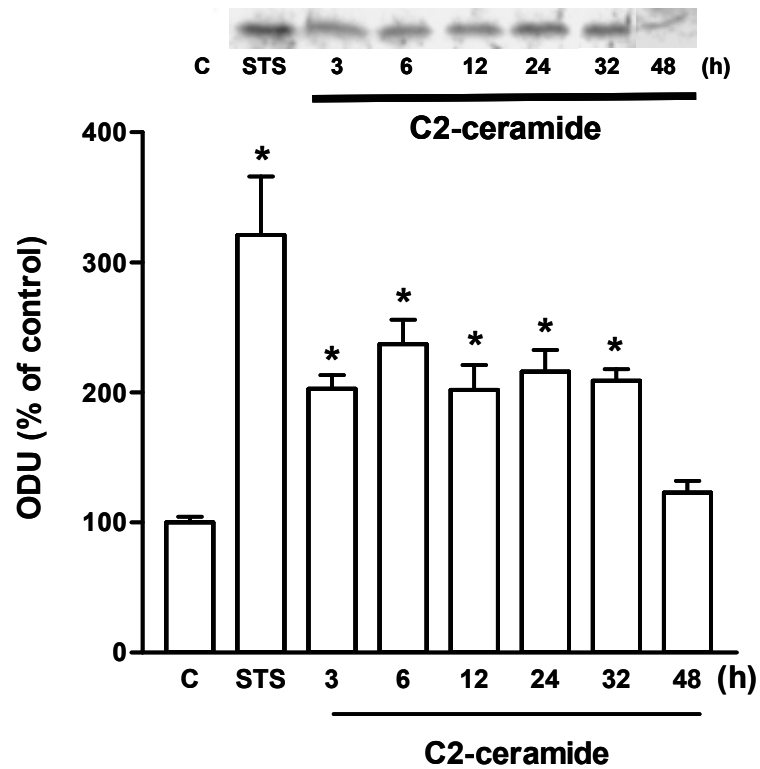


Fig 5 – Caballero-Benitez

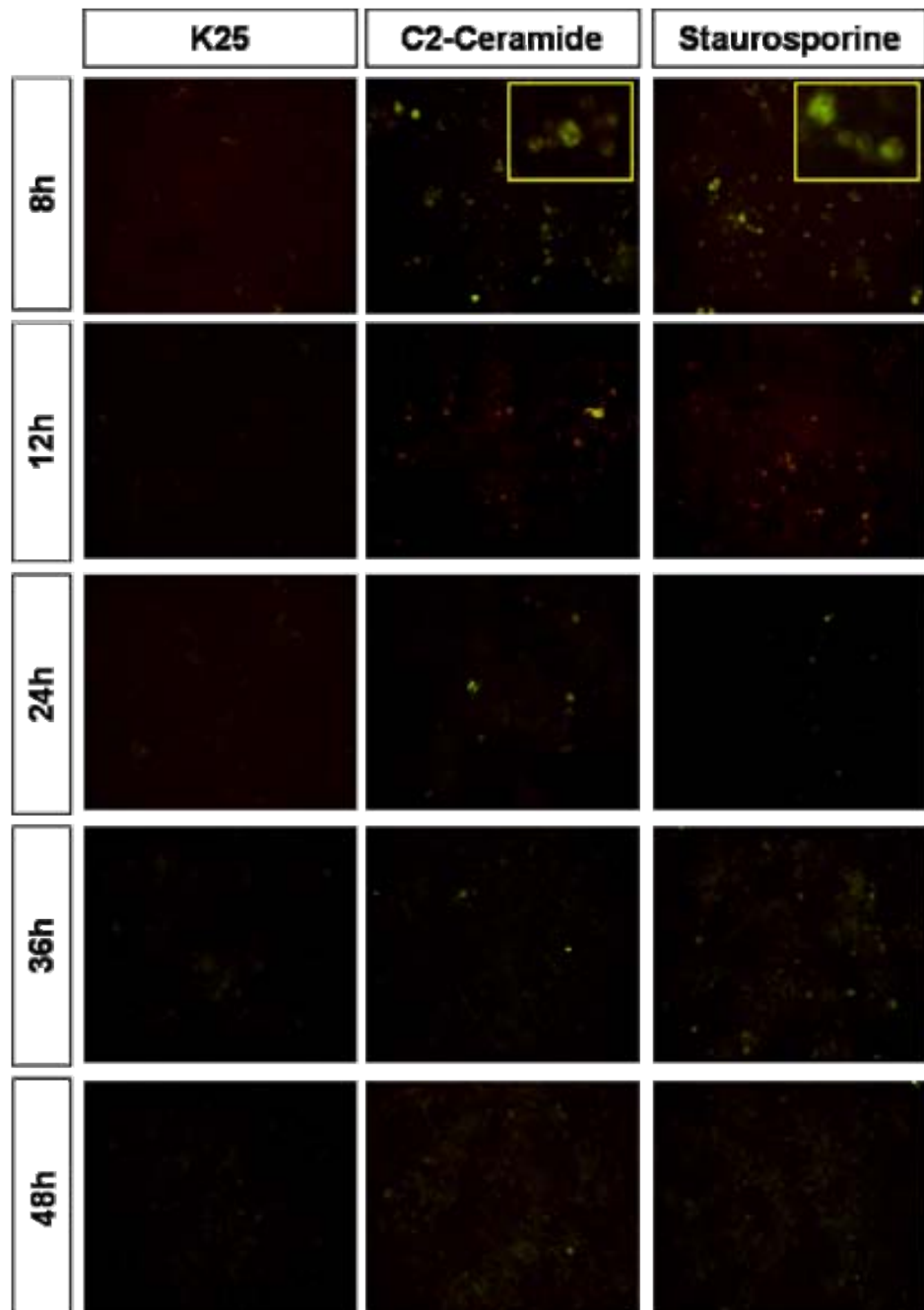
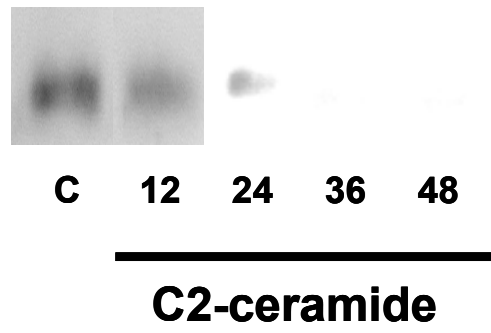


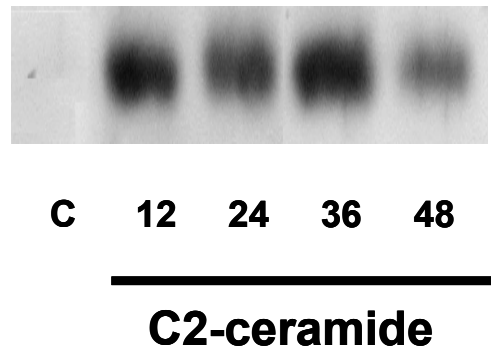
Fig 6 – Caballero-Benitez



**A**

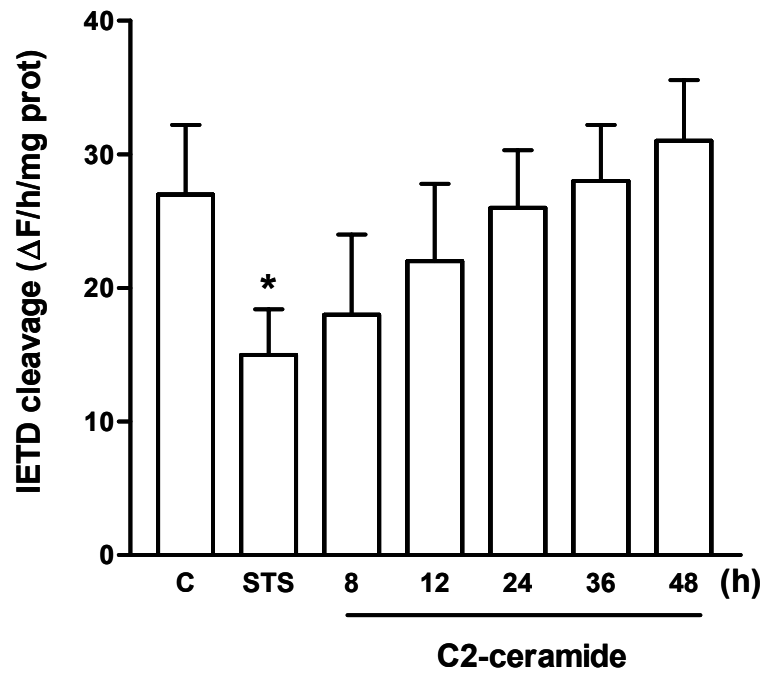


**B**



*Fig 7 – Caballero-Benitez*

**A**



**B**

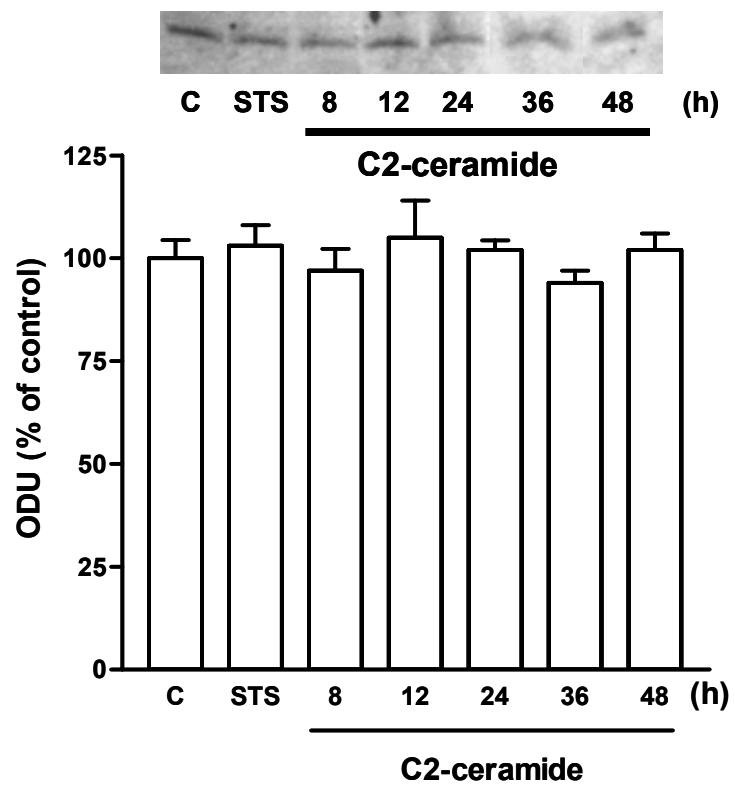
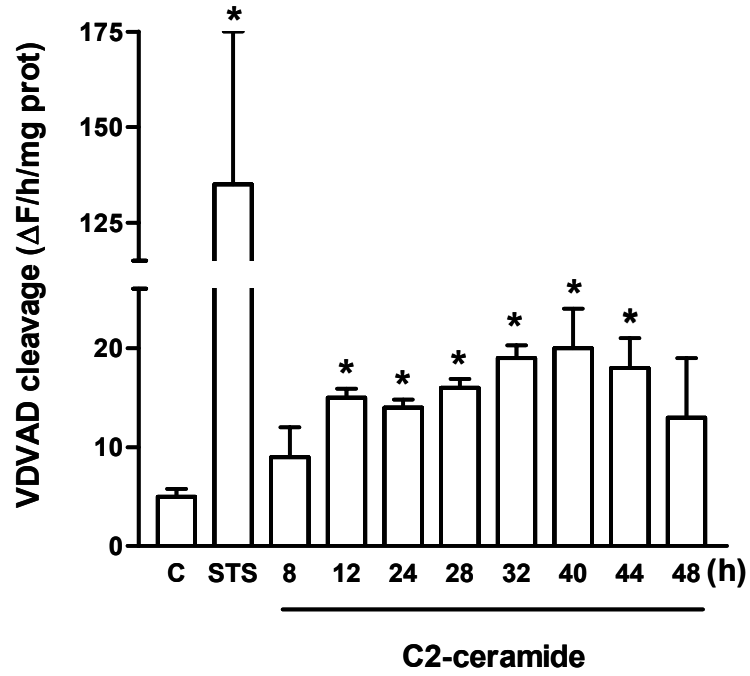


Fig 8 – Caballero-Benitez

**A**



**B**

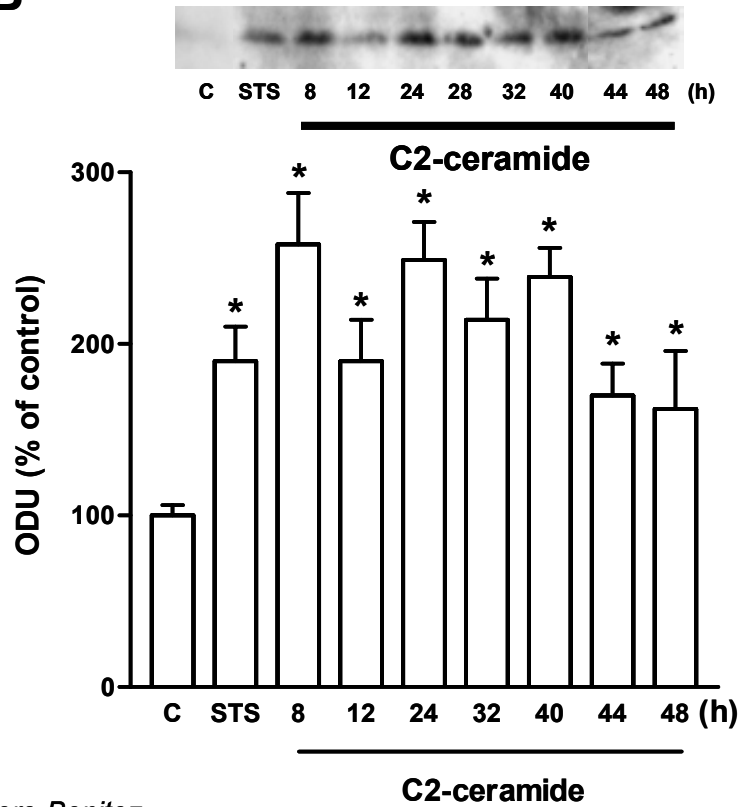
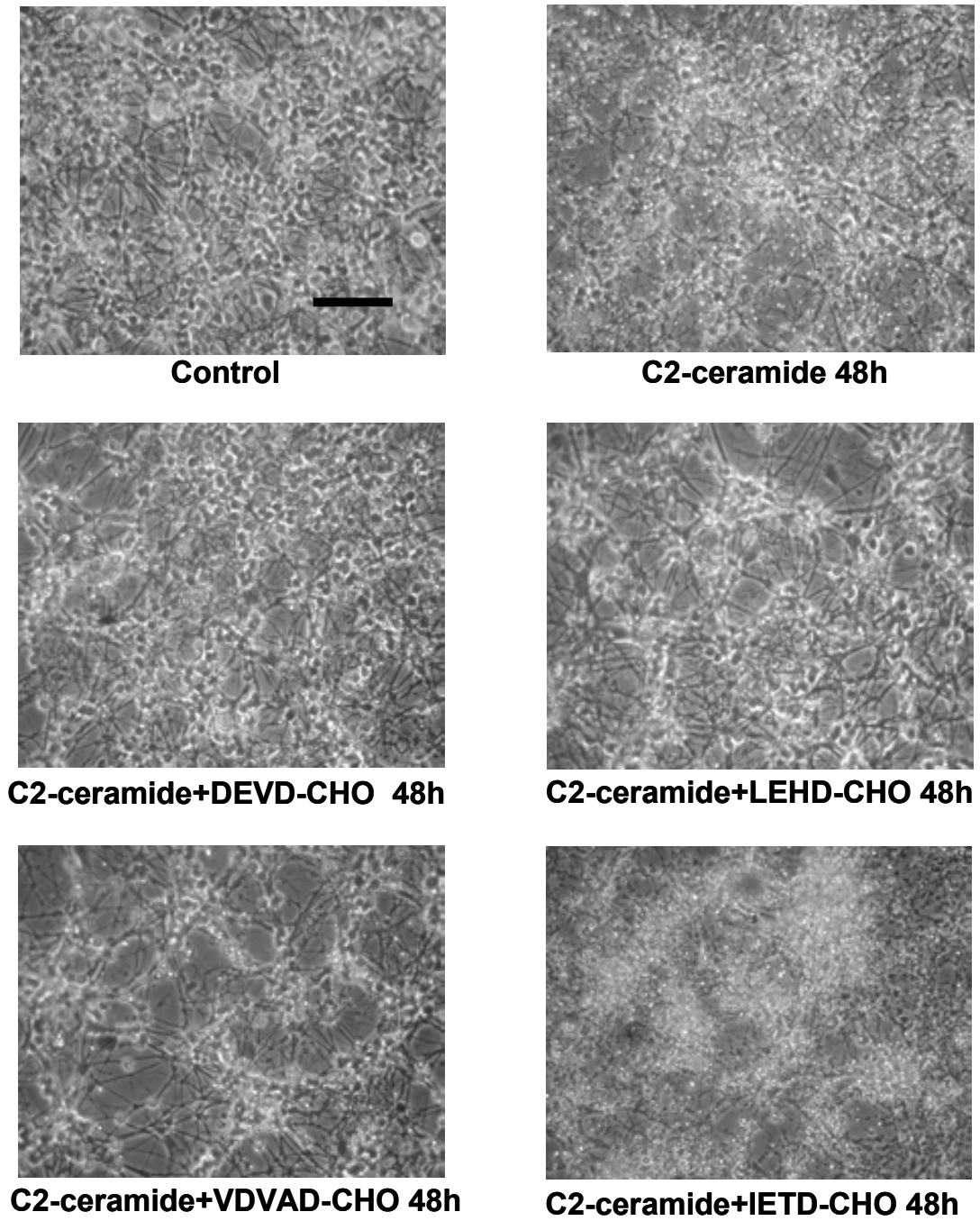
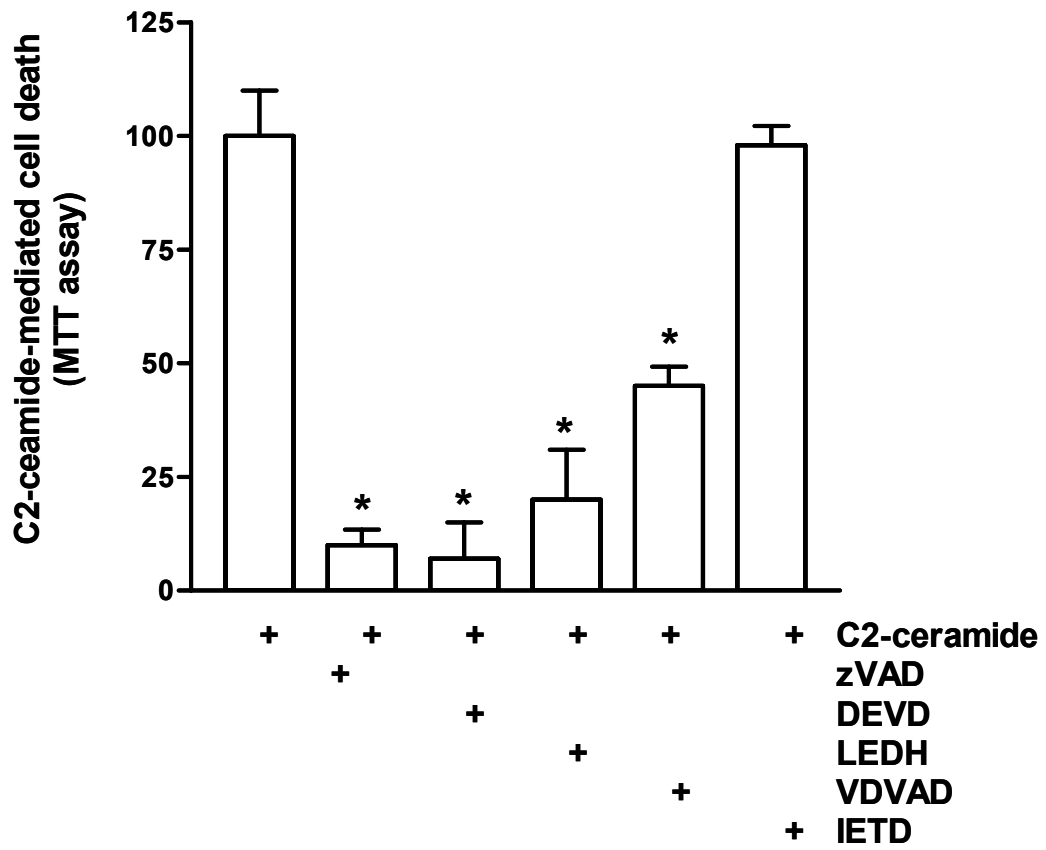


Fig 9 – Caballero-Benitez

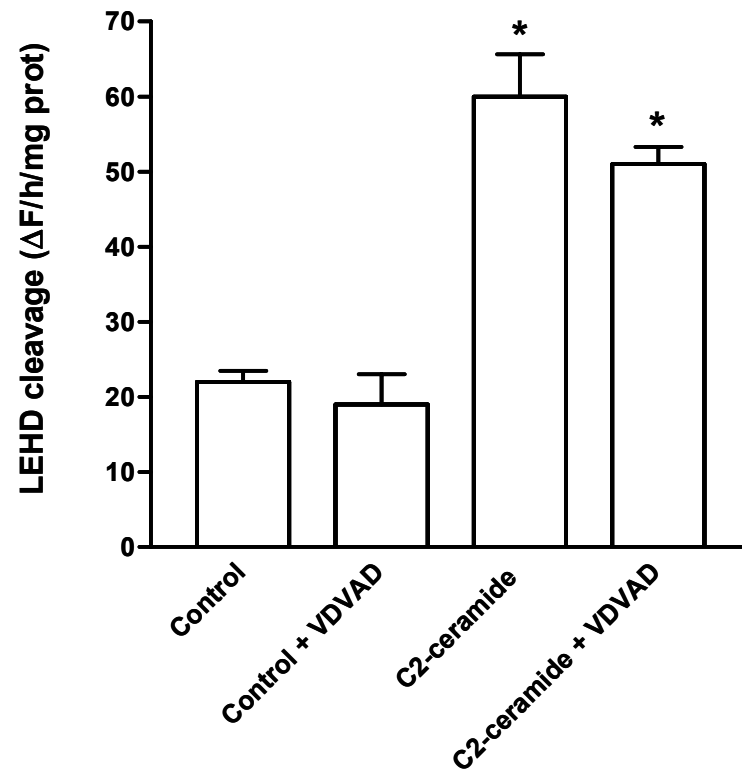
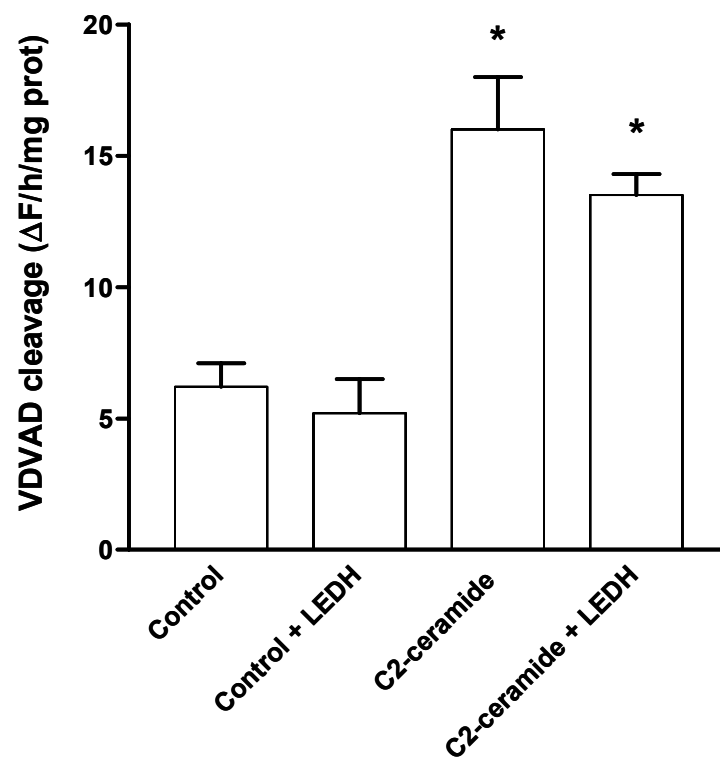


*Fig 10 – Caballero-Benitez*

**A**



*Additional figure A – Caballero-Benitez et al*

**A****B**

Additional figure B – Caballero-Benitez et al

## 1.1 Anexo del Trabajo 1:

### **C2-ceramida inhibe la actividad de Akt e induce la activación de ERK1/2.**

Como hemos visto anteriormente en el primer trabajo, C2-ceramida induce muerte apoptótica en las CGCs debido a la activación de caspasas, activando tanto la caspasa-2, caspasa-9 como la caspasa-3.

La activación de caspasa 9 en la muerte por C2-ceramida puede implicar la inhibición de la actividad Akt (Zhou et al., 1998), (Stoica et al., 2003). En la figura suplementaria 1A se observa como la C2-ceramida inhibe la activación basal de Akt a la vez que se produce un incremento en la vía de las MAPK. Está descrito que en neuronas corticales la C2-ceramida también puede alterar los niveles de fosforilación de ERK1/2 reduciéndolos inicialmente (Stoica et al., 2005). La vía de las MAPK se ha relacionado tanto con procesos de supervivencia y diferenciación celular como con procesos más relacionados a la muerte celular, en lo que podríamos llamar efecto dual de la vía (Colucci-D'Amato et al., 2003), (Cheung and Slack, 2004), (Subramaniam et al., 2004). Esta activación observada en nuestras CGCs puede estar relacionada con la muerte apoptótica ya que en presencia del inhibidor de MEK, PD98059 50 $\mu$ M, hay una ligera reducción de la muerte. A pesar de ello, la inhibición de ERK1/2 no es suficiente para poder inhibir la muerte apoptótica por C2-ceramida (figura suplementaria 1B).

### **17- $\beta$ -estradiol inhibe ERK1/2 pero no es suficiente para promover supervivencia neuronal en la muerte apoptótica por C2-ceramida.**

Durante los últimos años, numerosos trabajos han demostrado la creciente importancia de los estrógenos como agente neuroprotector frente a diferentes tipos de muerte neuronal, a través de mecanismos que todavía no están del todo claros. Se han desarrollado numerosos estudios sobre los mecanismos por los que los estrógenos pueden hacer frente a la muerte apoptótica. La prevención de la apoptosis implica por parte de los estrógenos el control de diversos procesos entre los cuales destacan la regulación de la actividad de las caspasas (Sawada et al., 2000), el mantenimiento de la integridad mitocondrial (Mattson et al., 1997), además de la estimulación de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 (Harms et al., 2001). En este sentido y en el contexto de la activación de la vía apoptótica intrínseca en la muerte por ceramida en las CGCs, quisimos ver si el E2 podría incidir en alguna de las etapas del desarrollo de la muerte apoptótica y promover la supervivencia de las CGCs. Con

## RESULTADOS

esa finalidad, primeramente observamos cómo se comportaban las CGCs en cultivo en presencia de E2 y si éste podía activar alguna de las vías de transducción de señales implicadas en los procesos de neuroprotección. Para ello, tratamos las CGCs en condiciones despolarizantes (K25) y en ausencia de B27, con E2 (10nM) y observamos el comportamiento tanto de la vía PI3-K/Akt como de la vía de las MAPK, MEK-ERK.

Como se observa en la figura suplementaria 1A, E2 activa la vía de las MAPK en las CGCs. A pesar de esa activación, no observamos una correlación con un efecto neuroprotector. Cuando tratamos las CGCs con diferentes concentraciones de E2, en presencia de C2-ceramida (60 $\mu$ M), no fueron capaces de proteger a las CGCs de la muerte apoptótica (figura suplementaria 2A). Quisimos mirar los efectos en la vía de las MAPK cuando pre-tratamos las CGCs con E2 durante 2hr (periodo de máxima activación de ERK1/2 por E2) y añadimos C2-ceramida 60 $\mu$ M. Para nuestra sorpresa, la activación previa de ERK1/2 por E2 inhibía la posterior activación de la vía por C2-ceramida (figura suplementaria 2B). A pesar de este efecto, el E2 no podía proteger las CGCs de la muerte apoptótica. Probablemente, el hecho de que E2 no pueda activar la vía Akt y que C2-ceramida ejerza un efecto inhibitor de esta vía pueda ser la causa por la cual no se produzca un efecto positivo en las CGCs, ya que en estas células esta vía parece ser clave en cualquier intento de protegerlas de la muerte apoptótica (Subramaniam et al., 2005).



## 1.2 Leyenda de las figuras suplementarias del Trabajo 1:

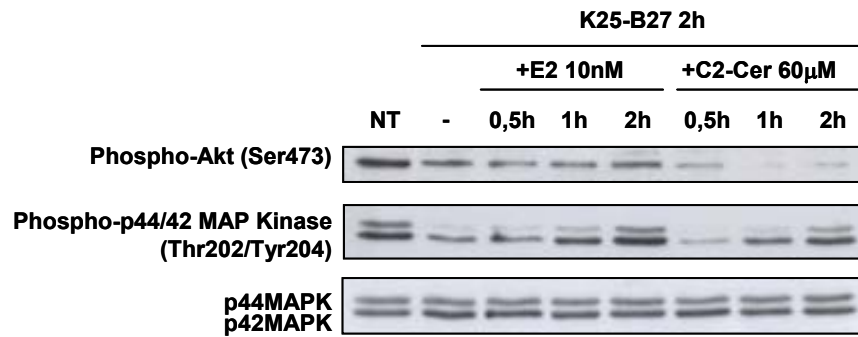
**Figura Suplementaria 1.- A C2-ceramida inhibe la actividad de Akt e induce la activación de ERK1/2.** CGCs fueron privadas de B27 a los 8 DIV durante 2hr antes de ser tratadas con C2-ceramida (60 $\mu$ M) o E2 (10nM) durante los tiempos indicados en la figura. Posteriormente las células fueron lisadas y los extractos sometidos a western blot utilizando anticuerpos que reconocían la forma fosforilada tanto de Akt como de ERK1/2. Los niveles de ERK1/2 totales fueron determinados para controlar los niveles de proteína total (panel inferior). C2-ceramida disminuye los niveles basales de Akt a lo largo del tiempo, mientras que el E2 no tiene ningún efecto sobre ella. Por el contrario, tanto E2 como C2-ceramida fueron capaces de activar ERK1/2 obteniendo un máximo de activación a las 2hr. Estos resultados son representativos de tres experimentos independientes. **B La inhibición de ERK1/2 no es suficiente para proteger las CGCs de la muerte por C2-ceramida.** CGCs fueron cultivadas en condiciones de K25 en medio DMEM con B27 durante 7 DIV. Las células fueron entonces privadas de B27 y tratadas con C2-ceramida (30 $\mu$ M y 60 $\mu$ M) en ausencia o en presencia de un inhibidor de la vía MAPK (PD98059 50 $\mu$ M) durante 24hr. En los tratamientos con el inhibidor, éste se añadió al cultivo 30 min. antes de privar de B27 y se volvió a añadir posteriormente junto al tratamiento con C2-ceramida. La viabilidad celular se determinó por el método del MTT a las 24hr. La presencia del PD en el cultivo redujo ligeramente la muerte de las CGCs tanto en presencia de 30mM como de 60mM de C2-cermida, aunque los resultados no fueron estadísticamente significativos. Estos resultados, media  $\pm$  SEM, son representativos de al menos tres experimentos independientes.

**Figura Suplementaria 2.- A E2 no protege las CGCs de la muerte apoptótica por C2-ceramida.** CGCs fueron cultivadas en condiciones de K25 en medio DMEM con B27 durante 7 DIV. Las células fueron entonces privadas de B27 y tratadas C2-ceramida (30 $\mu$ M y 60 $\mu$ M) en ausencia o en presencia de E2 (1nM a 10 $\mu$ M) durante 24hr. La viabilidad celular se determinó por el método del MTT a las 24hr. E2 no fue capaz de proteger las CGCs de la muerte a ninguna de las concentraciones utilizadas y tampoco frente a ninguna de las dos concentraciones de C2-ceramida presentes en el medio. Estos resultados, media  $\pm$  SEM, son representativos de al menos tres experimentos independientes. **B E2 inhibe la activación de ERK1/2 por C2-ceramida.** CGCs fueron cultivadas en condiciones de K25 en medio DMEM con B27 durante 8 DIV. Se privaron de B27 durante 2hr antes de ser tratadas E2 (10nM)

## RESULTADOS

durante 2hr. Posteriormente las células fueron tratadas con C2-ceramida (60 $\mu$ M) a los tiempos indicados en la figura, lisadas y los extractos sometidos a western blot utilizando anticuerpos que reconocían la forma fosforilada de ERK1/2. Los niveles de ERK1/2 totales fueron determinados para controlar los niveles de proteína total (panel inferior). C2-ceramida disminuye los niveles de fosforilación de ERK1/2 inducidos por E2 pero no puede volver a estimular ERK1/2 a los niveles obtenidos en ausencia de E2 y que estarían implicados en el mecanismo de muerte apoptótica. Estos resultados son representativos de tres experimentos independientes.

**A**



**B**

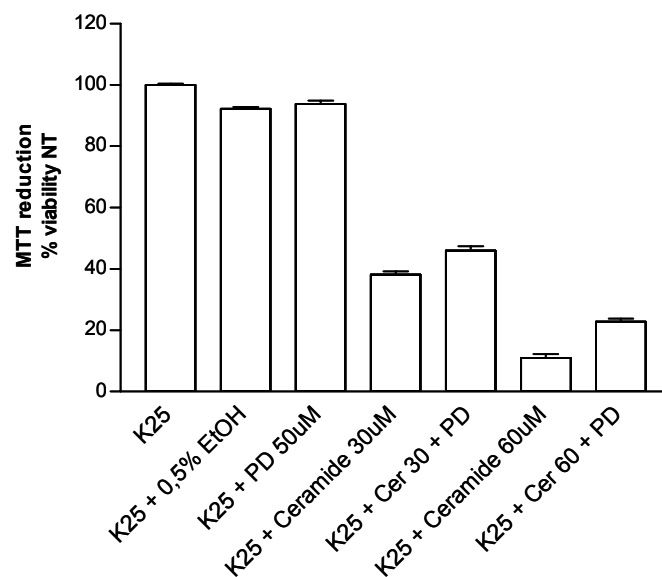
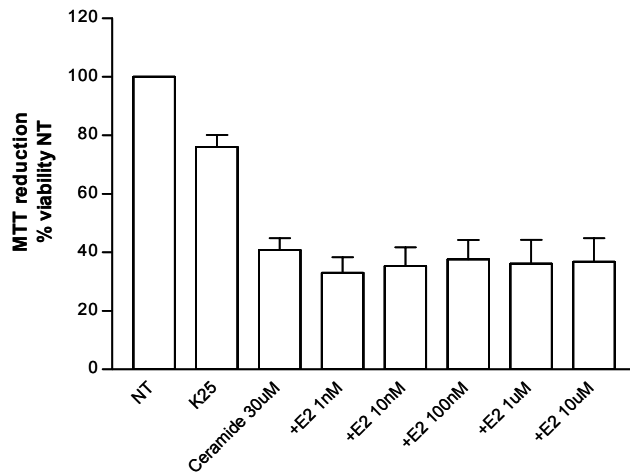
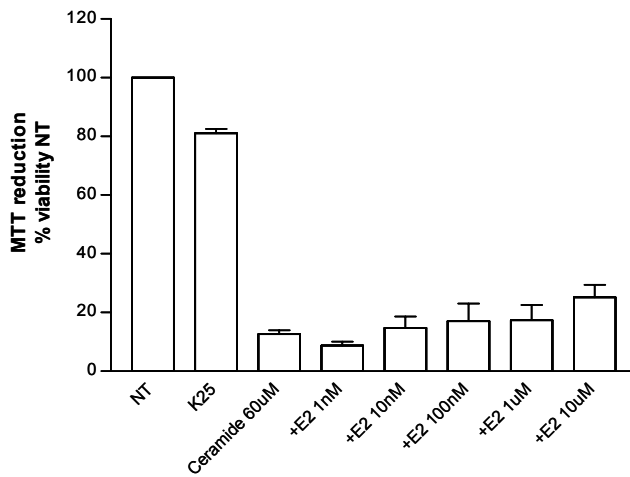


Figura Suplementaria 1

**A**



**C2-ceramide 30uM 24h**



**C2-ceramide 60uM 24h**

**B**

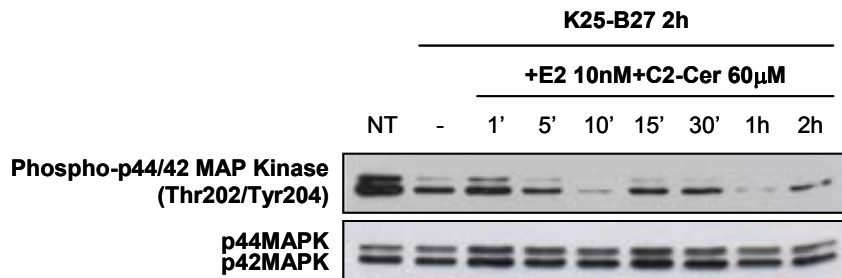


Figura Suplementaria 2

**2- Trabajo 2: *Estradiol does not protect cerebellar granule cells from neither excitotoxicity nor apoptosis.***

Enviado a *Journal of Neurochemistry*

## **Estradiol does not protect cerebellar granule cells from neither excitotoxicity nor apoptosis**

Alfredo Miñano<sup>1</sup>, Marco Antonio Cerbón<sup>1,2</sup>, Xavier Xifró<sup>1</sup>, Cristina Malagelada<sup>1</sup>, José Aguilera<sup>1</sup> & José Rodríguez-Alvarez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institut de Neurociències i Dpt. Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain and* <sup>2</sup>*Facultad de Químicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México.*

**Address correspondence and reprints request to:** José Rodríguez-Alvarez, Institut de Neurociències, Edifici M, Campus de Bellaterra, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Cerdanyola del Vallès, Barcelona, Spain.

Phone: (34) 935 813 861; Fax: (34) 935 814 152; Email: jose.rodriguez@uab.es

**Abbreviations used:** CGC, cerebellar granule cells; E2, 17- $\beta$ -estradiol; MAPK, mitogen-activated protein kinase; ERK, extracellular signal regulated kinase; MEK, extracellular signal regulated kinase kinase; PI3-K, phosphoinositide 3-Kinase; ER- $\alpha$ , estrogen receptor-alpha ; ER- $\beta$ , estrogen receptor-beta ; K25, 25mM KCl ; K5, 5mM KCl ; DES, diethylstilbestrol ; PBS, phosphate buffered saline ; FCS, fetal calf serum ; HS, horse serum ; DIV, days *in vitro* ; BSA, bovine serum albumine ; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium ; PI, propidium iodide ; TBS-T, tris buffered saline-tween ; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride ; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid ; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate ; IGF-I, Insulin-like growth factor-I ; IGF-IR, Insulin-like growth factor-I receptor.

**ABSTRACT**

Mounting evidences have suggested that estradiol could have a neuroprotective action in the CNS. In the present study we wanted to study whether this estrogen was able to protect cerebellar granule cells from apoptosis or excitotoxicity. Our results suggest that 17 $\beta$ -estradiol has no antiapoptotic effect in CGCs cultures. The lack of PI3K/Akt pathway activation in CGCs cultures could be in the basis of the failure of estradiol to protect CGCs from potassium-deprivation and ceramide-mediated apoptosis. Moreover, 17 $\beta$ -estradiol does not protect CGCs from glutamate-mediated death although it was able to activate MAPK pathway. These results will suggest that MAPK pathway activation is not sufficient to sustain a estrogen-mediated neuroprotective effect in CGCs cultures. We found that the estrogen had a significant neuroprotective effect against hydrogen peroxide-mediated neuronal death. This effect was due to the antioxidant properties of the chemical structure of estradiol since the biological inactive isomer 17 $\alpha$ -estradiol was also able to reduce hydrogen peroxide-mediated neuronal death.

***Running title*** : 17 $\beta$  estradiol and CGCs death

***Keywords***: Estradiol, neuronal death, apoptosis, excitotoxicity, cultures, cerebellum, survival

## INTRODUCTION

During the last decade, it has been shown that steroid hormones could have a neuroprotective function in the CNS. Estrogens seem to decrease the risk and delay the onset and development of some neurodegenerative diseases such as Alzheimer disease (Tang *et al.* 1996). Also, they have been reported to strength the recovery from acute neurologic injuries due to cerebral trauma (see for review Garcia-Segura *et al.* 2001). The beneficial effects of estrogens in certain CNS pathologies could be a consequence of their capability to promote neuronal survival. For example, it has been reported that estrogens could protect from apoptotic cell death. Treatment of cell cultures with 17- $\beta$ -estradiol (E2) is able to reduce apoptosis in cortical (Zhang *et al.* 2001), hippocampal (Pike 1999), NT2 (Singer *et al.* 1998), mesencephalic (Sawada *et al.* 1998), and cerebellar granule neurons (Dare *et al.* 2000). On the other hand, estrogens have also been reported to protect from necrotic cell death caused by overstimulation of glutamate receptors in hippocampal slices (Bi *et al.* 2000), hippocampal neurons (Goodman *et al.* 1996;Weaver, Jr. *et al.* 1997;Behl *et al.* 1997), cortical neurons (Singer *et al.* 1999;Honda *et al.* 2000) and SK-N-MC neuroblastoma (Moosmann and Behl 1999). Moreover, and accordingly with the above mentioned evidences, an increasing body of studies indicate that estrogens could reduce the apoptotic and/or necrotic neuronal death associated to Alzheimer and Parkinson's diseases, lateral amyotrophic sclerosis or cerebral ischemia (Rabizadeh *et al.* 1995;LaFerla *et al.* 1995;Choi 1996)

Several molecular mechanisms could explain the neuroprotective action of estrogens in the CNS: a) receptor-mediated genomic action which will modulate the expression of certain genes (Pike 1999;Sawada *et al.* 2000;Zhao *et al.* 2004); b) receptor-mediated non-genomic action through the activation of kinases cascades like p44/p42 mitogen-activated protein kinase (MAPK/ERK) or phosphoinositide 3-kinase/Akt (PI3-K/Akt) (Singer *et al.* 1999;Yu *et al.* 2004;Guerra *et al.* 2004) or c) receptor independent non-genomic action involving the antioxidant properties of their molecular structure (Behl *et al.* 1997;Dare *et al.* 2000). No one of the above mechanisms seems to be directly related with estradiol protection vs. apoptosis or necrosis. By contrast, it looks like that a single mechanism could be both involved in the estradiol-mediated neuroprotection from necrosis or apoptosis depending on the experimental system used. For example, it has been described that activation of MAPK by E2 could be involved both in the inhibition of apoptosis due to an increase in caspase inhibitory proteins (Zhang *et al.* 2001) or in the protection from excitotoxic necrotic cell death by modulating gene



## RESULTADOS

expression (Singer *et al.* 1999). Similarly, it has been described that the antioxidant properties of E2 could explain the prevention from apoptosis or necrosis observed in different experimental system (Moosmann and Behl 1999;Dare *et al.* 2000;D'Mello *et al.* 1993).

Apoptotic death in the CNS is not only associated with pathological conditions but it also allows for a fine regulation of the total number of neurons in the mature brain. Neuroblasts that do not reach appropriate targets during development die by apoptosis. The cerebellum is one of the brain areas in which this process is more dramatic. For example, cellular development and differentiation of cerebellar granule cells (CGCs) is activity-dependent and basically a postnatal process (Burgoyne *et al.* 1993). CGC that fails to make synapses with the mossy fibers during their migration from the external to the internal granule cell layer, die by apoptosis. Estradiol levels in the developing cerebellum are higher than in the adult (Sakamoto *et al.* 2003) and it has been described that both ER $\alpha$  and ER $\beta$  are expressed in the CGCs of the developing cerebellum (Belcher 1999). Moreover, the decrease in the expression of both receptors is associated with a period of important CGCs apoptosis. These studies are consistent with an estradiol-dependent and receptor-mediated neuroprotective function during development of the cerebellar cortex.

In the present study we wanted to test this possibility by using primary cultures of CGCs. In these cultures activity-dependent cellular survival is easily achieved by culturing in a high KCl concentration (25 mM; K25), whereas apoptosis is triggered by using a lower KCl concentration (5 mM; K5) (Gallo *et al.* 1987b). Moreover, since CGCs express glutamatergic receptors when cultured *in vitro*, it would be also possible to test the eventual neuroprotective effect of estradiol on glutamate-mediated necrotic cell death.

## MATERIAL AND METHODS

### *Chemicals.*

Soluble 17 $\beta$ -estradiol (ciclodextrin-encapsulated), 17 $\alpha$ -estradiol, diethylstilbestrol (DES), L-glutamic acid (Monosodium salt), hydrogen peroxide, ceramide, MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide), PBS, trypsin, desoxyribonuclease, soybean trypsin inhibitor (SBTI), poly-L-Lysine, bovine serum albumin (BSA), glucose, cytosine- $\beta$ -D-arabinofuranoside (Ara-C), diethylpicrocarbonate (DEPC), propidium iodide (PI), PD98059 and proteases inhibitors were from Sigma Co. Human recombinant IGF-I was from R&D Systems and was dissolved in PBS containing 10mM acetic acid and 0,1% BSA. LY294002 was from Tocris. Dulbecco's

Modified Eagle Medium (DMEM) without red phenol, B-27 supplement plus or minor antioxidants (AO+/AO-), Trizol, fetal calf serum (FCS), horse serum (HS), penicilin/streptomycin and glutamine were obtained from Invitrogen. Culture dishes and plates were from Corning or TPP. Poly-D-lysine 8-well culture slides chambers were purchased from Becton-Dickinson. Hoechst 33258 was from Calbiochem. All other chemical reagents were obtained from Merck.

#### *Primary neuronal cells cultures.*

Hippocampal and cortical primary cultures were obtained from E17 rat embryo forebrains and cerebellar granule neurons cultures (CGCs) were obtained from 7-8 days-old-rat pups as described (Rodriguez *et al.* 1991). Cells were enzymatically and mechanically disrupted and plated at  $300 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> in poly-L-lysine precoated wells or dishes. Cultures were kept at 37°C, 100% humidity and in 95% air/ 5%CO<sub>2</sub> atmosphere until use. CGCs were cultured in DMEM without red phenol supplemented with 2% B-27, 30mM glucose, 2mM glutamine, 25.000u penicillin, 25mg streptomycin and 5 or 25mM KCl. In some experiments we have used 10 % FCS instead of B-27 and cultures were treated with 10µM Ara-C 20-24hr after seeding to arrest glial growth. Cortical and hippocampal neuronal cultures were plated in BME supplemented with 30mM glucose, 2mM glutamine, 25.000u penicillin, 25mg streptomycin and 5% HS and 5% FCS (for cortical cultures) or 10% FCS (for hippocampal cultures). Culture media was replaced at 7 DIV with plating medium containing 10% HS (for cortical cultures) or 10% FCS (for hippocampal cultures).

#### *Treatment of cultures.*

Apoptotic death of CGCs was induced by potassium deprivation or by treatment with C<sub>2</sub>-ceramide. KCl deprivation-mediated apoptotic death of CGCs cultures was induced either by culturing the cells in a medium containing 5 mM KCl (K5) or by changing at 6 DIV the 25 mM KCl (K25) containing medium towards a K5 containing and B-27 free medium. Ceramide-mediated apoptotic death of CGCs was triggered by its addition to the culturing medium at 7 DIV for 24 hrs. Necrosis was elicited by addition of glutamate or hydrogen peroxide to the cultures. Glutamate (1 mM) was added at 9 DIV in CGC's and at 12 DIV in cortical cultures, whereas hydrogen peroxide (from 10 µM to 500 µM; final concentration) was added directly to CGCs at 7 DIV. Cellular viability was evaluated 24 hrs after treatments.

## RESULTADOS

When indicated, cultures were pre-treated 3 and 24 hrs prior to induction of cell death with estrogenic compounds. Soluble 17- $\beta$ -estradiol (cyclodextrine-encapsulated) was added from a 10 mM stock solution in PBS whereas 17- $\alpha$ -estradiol and DES were added to cultures from a 10 mM stock solution in ethanol.

The determination of 17- $\beta$ -estradiol effects on Akt and ERK phosphorylation was performed by addition of the estrogen to CGCs cultures (6-7 DIV) KCl deprived for 2 hours.

### *Evaluation of cell death.*

Neuronal death was measured by the MTT tetrazolium salt assay. Briefly, MTT (0.2 mg/ml) was added to cultures and incubated for 45 min at 37°C. The medium was then gently aspirated and DMSO was added to solubilize the blue formazan product. Quantification of formazan production was done in a Multiskan plate reader at 560 nm.

Necrotic and apoptotic cell death was evaluated by propidium iodide (PI) and Hoechst 33258 double-staining. PI (10  $\mu$ M) was added to culture medium 12-16 hr before the evaluation of cell death. Cells were then washed twice in TBS (Tris base 0.05M, NaCl 0.15M; pH 7.35), fixed in ice-cold 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PBS; pH 7.2) for 10 min, washed twice in ice-cold TBS and then incubated for 5 min at 37°C with Hoechst 33258 (2  $\mu$ g/ml). After washing cells were visualized in a Leica fluorescent microscopy using an excitation/emission wavelength of 350nm/460nm for Hoechst and 535nm/617nm for PI. Cells with condensed and/or fragmented chromatin were considered apoptotic. Cells positive for PI staining and with nuclei neither condensed nor fragmented were considered necrotic.

### *Inmunoblotting*

Extracts of cell cultures were prepared by lysis in the following buffer: 20mM Tris pH 7.5, 1% NP-40, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 1mM PMSF, 10 $\mu$ g/ml Aprotinine, 20 $\mu$ g/ml Leupeptine, 1mM Na<sub>2</sub>VO<sub>4</sub>. Cell lysates were centrifuged at 12,000 rpm for 10 min at 4°C to pellet insoluble material. The protein concentration in the supernatants was analyzed by a DC protein assay kit based on the Bradford method (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Cellular lysates (20  $\mu$ g protein) were resolved in a 8 or 10% SDS/PAGE gel and transferred onto Hybond-P (Amersham Biosciences)

polyvinylidene difluoride membranes. Blots were blocked with 5% BSA in TBS containing 0.1% Tween 20 and incubated at 4°C for 5 hrs in blocking buffer containing primary antibodies against estrogen receptor ER- $\alpha$  (SRA-1010, C-542; StressGen Biotechnologies Corp; 1:500), estrogen receptor ER- $\beta$  (sc-8974, H-150; Santa Cruz Biotechnology, Inc; 1:500), polyclonal phospho-p42/44 Map Kinase (Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>) (#9101; Cell Signalling Technology; 1:1000), polyclonal p42/44 Map Kinase (#9102; Cell Signalling Technology; 1:1000), polyclonal phospho-Akt (Ser<sup>473</sup>) (#9271; Cell Signalling Technology; 1:1000), polyclonal Akt (#9272; Cell Signalling Technology; 1:1000) or  $\beta$ -tubulin (556321, 5H1; BD PharMingen; 1 $\mu$ g/ml). After washing, blots were then incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies diluted (1:10.000) in blocking buffer and developed using the Super Signal<sup>®</sup> West Pico Chemiluminescent Substrate method (Pierce, Rockford, IL).

#### *Immunocytochemistry*

For immunohistochemistry, the cells were plated in BIOCOAT 8-wells culture slides (Becton and Dickinson) as indicated above. Cortical or hippocampal cultures (12 DIV) and CGCs (7 DIV) were gently washed with ice-cold PBS and fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 1 hr at 4°C. After washing, cells were blocked at 37°C for 1 hr in TBS-Tween 0.1% containing, 3% BSA, 5% FCS and then incubated overnight at 4°C with the primary antibodies against estrogen receptor ER- $\alpha$  or ER- $\beta$ , diluted 1:100 in TBS-Tween 0.1% containing 5% BSA. Cells were then washed with TBS and then incubated during 1 hr with the appropriate secondary antibodies conjugated with fluorescein or texas red (1:500; Jackson Immunoresearch laboratories) in blocking buffer. Culture slides were then mounted (vectashield mounting medium, Vector) and cells observed under epifluorescence in a Leica DMRB microscopy at 596 nm and 492 nm.

#### *Statistical analysis.*

Statistical significance was determined by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's multiple comparison test. A value of  $p < 0.05$  was accepted as denoting statistical significance.

**RESULTS***17 $\beta$ -estradiol does not protect CGC's from apoptotic death.*

Cultured CGCs require continuous depolarization to survive and die by apoptosis when they are grown in a K5-containing media. Since several evidences suggest that 17 $\beta$ -estradiol is able to protect from apoptosis, we wanted to test the putative neuroprotective effect of 17- $\beta$  estradiol on K5-mediated apoptosis in CGCs cultures. As already described (Gallo *et al.* 1987a), CGCs start to die after 3 DIV in K5-containing media (Fig 1). Cell viability decrease progressively with time and only a 25% is remaining at 7 DIV. The addition of 17 $\beta$ -estradiol (from 10 nM to 10  $\mu$ M) at plating in K5 cultures did not enhance the survival of CGCs when monitored at different DIVs (Fig 1 and data not shown). Thus, 17 $\beta$ -estradiol did not have any anti-apoptotic effect in immature CGCs cultures grown in K5 conditions. One possibility was that the effect of 17 $\beta$ -estradiol could be only seen in more mature cultures. For this reason, we cultured CGCs in K25 until 6 DIV when we switched to K5 and cell viability was monitored at 7, 9 or 12 DIV (Fig 2). The addition of 17 $\beta$ -estradiol one day (looking for a genomic action) or 3 hrs (looking for a non-genomic effect) before switching to K5 did not increase CGCs survival (Fig 2). The range of concentrations tested was from 1 nM to 100  $\mu$ M. Accordingly with the data obtained with the cell viability assay, we did not observe any change in the percentage of cells showing a condensed or fragmented nuclei in cultures treated with 17 $\beta$ -estradiol or DES vs K5 cultures (Fig 4A-F). Altogether, these data indicates that 17 $\beta$ -estradiol did not protect CGCs from K5-mediated apoptosis.

Next, we wanted to test whether the failure to protect CGCs from K5-mediated apoptosis was also observed when apoptosis was triggered by a different mechanism. We decided to use ceramide because it has been reported to trigger apoptosis in CGCs by a caspase-independent pathway (Monti *et al.*, 2001). As expected, treatment during 24 hrs with ceramide produced a dose-dependent increase in cell death and in the number of condensed or fragmented nuclei with an IC<sub>50</sub> around 60  $\mu$ M (data not shown). Long-term (24 hr) or short-term (30 min) pretreatment with 17 $\beta$ -estradiol did not revert the ceramide-mediated cell death when monitored after 24 hr and that was independent on the presence or absence of antioxidants in the culture media (Fig. 3). Neither the biological inactive isomer, 17 $\alpha$ -estradiol, nor the stable analogue, DES, were able to modify ceramide-induced CGCs death (Fig. 3 and data not shown).

*17 $\beta$ -estradiol does not protect CGC's from glutamate induced-excitotoxic cell death.*

Several studies had shown that 17- $\beta$  estradiol has a neuroprotective role against glutamate-mediated neurotoxicity in hippocampal and cortical neurons (Singer *et al.* 1999; Bi *et al.* 2000). We confirmed these data in primary cultures of cortical neurons (Fig. 5). Exposure for 24 hr to glutamate (1 mM) caused 60% reduction in the survival of cortical neurons measured by the MTT assay (data not shown). Pretreatment with 17 $\beta$ -estradiol produced a 25% reduction in glutamate-mediated cell death (Fig. 5A). Similar results were observed with DES. No protection, however, was observed with 17 $\alpha$ -estradiol (data not shown). PI staining was also used to assess the neuroprotective effect of 17- $\beta$  estradiol on cortical cultures. Neurons with compromised plasma membrane are stained with PI when the dye is added before fixation (see material and methods). In glutamate-treated cultures, many cells were PI positive. Treatment with 17- $\beta$  estradiol or DES produced a marked reduction in the number of PI positive cells (Fig 5B).

Similar to cortical neurons, CGCs could also die by glutamate-mediated excitotoxicity (Ankarcrona *et al.* 1995). When 1 mM of glutamate was added to 9 DIV CGCs cultures for 24 hr, cell viability decreased around 55% (Fig. 6). Moreover, glutamate-mediated cell death in CGCs cultures was not modified by the presence or absence of antioxidants in the culture medium. In contrast with the results obtained in cortical cultures, the addition of 17- $\beta$  estradiol or DES, 3 hr (short-preincubation) or 24 hr (long-preincubation) before exposure to glutamate, failed to protect CGCs from excitotoxicity (Fig. 6A and data not shown). Similar results were observed when CGCs were cultured in a medium supplemented with B-27 without antioxidants (Fig. 6B and data not shown). Thus, even the well known antioxidant properties of 17- $\beta$  estradiol (Behl *et al.* 1995; Behl *et al.* 1997; Moosmann and Behl 1999) does not reduce excitotoxicity in CGCs cultures. Accordingly, 17- $\alpha$  estradiol does not protect against CGCs excitotoxicity (Fig. 6A and 6B). The results obtained with the MTT assay were confirmed with PI staining. As it is shown in figure 6C, glutamate produced an increase in PI positive cells that was not reduced in the presence of 17- $\beta$  estradiol or DES.

*17- $\beta$ -estradiol protects CGC's from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death.*

The non-genomic antioxidant activity of estrogens due to their phenolic structure has received increasing attention as a mechanism that could explain their neuroprotective

## RESULTADOS

effects against oxidative stress (Behl 2000;Behl *et al.* 1997;Behl *et al.* 1995;Moosmann and Behl 1999). In order to test whether 17- $\beta$  estradiol could protect CGCs from oxidative stress-induced neuronal cell death, we have investigated 17- $\beta$  estradiol effect on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death.

Addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to CGCs cultures during 24 hr produced a concentration-dependent decrease in cell viability, with the IC<sub>50</sub> at 300  $\mu$ M (data not shown). Treatment with 17- $\beta$  estradiol, DES or 17- $\alpha$  estradiol caused a significant protection from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated toxicity when cells were cultured in a medium without supplemented antioxidants (Fig. 7A). The presence of 17- $\beta$  estradiol reduced a 25% cell death by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> whereas DES and 17 $\alpha$ -estradiol reduced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated cell death around 40%. These results were also observed when PI staining was monitored (Fig. 7B). By contrast, no protection was observed when CGCs were cultured in a medium supplemented with antioxidants.

### *Cerebellar granule neurons express estrogen receptor- $\alpha$ and - $\beta$ .*

Although previous reports have shown the presence of estrogen receptors (ER) in rat cerebellum, we wondered whether the failure of estradiol to present neuroprotective effect in CGCs could be due to an absence of its receptors. The presence of ER $\alpha$  and ER $\beta$  was detected by immunohistochemistry. As it could be seen in Fig 8A, ER $\alpha$  is located outside the nucleus whereas ER $\beta$  has a nuclear localization. The presence of both receptors was further supported by western blotting (Fig. 8B). 54 kD and 67 kD bands corresponding to ER $\beta$  and ER $\alpha$  were clearly evident in CGCs.

### *17 $\beta$ -estradiol activates MEK/ERK but not PI3k/Akt pathway*

Activation of the PI3k/Akt and MEK/ERK pathways seems to be involved in the neuroprotective effect of 17 $\beta$ -estradiol. In this context, we wanted to monitor whether 17 $\beta$ -estradiol failure to neuroprotect from apoptosis or excitotoxicity in CGCs cultures was correlated with a failure to activate these pathways. As it is shown in figure 9, 17 $\beta$ -estradiol did not increased Akt phosphorylation when CGCs cultures were switched to K5-containing medium in contrast to the marked increase observed in the presence of IGF-I (Fig. 9A). On the other hand, 17 $\beta$ -estradiol was able to activate ERK phosphorylation either in K25 or KCl-deprived CGCs cultures (Fig. 9B and data not shown), suggesting that failure to protect from low potassium-mediated cell death was not associated with a failure to activate MEK/ERK pathway but rather to the lack of Akt

activation. Accordingly, the blockade of PI3k/Akt pathway with the specific inhibitor LY 294002, did inhibit the neuroprotective effect of IGF-I in KCl-deprived CGCs cultures (Fig. 9C). By contrast, inhibition of the MEK/ERK pathway with PD 98059 (inhibitor of MEK) only reduced partially IGF-I-mediated neuroprotection.

In other neuronal cultures and brain regions, the activation of ERK by 17 $\beta$ -estradiol underlies the neuroprotective effect of the estrogen. However, although 17 $\beta$ -estradiol increases ERK phosphorylation in CGCs cultures, it is not able to protect from glutamate-mediated cell death. Thus, it seems that activation of ERK is not enough to block glutamate-mediated cell death in CGCs.

## **DISCUSSION.**

Neurotrophic actions of estrogens in the CNS are well documented (Lee and McEwen 2001; Garcia-Segura *et al.* 2001) and are mainly founded in their capacity to regulate structural plasticity events in certain cerebral areas, such as hippocampus or basal forebrain (Murphy and Segal 1996; Dominguez *et al.* 2004), and in their ability to protect neurons from apoptosis triggered by deprivation of survival factors (Green *et al.* 1997; Patrone *et al.* 1999; Singer *et al.* 1999).

Although the cerebellum is not considered to be an estrogen responsive brain region, previous reports have shown the presence of ER $\alpha$  and ER $\beta$  in CGCs (Shughrue *et al.* 1997; Belcher 1999; Price, Jr. and Handa 2000). The relative expression of both receptors changes during the postnatal granule cell development, while these cells are migrating from the external towards the internal granular layer and extensive apoptosis occurs due to failure to receive excitatory inputs (Williams and Herrup 1988; Wood *et al.* 1993). In this context, it was proposed that estradiol could modulate apoptosis during postnatal CGCs development (Belcher 1999; Wong *et al.* 2003). We wanted to study this possibility in cultured CGCs since it is possible to mimic the *in vivo* apoptotic death by culturing the cells in a K5-containing medium (Gallo *et al.* 1987a; D'Mello *et al.* 1993).

Estradiol could exert its biological effects through genomic (slow) and non-genomic (fast) receptor-mediated responses and also due to its antioxidant properties. In order to explore every possibility in our system we performed the experiments with a wide range of 17 $\beta$ -estradiol concentrations (1 nM to 100  $\mu$ M), the presence or absence of antioxidants in the culture medium and by comparing the observed effects of a short or



## RESULTADOS

long-preincubation (3 or 24 hr). In all these conditions, the presence of 17 $\beta$ -estradiol in CGCs cultured in K5-containing medium did not prevent CGCs to die by apoptosis. Similar results were observed when 17 $\beta$ -estradiol was added to mature CGCs cultures prior to KCl deprivation, suggesting altogether that estradiol has neither neurotrophic nor neuroprotective role during the development of CGCs in culture. Our results are partially in disagreement with the previous work by Wong et al (2003). These authors also reported that 17 $\beta$ -estradiol has no effect on viability or cell death in mature CGCs. By contrast, in the same study, they have reported that continuous exposure to 17 $\beta$ -estradiol increased the viability of CGCs cultured in medium containing low potassium concentration.

Since the mechanisms involved in apoptosis could vary depending on the triggering stimulus, we decided to test whether estradiol could protect CGCs from apoptosis mediated by factors different from potassium deprivation. We choose to elicit CGCs apoptosis by ceramide treatment since it has been reported that when cultured in serum-free medium, ceramide-mediated CGCs apoptosis is caspase-independent whereas caspases are activated when CGCs are potassium deprived (Gerhardt *et al.* 2001;Monti *et al.* 2001). However, ceramide-mediated apoptosis of CGCs was not prevented by 17 $\beta$ -estradiol since we found that no changes were observed in cell viability and in the number of condensed and/or fragmented nuclei. Similarly to the results observed in K5 cultures, the failure of 17 $\beta$ -estradiol to protect from ceramide-mediated apoptosis was independent of 17 $\beta$ -estradiol concentration, long or short preincubation or the presence/absence of antioxidant in the culture medium. Thus, our results suggest that 17 $\beta$ -estradiol has no antiapoptotic effect in CGCs cultures. These results are different from what it has been observed in several studies done in other neurons where it is reported that estradiol has an antiapoptotic effect (Wang *et al.* 2001; Jover *et al.* 2002; Kajta and Beyer 2003). CGCs survival seems to be mainly dependent on the activation of the PI3K/Akt pathway by extracellular factors. In particular, IGF-I has been reported to promote PI3K/Akt-mediated survival of CGCs in K5-cultured cells (D'Mello *et al.* 1997) and ER are able to cross-activate IGF-IR (Kahlert *et al.* 2000) and its associated pathways. However, our results indicate that estradiol does not activate PI3K/Akt pathway but is able to activate MEK/ERK pathway in our CGCs cultures and, perhaps, this fact could be in the basis of the failure of estradiol to protect CGCs from potassium-deprivation and ceramide-mediated apoptosis. Since cultured CGCs express both types of estrogen receptors and the IGF-IR, it is not clear to us why 17 $\beta$ -estradiol does not activate the PI3/Akt pathway in these cells.

Several classical reports have also described a estrogen-mediated neuroprotection against glutamate-mediated cell death in cortical cultures (Singer *et al.* 1996; Singer *et al.* 1999; Honda *et al.* 2000) by a mechanism involving the activation of the MAPK pathway (Singer *et al.* 1999). Since, it has been reported that estradiol could activate ERK in CGCs, (Wong *et al.* 2003) we wanted to test whether it could protect from glutamate-mediated cell death in our CGCs cultures. Again, we found that, independently of the conditions used, 17 $\beta$ -estradiol was not neuroprotective against excitotoxicity in cultured CGCs. By contrast, we have confirmed previous results (Singer *et al.* 1999; Wong *et al.* 2003) showing neuroprotection in cortical neuronal cultures and the activation of the MAPK pathway in CGCs. Thus, 17 $\beta$ -estradiol does not protect CGCs from glutamate-mediated death but was able to activate MAPK pathway. These results will suggest that MAPK pathway activation is not sufficient to trigger 17 $\beta$ -estradiol neuroprotection in CGCs cultures.

Besides the reported neuroprotective action of estrogens mediated by their receptors, it is also clear that 17 $\beta$ -estradiol have antioxidant properties based on its phenolic A-ring which confers radical scavenging properties. In this context, it has been reported that 17 $\beta$ -estradiol is able to protect neuronal cultures from oxidative stress-induced cell death (Sawada *et al.* 1998; Moosmann and Behl 1999; Dare *et al.* 2000). Accordingly, we report here that 17 $\beta$ -estradiol and DES (a stable xenoestrogen) are able to reduce hydrogen peroxide-mediated cell death in a cultured medium without antioxidants. Similarly, we did observe a decrease in the number of CGCs with compromised plasma membrane (stained positive for propidium iodide). By contrast, no reduction in cell death was observed when CGCs were cultured in a medium with antioxidants. This protection by 17 $\beta$ -estradiol was due to its antioxidant properties as a hydrophobic phenolic molecule was confirmed when a similar neuroprotection was found in CGCs cultures treated with 17 $\alpha$ -estradiol, a biologically inactive structural isomer).

In summary, our data indicate that estrogens did not show any protection against apoptosis in CGCs cultures independently of the presence or absence of antioxidants and the time of pre-incubation. Probably, the lack of anti-apoptotic effect is correlated to the inability to activate the PI3K/Akt pathway in these cells. Moreover, although estradiol is able to activate MEK-ERK pathway in CGCs, it does not protect from glutamate-mediated neuronal death. Only a significant neuroprotective effect was observed against hydrogen peroxide-mediated neuronal death, due to the antioxidant properties of the chemical structure of estradiol.

**Acknowledgments:** This work was supported by grants from Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF2001-1941 and SAF2005-05106) and Ministerio de Sanidad y Consumo (Red G03/167) to J.R.A. A.M is a recipient of a predoctoral fellowship from the Ministerio de Ciencia y Tecnología and C.M was a recipient of a predoctoral fellowship from the Universidad Autónoma de Barcelona.

**FIGURE LEGENDS**

**Figure 1.- 17 $\beta$ -estradiol does not protect from death in cerebellar granule cells (CGCs) when they are plated in low potassium (5mM KCl; K5).** CGCs cultures were plated in DMEM + B27 (complement with antioxidants) medium containing 25mM (K25) or 5mM (K5) KCl in the presence or absence of 17- $\beta$ -estradiol (100nM). Cellular viability was measured by MTT assay at different days in vitro (DIV). Data are presented as % of cellular viability from control cultures (K25). The results are means  $\pm$  SEM of three independent experiment performed in triplicate.

**Figure 2.- Short and long pre-incubation with 17 $\beta$ -estradiol does not protect from CGC death mediated by K<sup>+</sup>-deprivation.** CGCs were cultured in K25 in a medium containing B27 with (A) or without (B) antioxidants until 6 DIV (see material and methods for more details) when the medium was changed towards a K5-based medium. 17 $\beta$ -estradiol was added 3 hr (short preincubation) or 24 hr (long preincubation) before medium replacement. Cell viability was determined by MTT at different DIV as indicated in the figure. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM of three independent experiments performed in triplicate.

**Figure 3.- 17 $\beta$ -estradiol does not protect CGCs from ceramide-mediated death.** CGCs were cultured in K25 in a medium containing B27 with (AO+) or without (AO-) antioxidants until 7 DIV when 60 $\mu$ M ceramide was added for 24hr. 17 $\beta$ -Estradiol or 17 $\alpha$ -Estradiol were added 3hr (A) or 24hr (B) before addition of C<sub>2</sub>-ceramide. Cell viability was determined by the MTT assay at 8 DIV. These results are the mean  $\pm$  SEM of three experiments performed in triplicate.

**Figure 4.- Effect of 17 $\beta$ -estradiol on chromatin condensation induced by KCl-deprivation or ceramide.**

*A-F*, CGC were cultured in K25 until 6DIV when the medium was changed towards a K5-based medium. 17- $\beta$ -estradiol or DES were added 24hr before medium replacement. (A) K25; (B) 17 $\beta$ -Estradiol (10 $\mu$ M); (C) DES (10 $\mu$ M); (D) K5; (E) K5+17- $\beta$ -Estradiol; (F) K5+DES. *G-I*, C<sub>2</sub>-ceramide was added to 6 DIV CGCs cultures and chromatin condensation was observed at 7DIV. 17 $\beta$ -estradiol was added 24hr before C<sub>2</sub>-ceramide. (G) 17 $\beta$ -Estradiol (100 $\mu$ M); (H) C<sub>2</sub>-ceramide (60 $\mu$ M); (I) C<sub>2</sub>-ceramide +17 $\beta$ -Estradiol. Chromatin condensation was monitored by Hoechst staining. Note the

appearance of several condensed nuclei in K5 and with C<sub>2</sub>-ceramide (arrows). 17 $\beta$ -estradiol or DES treatment does not reduce the number of condensed nuclei.

**Figure 5.- Neuroprotection from glutamate-mediated death in cortical neurons by 17- $\beta$ -Estradiol and DES.**

Cortical neurons were cultured in BME medium (see materials and methods for more details) for 12 DIV and were treated with glutamate (1mM) for 24hr. 17 $\beta$ -Estradiol or DES were added 3hr before the addition of glutamate. (A) Cell viability was monitored by MTT assay. Results are expressed as percentage of glutamate-mediated death and are mean  $\pm$  SEM of three independent experiments performed in triplicate. \* $p$ <0.05. (B) Integrity of plasma membrane was followed by propidium iodide (PI) staining (see material and methods). PI was added 10hr after glutamate treatment and cultured were monitored under epifluorescence at 13DIV. Note that 17 $\beta$ -Estradiol (E2) reduces the number of PI positive cells (red cells).

**Figure 6.- Glutamate-mediated neuronal death in CGC's cultures is not reduced by estrogens.**

CGC's were cultured in K25 in a medium containing B27 with (A) or without (B) antioxidants until 9 DIV when 1mM glutamate was added for 24hr. 17 $\beta$ -Estradiol, 17 $\alpha$ -Estradiol or DES were added 3hr or 24hr (data not shown) before addition of glutamate. Cell viability was determined by the MTT assay at 10 DIV. Results are mean  $\pm$  SEM of three experiments performed in triplicate. (C) CGC's were cultured in K25 (control) until 9 DIV when 17- $\beta$ -estradiol (10  $\mu$ M) was added 3hr before addition of glutamate (1 mM) for 24hr. Cells with broken plasma membrane were detected at 10 DIV after PI staining. Note that 17 $\beta$ -estradiol does not reduce glutamate-mediated necrosis.

**Figure 7.- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated CGCs death is reduced by 17 $\beta$ -estradiol.**

(A) Cells were cultured in K25 in a medium containing B27 with (AO+) or without (AO-) antioxidants until 7 DIV when 300 $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was added. 17 $\beta$ -Estradiol, 17 $\alpha$ -Estradiol or DES were added 3hr before H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (A) Cell viability was determined by the MTT assay at 8 DIV. Results are mean  $\pm$  SEM of three independent experiment performed in quadruplicate. \* $p$ <0.05; \*\*\* $p$ <0.001 vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated cultures. (B) CGCs were cultured in K25-containing medium until 6 DIV when 17- $\beta$ -estradiol was added 3hr before addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (300 $\mu$ M). Cells with broken plasma membrane were detected at 7 DIV after PI staining. 17 $\beta$ -estradiol (10 $\mu$ M) treatment partially reduces the number of cells with broken plasma membrane (PI positive) in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated cultures.

**Figure 8.- Estrogen Receptors are present in CGCs cultures.**

(A) Immunocytochemical analysis on the localization of estrogen receptor- $\alpha$  and - $\beta$  in hippocampal, cortical, and cerebellar granular neurons. Cells derived from hippocampus and cerebral cortex were cultured for 12 DIV and CGCs for 7 DIV. Presence of ER- $\alpha$  and ER- $\beta$  was detected by immunohistochemistry as indicated in material and methods. A-D. ER- $\alpha$  (B) and ER- $\beta$  (D) in granule neurons; E-F, ER- $\alpha$  (F) in hippocampal neurons; G-H. ER- $\beta$  (H) in cortical neurons. (B) Presence of estrogen receptor- $\alpha$  and - $\beta$  in hippocampal (Hip), cortical, and CGCs was also determined by western blot. Results from a representative experiment are shown. Similar results were observed in two additional independent experiments.

**Figure 9.- 17 $\beta$ -estradiol activates MEK/ERK pathway but not PI3k/Akt in CGCs.**

CGC's were cultured in K25 in a DMEM medium containing B27 until 6-8 DIV (see material and method for more details) when the medium was changed towards a B27-free and K25-based or K5-based medium. (A, B) Time course of 17 $\beta$ -estradiol-induced and insulin growth factor-induced Akt and ERK stimulation. CGCs were treated with E2 at 10nM or IGF-I at 50ng/mL for the times indicated. The phosphorylation status of Akt (ser 473) or ERK (thr 202 and tyr 204) was monitored by western blot. Results are representative of at least three independent experiments. (C) CGC's were cultured in K25 in a DMEM medium containing B27 until 7 DIV when the medium was changed towards a B27-free K5-based medium. IGF-I or 17 $\beta$ -estradiol was added for 24 hours. Inhibitors were added 30 min before replacing medium and after replacing medium. Cell viability was determined by MTT at 24 hours. These results are mean  $\pm$  SEM and are representative of at least three independent experiments.

**Additional Figure A1.- Effect of ceramide in CGCs culture viability.**

CGCs were cultured in a K25 medium supplemented with B27 until 7 DIV (see materials and methods to see more details) when ceramide was added at different concentrations during 24hr. Cellular viability was determined by the MTT assay at 8 DIV. Results are mean  $\pm$  SEM of three independent experiments performed in triplicate.

**Additional Figure A2.- Dietilstilbestrol (DES) does not protect CGCs from ceramide-mediated death.**

CGCs were cultured in a K25 medium containing B27 with (AO+) or without (AO-) antioxidants until 7 DIV when 60 $\mu$ M ceramide was added for 24hr. DES was added 3hr (A) or 24hr (B) before addition of ceramide. Cell viability was determined by the MTT assay at 8 DIV. Results are mean  $\pm$  SEM of three experiments performed in triplicate.

**Additional Figure B1.- Effect of glutamate on cultured CGCs viability.**

CGCs were cultured in K25 medium containing B27 until 9 DIV when glutamate was added at different concentrations during 24hr. Cellular viability was determined by the MTT assay at 10 DIV. . Results are mean  $\pm$  SEM of three experiments performed in triplicate.

**Additional Figure B2.- Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in CGC's culture viability.**

CGCs were cultured in K25 medium containing B27 until 7 DIV when H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was added at different concentrations during 24hr. Cellular viability was determined by the MTT assay at 8 DIV. Results are mean  $\pm$  SEM of three experiments performed in triplicate.

**Additional Figure C.- Estrogens effect on glutamate-mediated neuronal death in CGCs cultures.**

CGCs were cultured in a K25 medium containing B27 with (A;AO+) or without (B;AO-) antioxidants until 9 DIV when 1mM glutamate was added for 24hr. 17 $\beta$ -estradiol ( $\beta$ -E2), 17- $\alpha$ -estradiol ( $\alpha$ -E2) or DES were added 24hr before addition of glutamate. Cell viability was determined by the MTT assay at 10 DIV. Results are mean  $\pm$  SEM of three experiments performed in triplicate.

**Additional Figure D.- Estrogens effect on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated neuronal death in CGCs cultures.**

CGCs were cultured in a K25 medium containing B27 with (A;AO+) or without (B;AO-) antioxidants until 7 DIV when 300 $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was added during 24hr. 17 $\beta$ -estradiol ( $\beta$ -E2), 17- $\alpha$ -estradiol ( $\alpha$ -E2) or DES were added 24hr before addition of glutamate. Cell viability was determined by the MTT assay at 8 DIV. Results are mean  $\pm$  SEM of three experiments performed in triplicate.

**REFERENCES**

Ankarcrona M., Dypbukt J. M., Bonfoco E., Zhivotovsky B., Orrenius S., Lipton S. A. and Nicotera P. (1995) Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 15, 961-973.

Behl C. (2000) Vitamin E protects neurons against oxidative cell death in vitro more effectively than 17-beta estradiol and induces the activity of the transcription factor NF-kappaB. *J. Neural Transm.* 107, 393-407.

Behl C., Skutella T., Lezoualc'h F., Post A., Widmann M., Newton C. J. and Holsboer F. (1997) Neuroprotection against oxidative stress by estrogens: structure-activity relationship. *Mol. Pharmacol.* 51, 535-541.

Behl C., Widmann M., Trapp T. and Holsboer F. (1995) 17-beta estradiol protects neurons from oxidative stress-induced cell death in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 216, 473-482.

Belcher S. M. (1999) Regulated expression of estrogen receptor alpha and beta mRNA in granule cells during development of the rat cerebellum. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 115, 57-69.

Bi R., Broutman G., Foy M. R., Thompson R. F. and Baudry M. (2000) The tyrosine kinase and mitogen-activated protein kinase pathways mediate multiple effects of estrogen in hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 3602-3607.

Burgoyne R. D., Graham M. E. and Cambray-Deakin M. (1993) Neurotrophic effects of NMDA receptor activation on developing cerebellar granule cells. *J. Neurocytol.* 22, 689-695.



## RESULTADOS

Choi D. W. (1996) Ischemia-induced neuronal apoptosis. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6, 667-672.

D'Mello S. R., Borodezt K. and Soltoff S. P. (1997) Insulin-like growth factor and potassium depolarization maintain neuronal survival by distinct pathways: possible involvement of PI 3-kinase in IGF-1 signaling. *J. Neurosci.* 17, 1548-1560.

D'Mello S. R., Galli C., Ciotti T. and Calissano P. (1993) Induction of apoptosis in cerebellar granule neurons by low potassium: inhibition of death by insulin-like growth factor I and cAMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 10989-10993.

Dare E., Gotz M. E., Zhivotovsky B., Manzo L. and Ceccatelli S. (2000) Antioxidants J811 and 17beta-estradiol protect cerebellar granule cells from methylmercury-induced apoptotic cell death. *J. Neurosci. Res.* 62, 557-565.

Dominguez R., Jalali C. and de L. S. (2004) Morphological effects of estrogen on cholinergic neurons in vitro involves activation of extracellular signal-regulated kinases. *J. Neurosci.* 24, 982-990.

Gallo V., Kingsbury A., Balazs R. and Jorgensen O. S. (1987a) The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J. Neurosci.* 7, 2203-2213.

Gallo V., Kingsbury A., Balazs R. and Jorgensen O. S. (1987b) The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J. Neurosci.* 7, 2203-2213.

Garcia-Segura L. M., Azcoitia I. and DonCarlos L. L. (2001) Neuroprotection by estradiol. *Prog. Neurobiol.* 63, 29-60.

Gerhardt E., Kugler S., Leist M., Beier C., Berliocchi L., Volbracht C., Weller M., Bahr M., Nicotera P. and Schulz J. B. (2001) Cascade of caspase activation in potassium-

deprived cerebellar granule neurons: targets for treatment with peptide and protein inhibitors of apoptosis. *Mol. Cell Neurosci.* 17, 717-731.

Goodman Y., Bruce A. J., Cheng B. and Mattson M. P. (1996) Estrogens attenuate and corticosterone exacerbates excitotoxicity, oxidative injury, and amyloid beta-peptide toxicity in hippocampal neurons. *J. Neurochem.* 66, 1836-1844.

Green P. S., Bishop J. and Simpkins J. W. (1997) 17 alpha-estradiol exerts neuroprotective effects on SK-N-SH cells. *J. Neurosci.* 17, 511-515.

Guerra B., Diaz M., Alonso R. and Marin R. (2004) Plasma membrane oestrogen receptor mediates neuroprotection against beta-amyloid toxicity through activation of Raf-1/MEK/ERK cascade in septal-derived cholinergic SN56 cells. *J. Neurochem.* 91, 99-109.

Honda K., Sawada H., Kihara T., Urushitani M., Nakamizo T., Akaike A. and Shimohama S. (2000) Phosphatidylinositol 3-kinase mediates neuroprotection by estrogen in cultured cortical neurons. *J. Neurosci. Res.* 60, 321-327.

Jover T., Tanaka H., Calderone A., Oguro K., Bennett M. V., Etgen A. M. and Zukin R. S. (2002) Estrogen protects against global ischemia-induced neuronal death and prevents activation of apoptotic signaling cascades in the hippocampal CA1. *J. Neurosci.* 22, 2115-2124.

Kahlert S., Nuedling S., van Eickels M., Vetter H., Meyer R. and Grohe C. (2000) Estrogen receptor alpha rapidly activates the IGF-1 receptor pathway. *J. Biol. Chem.* 275, 18447-18453.

Kajta M. and Beyer C. (2003) Cellular strategies of estrogen-mediated neuroprotection during brain development. *Endocrine.* 21, 3-9.

## RESULTADOS

LaFerla F. M., Tinkle B. T., Bieberich C. J., Haudenschield C. C. and Jay G. (1995) The Alzheimer's A beta peptide induces neurodegeneration and apoptotic cell death in transgenic mice. *Nat. Genet.* 9, 21-30.

Lee S. J. and McEwen B. S. (2001) Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogens and their therapeutic implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41, 569-591.

Monti B., Zanghellini P. and Contestabile A. (2001) Characterization of ceramide-induced apoptotic death in cerebellar granule cells in culture. *Neurochem. Int.* 39, 11-18.

Moosmann B. and Behl C. (1999) The antioxidant neuroprotective effects of estrogens and phenolic compounds are independent from their estrogenic properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 8867-8872.

Murphy D. D. and Segal M. (1996) Regulation of dendritic spine density in cultured rat hippocampal neurons by steroid hormones. *J. Neurosci.* 16, 4059-4068.

Patrone C., Andersson S., Korhonen L. and Lindholm D. (1999) Estrogen receptor-dependent regulation of sensory neuron survival in developing dorsal root ganglion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 10905-10910.

Pike C. J. (1999) Estrogen modulates neuronal Bcl-xL expression and beta-amyloid-induced apoptosis: relevance to Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 72, 1552-1563.

Price R. H., Jr. and Handa R. J. (2000) Expression of estrogen receptor-beta protein and mRNA in the cerebellum of the rat. *Neurosci. Lett.* 288, 115-118.

Rabizadeh S., Gralla E. B., Borchelt D. R., Gwinn R., Valentine J. S., Sisodia S., Wong P., Lee M., Hahn H. and Bredesen D. E. (1995) Mutations associated with amyotrophic lateral sclerosis convert superoxide dismutase from an antiapoptotic gene to a

proapoptotic gene: studies in yeast and neural cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 3024-3028.

Rodriguez J., Jacques-Berg W. and Patel A. J. (1991) Differential regulation of cerebellar granule neurons by two types of quisqualate receptors. *Neuroreport* 2, 517-520.

Sakamoto H., Mezaki Y., Shikimi H., Ukena K. and Tsutsui K. (2003) Dendritic growth and spine formation in response to estrogen in the developing Purkinje cell. *Endocrinology* 144, 4466-4477.

Sawada H., Ibi M., Kihara T., Urushitani M., Akaike A. and Shimohama S. (1998) Estradiol protects mesencephalic dopaminergic neurons from oxidative stress-induced neuronal death. *J. Neurosci. Res.* 54, 707-719.

Sawada H., Ibi M., Kihara T., Urushitani M., Honda K., Nakanishi M., Akaike A. and Shimohama S. (2000) Mechanisms of antiapoptotic effects of estrogens in nigral dopaminergic neurons. *FASEB J.* 14, 1202-1214.

Shughrue P. J., Lane M. V. and Merchenthaler I. (1997) Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. *J. Comp Neurol.* 388, 507-525.

Singer C. A., Figueroa-Masot X. A., Batchelor R. H. and Dorsa D. M. (1999) The mitogen-activated protein kinase pathway mediates estrogen neuroprotection after glutamate toxicity in primary cortical neurons. *J. Neurosci.* 19, 2455-2463.

Singer C. A., Rogers K. L. and Dorsa D. M. (1998) Modulation of Bcl-2 expression: a potential component of estrogen protection in NT2 neurons. *Neuroreport* 9, 2565-2568.

Singer C. A., Rogers K. L., Strickland T. M. and Dorsa D. M. (1996) Estrogen protects primary cortical neurons from glutamate toxicity. *Neurosci. Lett.* 212, 13-16.

## RESULTADOS

Tang M. X., Jacobs D., Stern Y., Marder K., Schofield P., Gurland B., Andrews H. and Mayeux R. (1996) Effect of oestrogen during menopause on risk and age at onset of Alzheimer's disease. *Lancet* 348, 429-432.

Wang J., Green P. S. and Simpkins J. W. (2001) Estradiol protects against ATP depletion, mitochondrial membrane potential decline and the generation of reactive oxygen species induced by 3-nitropropionic acid in SK-N-SH human neuroblastoma cells. *J. Neurochem.* 77, 804-811.

Weaver C. E., Jr., Park-Chung M., Gibbs T. T. and Farb D. H. (1997) 17beta-Estradiol protects against NMDA-induced excitotoxicity by direct inhibition of NMDA receptors. *Brain Res.* 761, 338-341.

Williams R. W. and Herrup K. (1988) The control of neuron number. *Annu. Rev. Neurosci.* 11, 423-453.

Wong J. K., Le H. H., Zsarnovszky A. and Belcher S. M. (2003) Estrogens and ICI182,780 (Faslodex) modulate mitosis and cell death in immature cerebellar neurons via rapid activation of p44/p42 mitogen-activated protein kinase. *J. Neurosci.* 23, 4984-4995.

Wood K. A., Dipasquale B. and Youle R. J. (1993) In situ labeling of granule cells for apoptosis-associated DNA fragmentation reveals different mechanisms of cell loss in developing cerebellum. *Neuron* 11, 621-632.

Yu X., Rajala R. V., McGinnis J. F., Li F., Anderson R. E., Yan X., Li S., Elias R. V., Knapp R. R., Zhou X. and Cao W. (2004) Involvement of insulin/phosphoinositide 3-kinase/Akt signal pathway in 17 beta-estradiol-mediated neuroprotection. *J. Biol. Chem.* 279, 13086-13094.

Zhang Y., Tounekti O., Akerman B., Goodyer C. G. and LeBlanc A. (2001) 17-beta-estradiol induces an inhibitor of active caspases. *J. Neurosci.* 21, RC176.

Zhao L., Wu T. W. and Brinton R. D. (2004) Estrogen receptor subtypes alpha and beta contribute to neuroprotection and increased Bcl-2 expression in primary hippocampal neurons. *Brain Res.* 1010, 22-34.

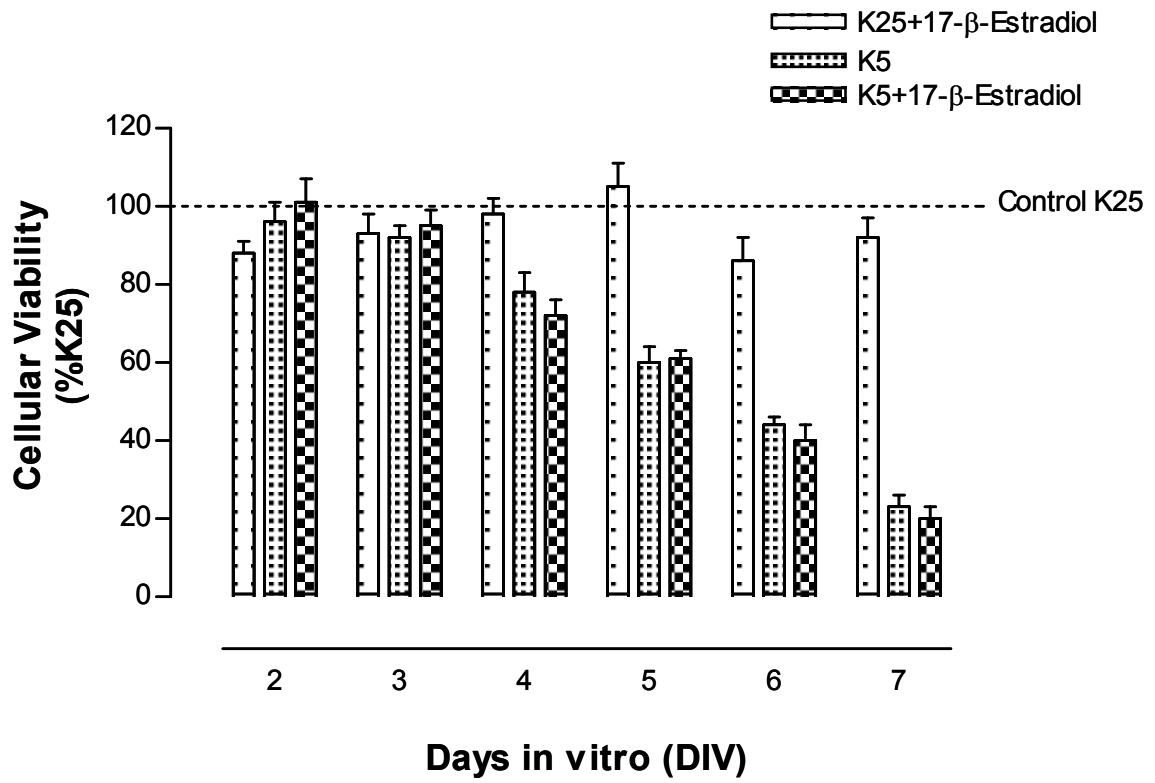
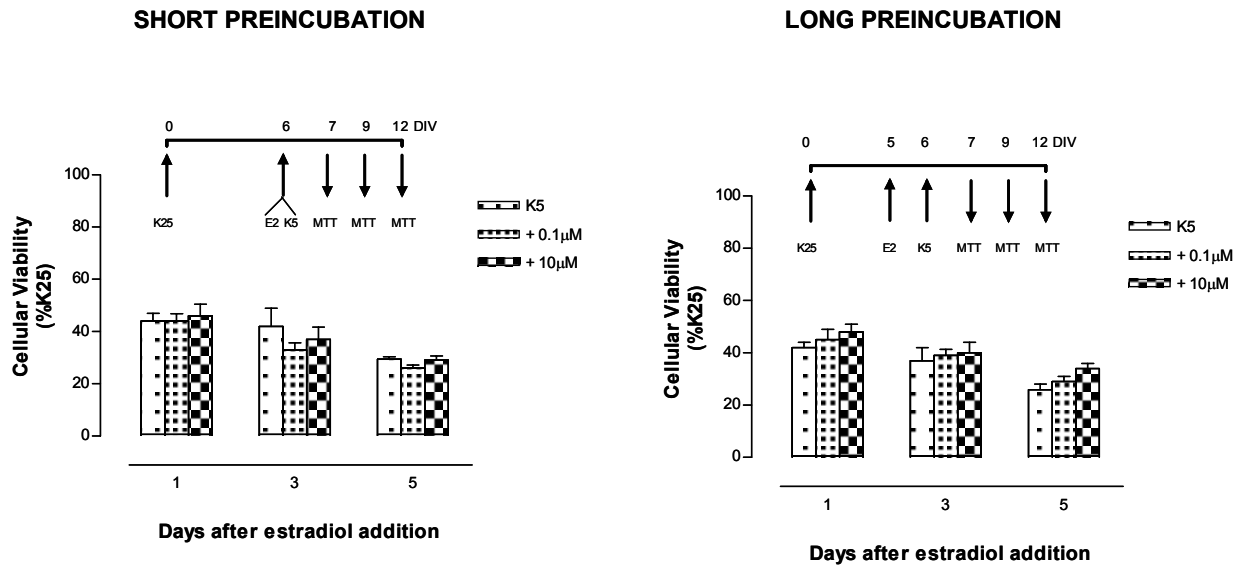


Figure 1 – Miñano et al

**A**



**B**

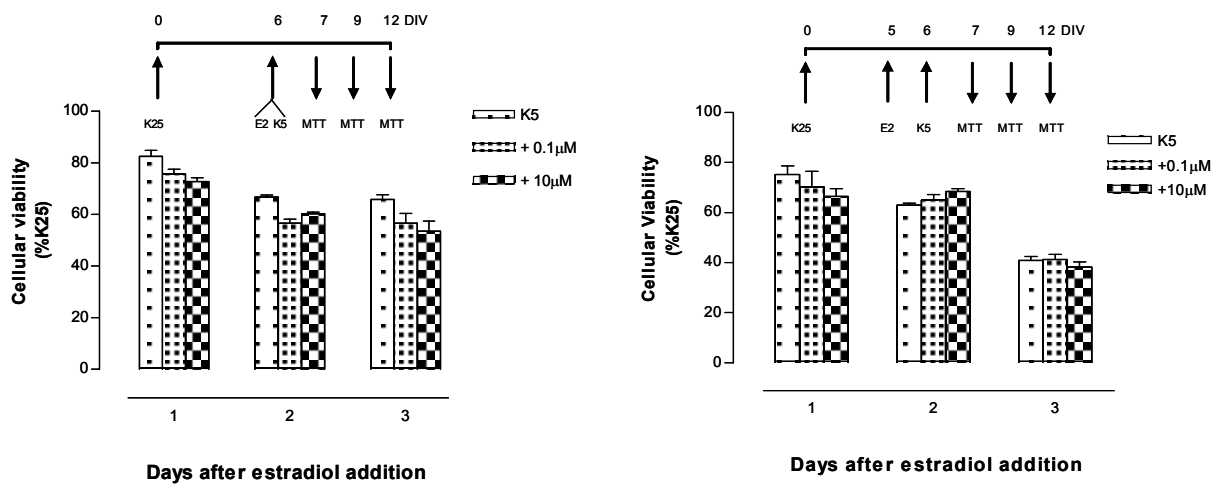
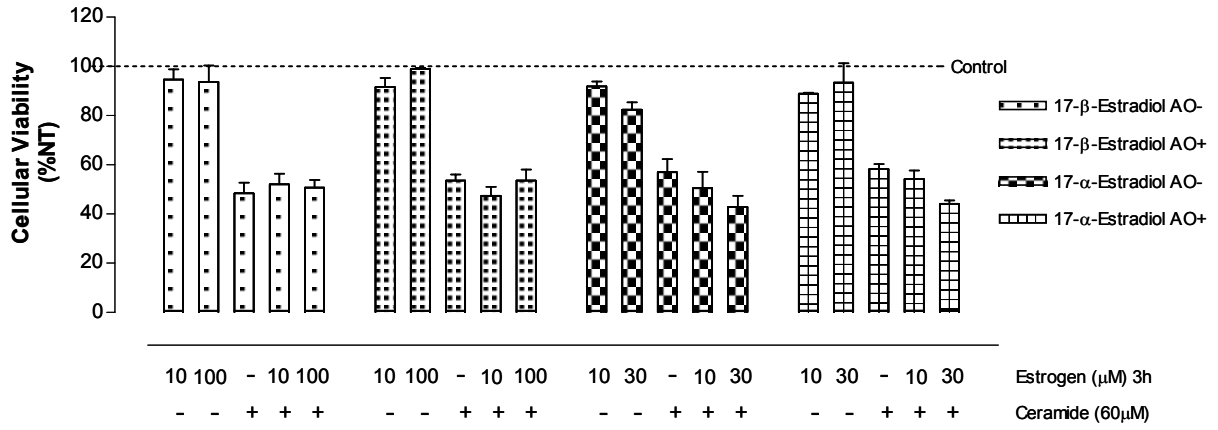


Figure 2 – Miñano et al



**A**



**B**

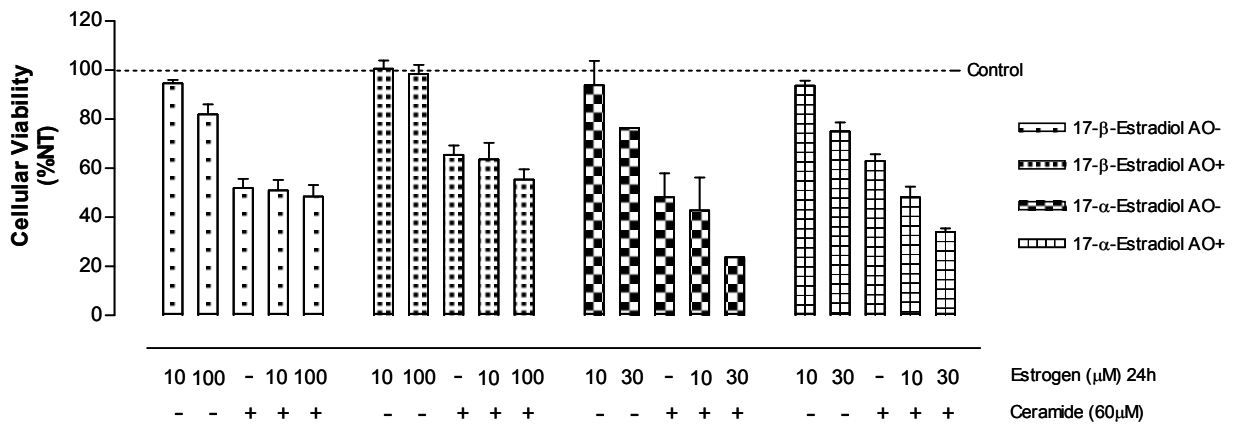


Figure 3 – Miñano et al

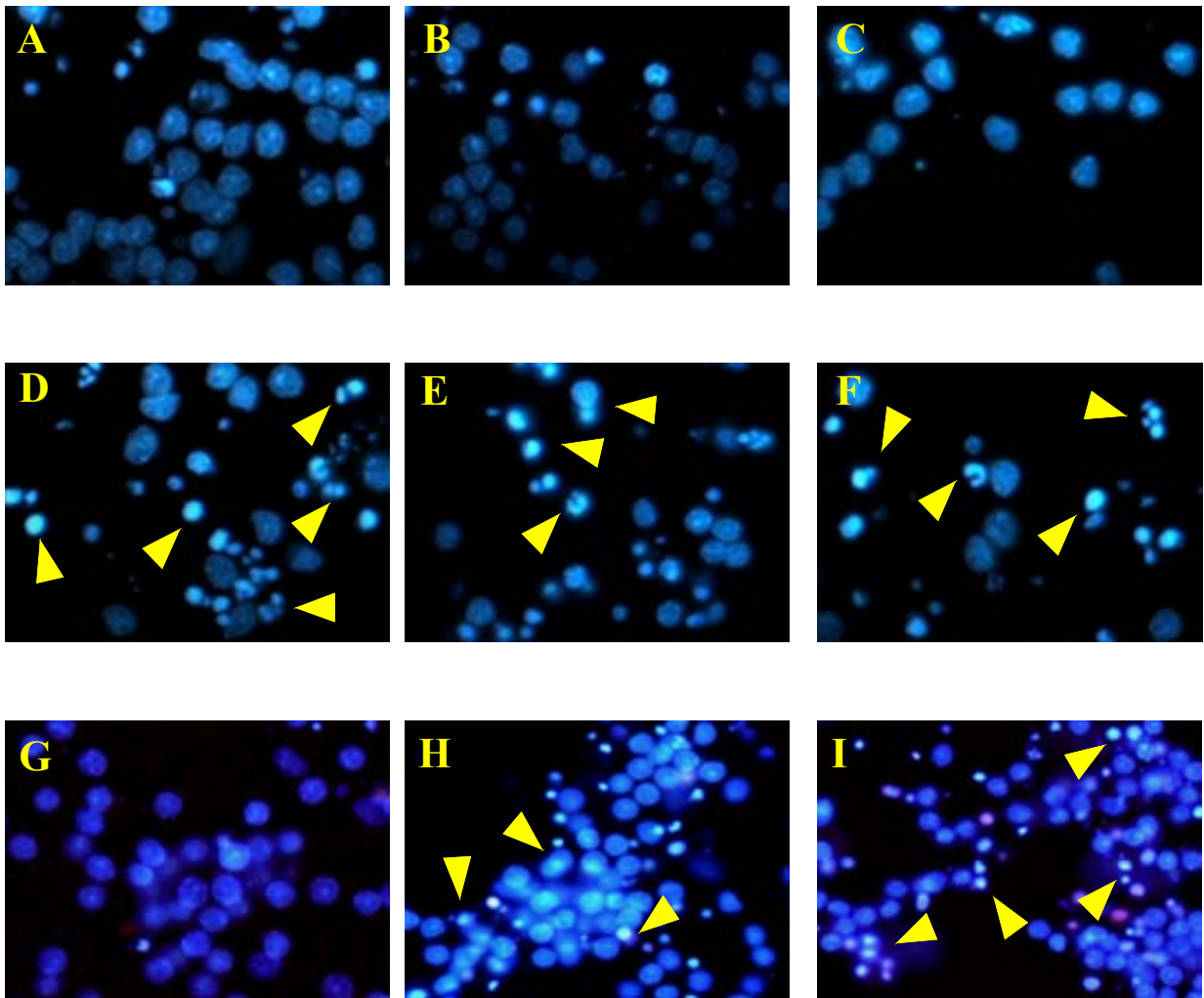


Figure 4 – Miñano et al

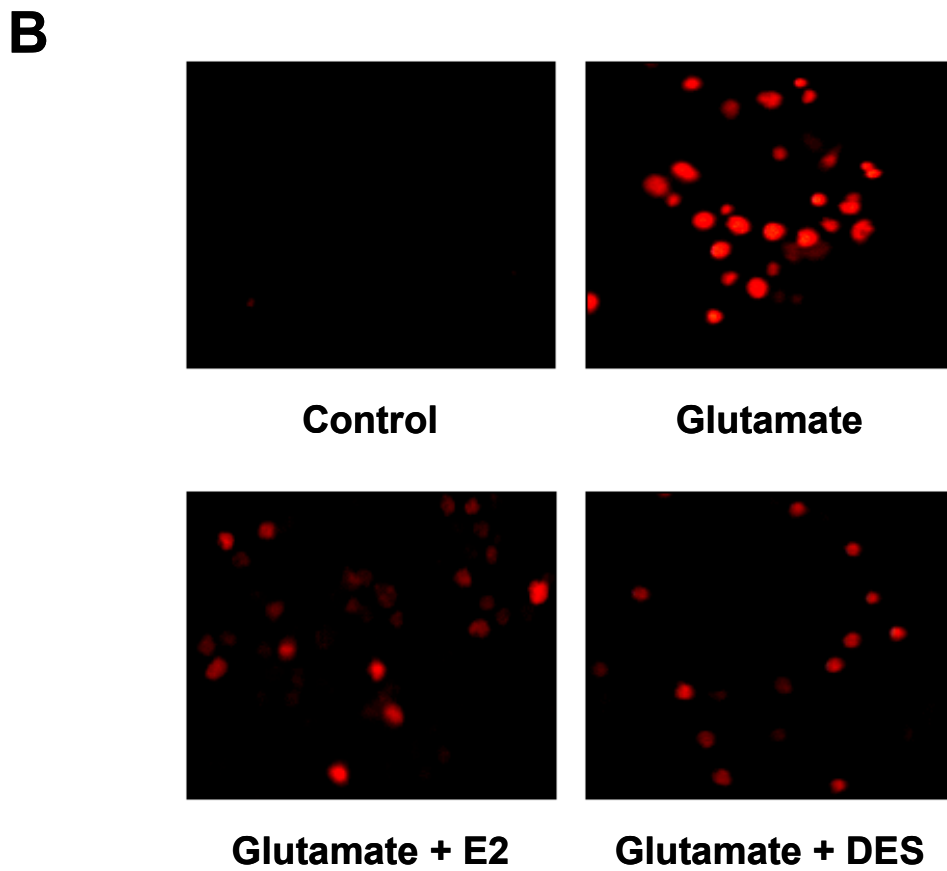
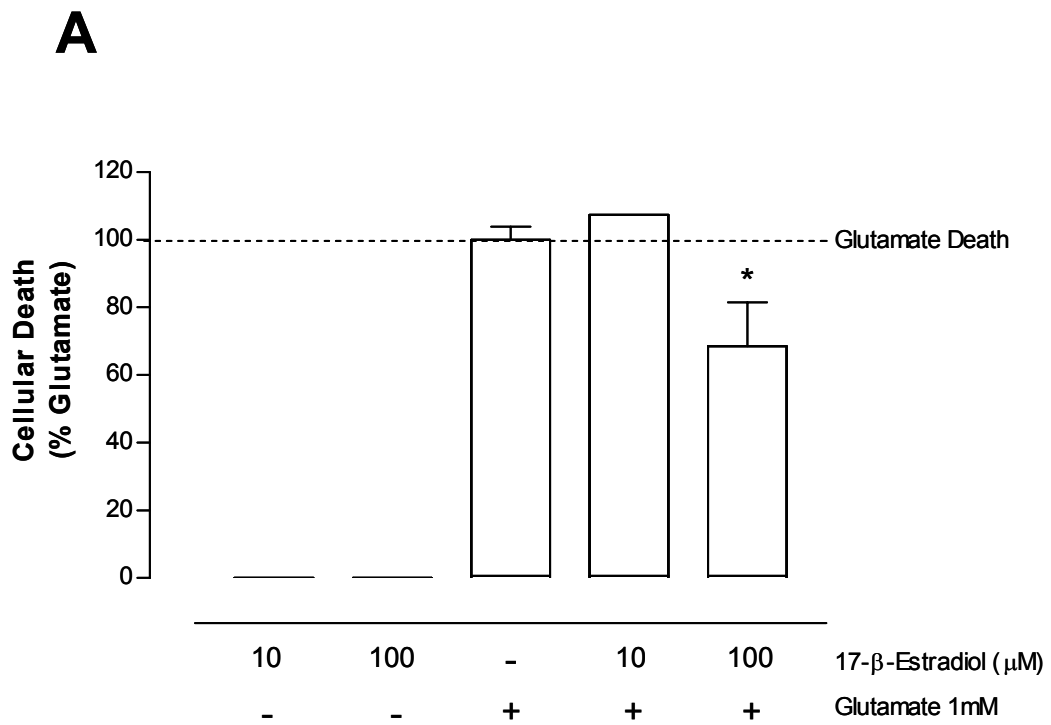


Figure 5 – Miñano et al

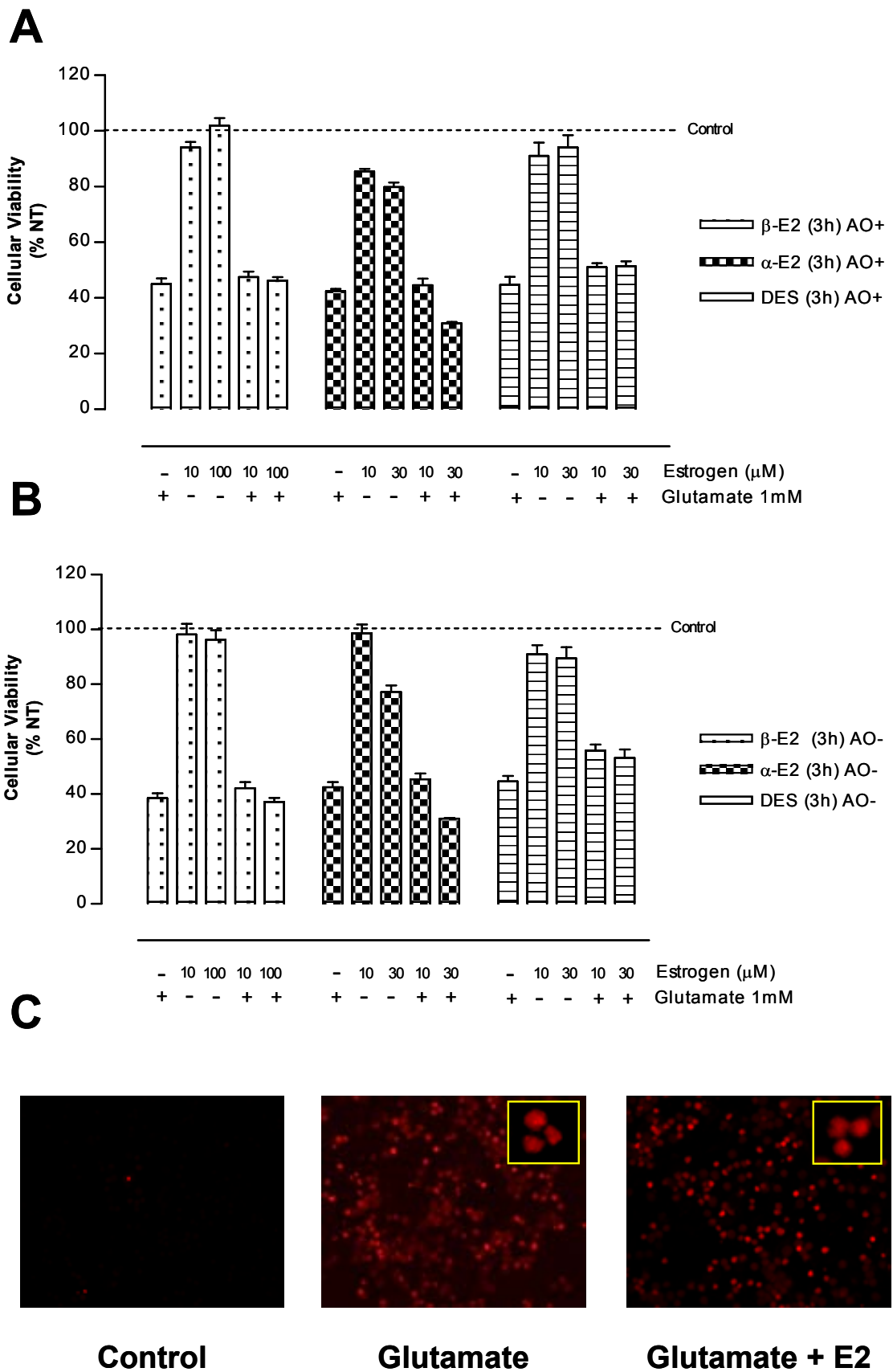
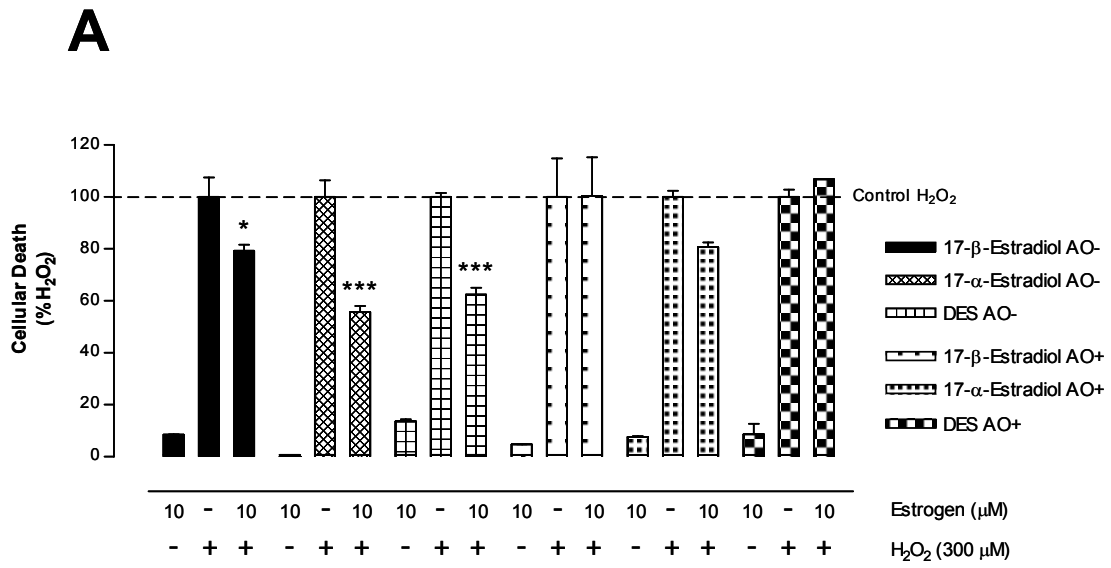


Figure 6 – Miñano et al



**B**

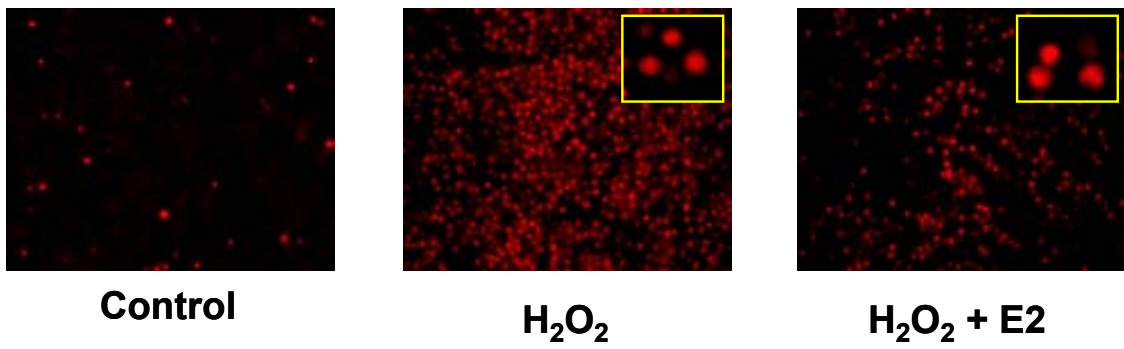
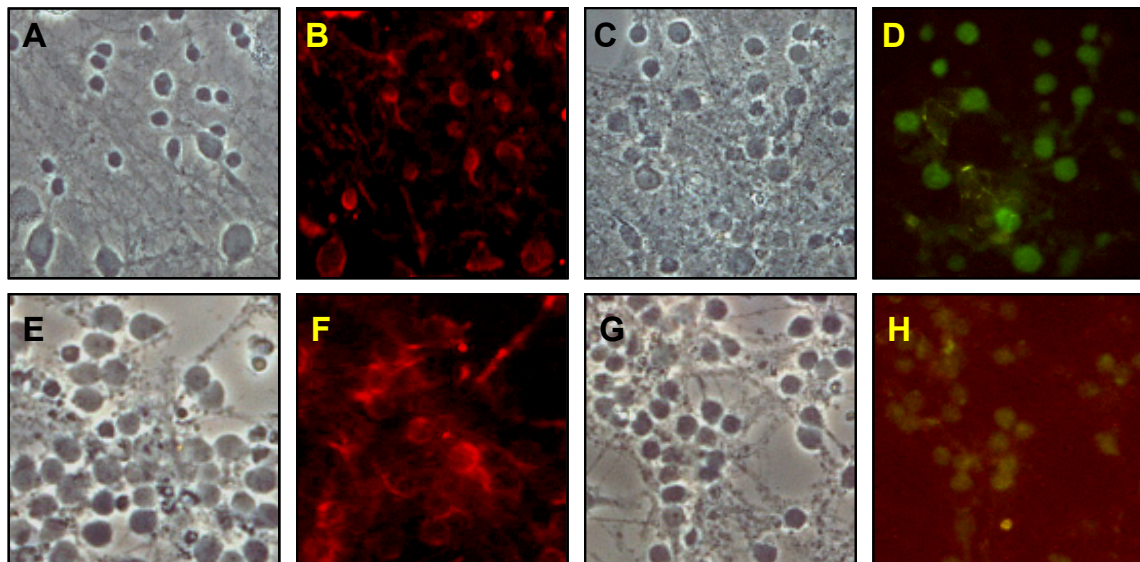


Figure 7 – Miñano et al

**A**



**B**

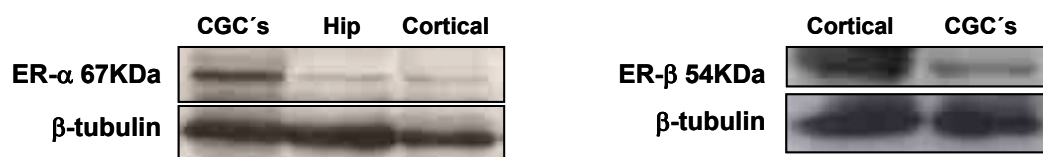
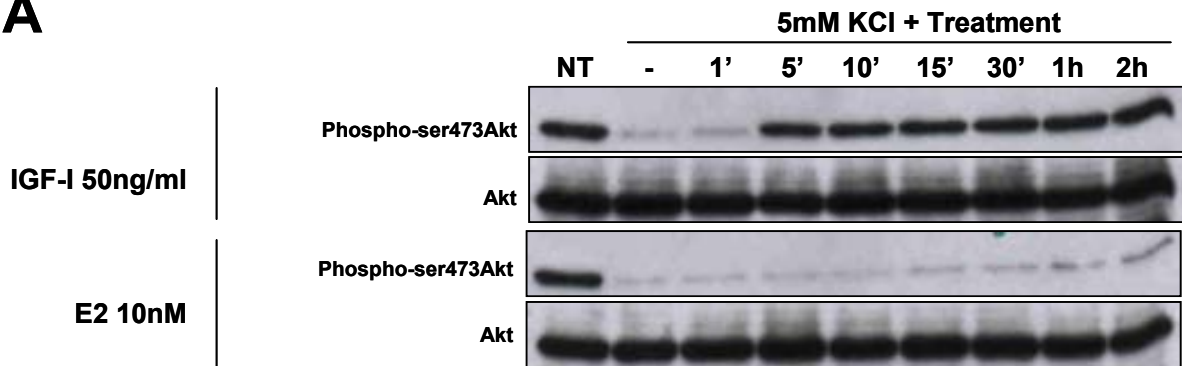
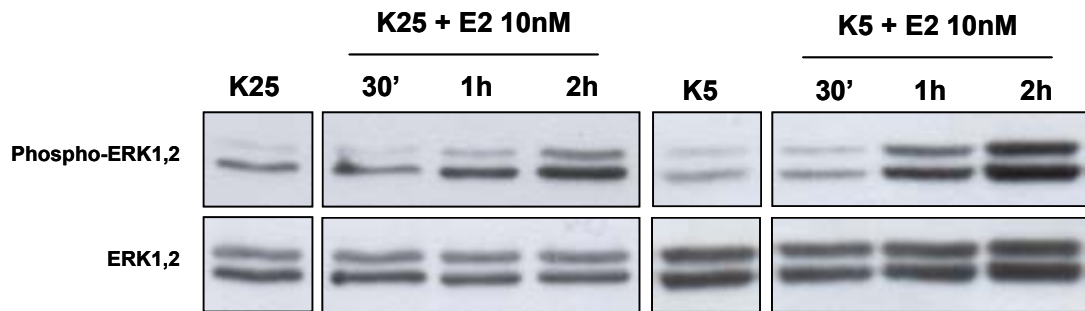


Figure 8 – Miñano et al

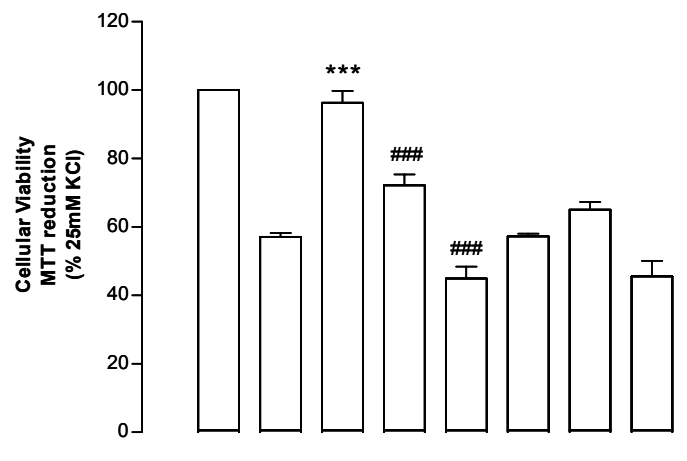
**A**



**B**



**C**

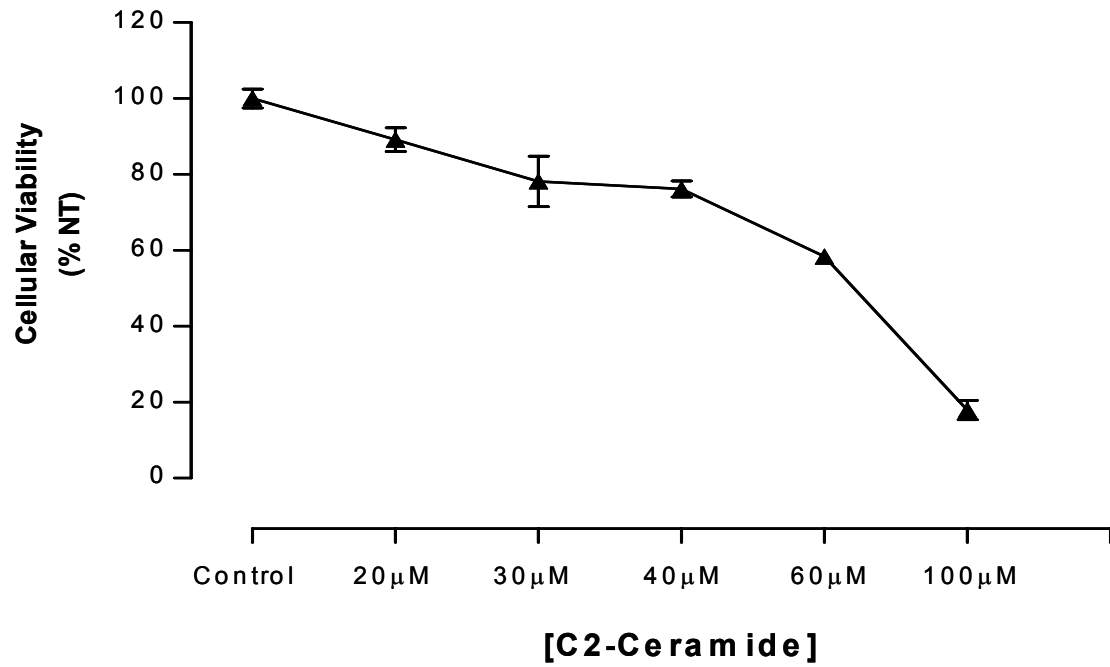


25mM KCl	+	-	-	-	-	-	-	-
5mM KCl	-	+	+	+	+	+	+	+
IGF-I 50ng/mL	-	-	+	+	+	-	-	-
E2 10nM	-	-	-	-	-	+	-	-
PD 98059 50μM	-	-	-	+	-	-	+	-
LY 294002 20μM	-	-	-	-	+	-	-	+

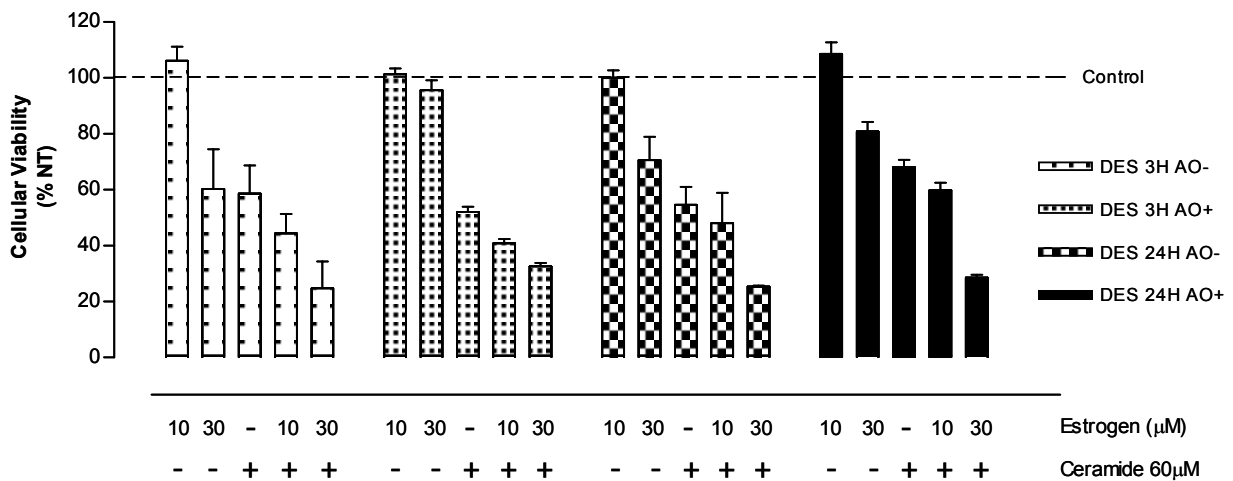
Figure 9 – Miñano et al

□ N > 3    \*\*\* p < 0,001    ### p < 0,001

1



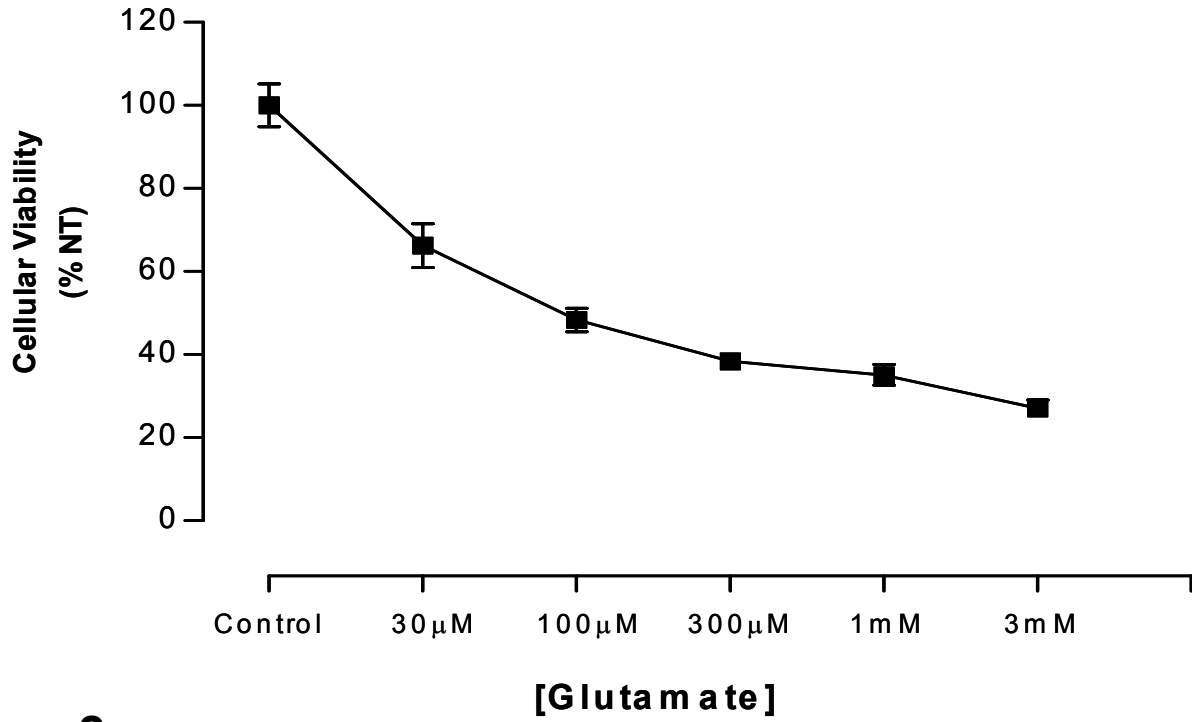
2



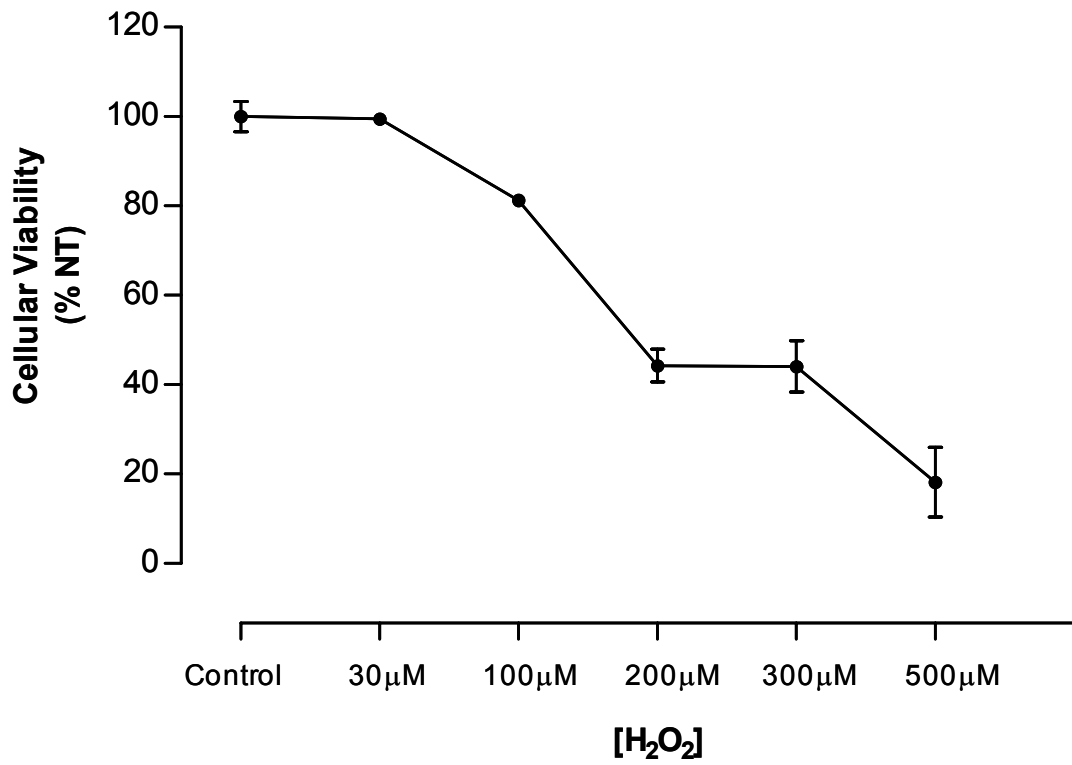
Additional Figure A – Miñano et al



1



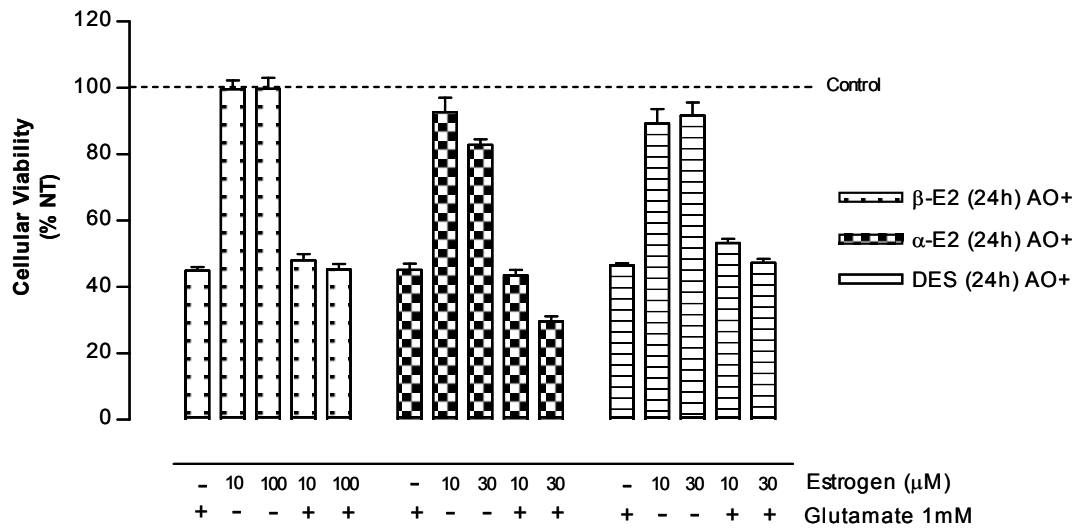
2



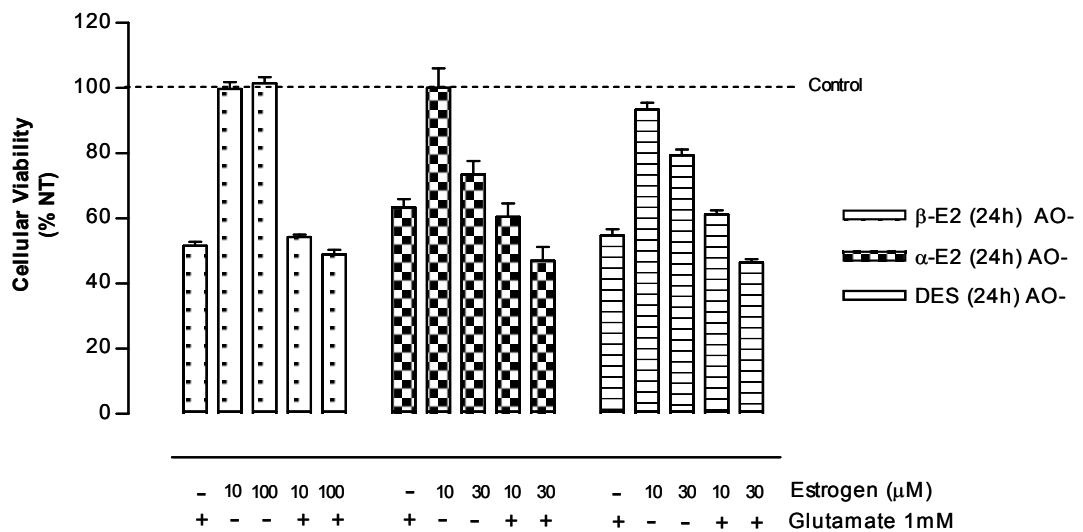
Additional Figure B – Miñano et al

LONG PREINCUBATION

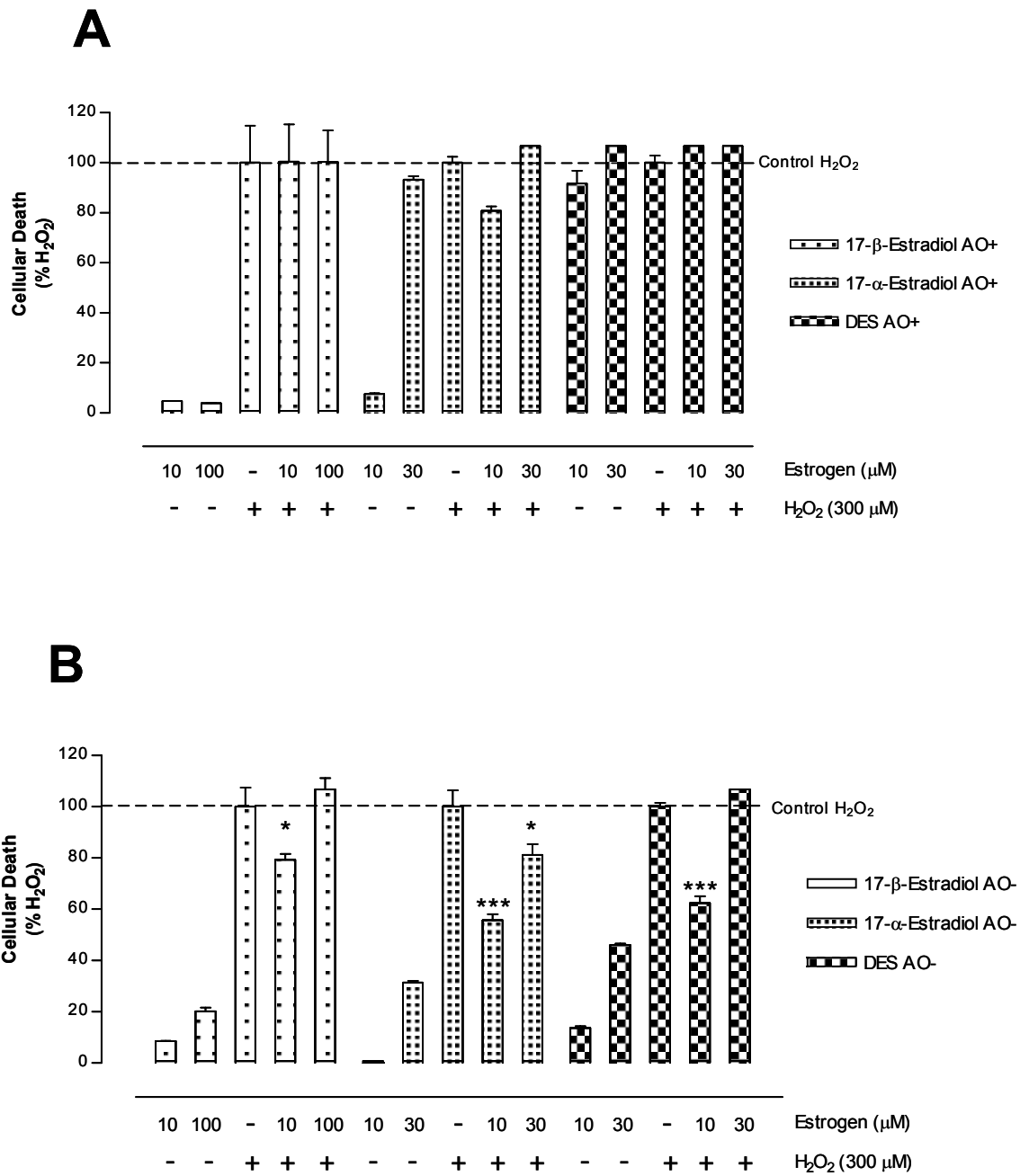
**A**



**B**



Additional Figure C – Miñano et al



Additional Figure D – Miñano et al

**3- Trabajo 3: *Estradiol facilitates neurite maintenance by a Src/Ras/ERK signalling pathway.***

Pendiente de enviar a *Journal of Cell Biology*

**Estradiol facilitates neurite maintenance by a Src/Ras/ERK signalling pathway**

Alfredo J. Miñano-Molina, Xavier Xifró, Virgili Pérez, Bruna Barneda & José Rodríguez-Alvarez

*Institut de Neurociències i Dpt. Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain.*

**Running title:** Estradiol activate Src/ras/ERK pathway in CGCs

**Address correspondence and reprints request to:** José Rodríguez-Alvarez, Institut de Neurociències, Edifici M, Campus de Bellaterra, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Cerdanyola del Vallès, Barcelona, Spain.

Phone: (34) 935 813 861; Fax: (34) 935 814 152; Email: jose.rodriguez@uab.es

**ABSTRACT**

Estrogens influence the development and function of the nervous system by rapidly modulating diverse intracellular signalling pathways. We have monitor in CGC cultures  $17\beta$ -estradiol-dependent ERK pathway stimulation.  $17\beta$ -estradiol clearly activate ERK phosphorylation in CGC cultured in low potassium via ER-alpha localized into plasmatic membrane. No activation of the Insuline-like Growth Factor– I Receptor (IGF-IR) was observed.  $17\beta$ -estradiol activates the ERK pathway through Ras-dependent Src kinase activity. Moreover,  $17\beta$ -estradiol-mediated ERK activation is involved in survival and neuronal plasticity through activation of different transcription factors as cAMP-response element-binding protein (CREB).  $17\beta$ -estradiol activates CREB and this activation could be involved in plasticity processes observed as cytoskeleton maintenance through MAP-2 structure conservation or increasing expression of proteins involved in neuritic growth.

**Keywords:**  $17\beta$ -estradiol, cerebellum, CGCs, cytoskeleton, CREB, cultures, E2-BSA, ER-alpha, ERK pathway, MAP2, neurites, p21ras, PPT, Src kinase.

**Abbreviations used:** CGC, cerebellar granule cells; CNS, central nervous system; ERK, extracellular signal regulated kinase; MEK, extracellular signal regulated kinase kinase; ER- $\alpha$ , estrogen receptor-alpha; ER- $\beta$ , estrogen receptor-beta; K25, 25mM KCl; K5, 5mM KCl; PBS, phosphate buffered saline; FCS, fetal calf serum; DCC-FCS, Dextrane-coated charcoal stripped FCS ; DIV, days *in vitro*; BSA, bovine serum albumine; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium; PI, propidium iodide; TBS-T, tris buffered saline-tween; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; DMSO, dimethyl sulfoxide ; IGF-I, Insulin-like growth factor-I; IGF-IR, Insulin-like growth factor-I receptor; CREB, cAMP-response-element binding protein; CaMK, Calmodulin kinase; YFP, yellow fluorescent protein; RBD, Ras binding domain; RT-PCR, reverse transcription PCR; GAPDH, Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase.

## INTRODUCTION

17- $\beta$ -estradiol has been associated with a variety of CNS effects related to cell survival, differentiation and morphology. For example, 17- $\beta$ -estradiol regulates the density of spines and dendrites in the hippocampus (Gould et al., 1990;Woolley and McEwen, 1994) (Murphy and Segal, 1996) and in the cerebellum (Sakamoto et al., 2003). It has been also described that 17- $\beta$ -estradiol induces neurite outgrowth and branching in cholinergic neurons (Dominguez et al., 2004). The morphological effects of 17- $\beta$ -estradiol in the CNS are not only observed in normal but also in damaged tissue (Gonzalez-Vidal et al., 1998;Shah et al., 2003;Vongher and Frye, 1999) and seem to be partly mediated by changes in the microtubular system due to a modification of the expression pattern of several cytoskeletal proteins like the MAP2 isoforms or tau (Reyna-Neyra et al., 2002;Shah et al., 2003).

The molecular mechanisms through which 17- $\beta$ -estradiol could elicit the effects described above are not fully understood. The mitogen-activated protein kinase kinase (MEK) / extracellular signal-regulated kinases (ERK) pathway is considered a major contributor to neuronal plasticity and it has been shown that is involved in activity-dependent formation of dendrites (Goldin and Segal, 2003;Koh et al., 2002;Kumar et al., 2005;Vaillant et al., 2002). Several studies have reported that 17- $\beta$ -estradiol could activate the MEK/ERK pathway in various tumour cell lines (Migliaccio et al., 1996), adipocytes (Dos Santos et al., 2002) as well as in neurons (Singer et al., 1999), (Watters et al., 1997), (Wong et al., 2003), likely by activation of 17- $\beta$ -estradiol receptors (ER) located in the plasma membrane (Stavis et al., 1999), (Falkenstein et al., 2000). Although still controversial, several studies supported that activation of ER $\alpha$  is triggering MEK/ERK pathway stimulation (Dos Santos et al., 2002;Singh et al., 1999;Watters et al., 1997). In some cases the transactivation of IGF-IR is needed for ER $\alpha$ -mediated activation of MEK/ERK pathway (Cardona-Gomez et al., 2002;Kahlert et al., 2000). A role of MEK/ERK pathway in 17- $\beta$ -estradiol-mediated effect on structural plasticity in the CNS has been reported in the hippocampus (Bi et al., 2000;Bi et al., 2001) and in basal forebrain cholinergic neurons (Dominguez et al., 2004). However, the mechanisms involved upstream and downstream ERK activation in 17- $\beta$ -estradiol-mediated effects on morphological effects are unknown at present. Some data suggest that the activation of the cAMP-response element-binding protein (CREB) could be involved. CREB has been implicated in synaptic plasticity events (Finkbeiner et al., 1997).and phosphorylation of CREB by 17- $\beta$ -estradiol is dependent on ERK activity in

## RESULTADOS

hippocampal cultures (Lee et al., 2004;Wu et al., 2005) and in the basal forebrain (Szego et al., 2006).

During the last years it has become apparent that 17- $\beta$ -estradiol could have an important role in the development of cerebellum. For example, it has been suggested that estrogens could be involved in the regulation of the numbers of neurons in the cerebellum (Wong et al., 2003) and of the dendritic growth and spine formation (Sakamoto et al., 2003). Interestingly, expression levels of ER $\beta$  correlate with the differentiation of Purkinje cells and the expression of ER $\alpha$  is maximal during the postnatal differentiation and migration of the cerebellar granule cells (CGCs) towards the internal granular layer (Altman, 1972;Belcher, 1999). It is well known that CGCs migration and differentiation is dependent on synaptic activity and the presence of trophic factors (Burgoyne et al., 1993;D'Mello et al., 1997). CGCs that do not receive trophic support will lost their neuritic morphology and die afterwards by apoptosis (Gallo et al., 1987). This situation could be mimicked in CGCs cultures, as they undergo spontaneous apoptosis if grown in physiological KCl concentrations (Gallo et al., 1987;Xifro et al., 2005).

In a previous work (Miñano et al., submitted) we have described that 17- $\beta$ -estradiol is able to activate MEK/ERK pathway in CGCs cultures grown in the absence of depolarizing or trophic factors support. In the present study we wanted to characterize the mechanisms involved upstream and downstream of ERK activation and whether the activation of this pathway will reverse the observed lost of the neuritic morphology.

## RESULTS

### *Estradiol activates ERK in cerebellar granule neurons*

Previous results have clearly shown that 17- $\beta$ -estradiol activates ERK MAPK in a number of different cell types including neurons (Migliaccio et al., 1998;Watters et al., 1997). Whereas in cortical neurons ERK activation by 17- $\beta$ -estradiol has been related to estrogens neuroprotection from excitotoxicity (Bi et al., 2000;Singer et al., 1999), this relationship between estrogens neuroprotection and ERK activation is less clear in other neuronal types such as CGCs (Wong et al., 2003). On the other hand, it had been suggested that ERK activation by 17- $\beta$ -estradiol underlies the estrogen effect in structural plasticity (Bi et al., 2000;Dominguez et al., 2004). Previous results from our laboratory indicate that 17- $\beta$ -estradiol is not able to exert a neuroprotective effect in CGCs although it increases ERK MAPK activity in KCl-deprived CGCs cultures



(Miñano et al., submitted; see also Fig 1A), open the possibility that it could be related to an eventual morphological effect of the estrogen in CGCs. The increase in ERK1 and ERK2 phosphorylation was not observed in CGCs treated with 17- $\alpha$ -estradiol (Fig 1B).

*ERK is activated via a plasma membrane located ER $\alpha$ .*

At present, it is not clear which molecular pathways are involved in the activation of ERK MAPK by 17- $\beta$ -estradiol in CGCs. However, because the activation is observed as soon as several minutes after estrogen addition (Fig 1), it is believed that classical action through nuclear receptors is not involved (Dos Santos et al., 2002; Singer et al., 1999). By contrast, there is increasing evidences favouring the existence of a plasma membrane ER which is mediating rapid nongenomic 17- $\beta$ -estradiol effects such as ERK activation (Dos Santos et al., 2002; Kelly and Levin, 2001; Singer et al., 1999; Singh et al., 1999). In this respect, whereas some reports suggest the presence of the classical ER $\alpha$  on the plasma membrane (Razandi et al., 1999; Singer et al., 1999; Song et al., 2004; Watson et al., 1999) others support the existence of a non-classical membrane ER (Filardo et al., 2000; Ropero et al., 2002; Singh et al., 2000). In this context we wanted to identify which ER was involved in the activation of ERK MAPK in CGCs. Our first approach was to determine whether a cell-impermeable 17- $\beta$ -estradiol was also able to rapidly increase ERK activation. For this purpose we decided to treat our CGCs cultures with 17- $\beta$ -estradiol covalently bound to BSA (E2-BSA). Treatment with E2-BSA reproduced the observed increase in ERK phosphorylation triggered by free 17- $\beta$ -estradiol (Fig. 1B). Moreover, a selective ER $\alpha$  agonist, 4,4',4''-(4-Propyl-[1H]-pyrazole-1,3,5-triyl)trisphenol (PPT), also activated ERK (Fig. 1B). The presence of ER $\alpha$  in our CGCs cultures was demonstrated by RT-PCR (Fig. 2A) and immunoblotting (Fig. 2B). Western blot analysis clearly shows the presence of a 67 kD band corresponding to ER $\alpha$ . No changes in its intensity were observed under the different treatments. The presence of ER $\alpha$  in the plasma membrane was further confirmed by cellular subfractionation and confocal microscopy. As it is shown in Fig. 2C, ER $\alpha$  was mainly localized in the membrane fraction, whereas ER $\beta$  was detected in the nuclear fraction. Moreover, confocal microscopy shows an immunoreactivity to ER $\alpha$  that is coincident with its presence in the plasma membrane (Fig. 2D). Altogether, these results indicate that membrane located ER $\alpha$  is mediating ERK activation by 17- $\beta$ -estradiol.

*Cross-talk between ER $\alpha$  and IGF-IR is not involved in 17- $\beta$ -estradiol activation of ERK.*

Several mechanisms had been involved in ERK activation by estrogens. Some reports suggest that ERK activation is due to a transactivation of receptors for different trophic factors like EGFR (Filardo et al., 2000) or IGF-IR (Cardona-Gomez et al., 2001; Song et al., 2002; Song et al., 2004). On the other hand, it has been also proposed that membrane ER could activate ERK by a mechanism that requires the activation of the tyrosine kinase Src (Belcher et al., 2005; Dos Santos et al., 2002; Nethrapalli et al., 2001). We first checked whether the activation of membrane ER $\alpha$  will transactivate IGF-IR. Since this transactivation relies on a direct interaction of activated ER $\alpha$  with IGF-IR, we performed a series of immunoprecipitation studies to confirm this issue. As it is shown in Fig. 3, 17- $\beta$ -estradiol was not able to activate IGF-IR. No tyrosine phosphorylation was detected when IGF-IR was immunoprecipitated from 17- $\beta$ -estradiol-treated CGCs cultures. By contrast, treatment with IGF-I did produce a fast tyrosine phosphorylation of its receptor. Moreover, no interaction between IGF-IR and ER $\alpha$  was observed in stimulated and non stimulated CGCs cultures. We conclude that activation of ERK by 17- $\beta$ -estradiol in CGCs cultures is not due to a transactivation of IGF-IR by activated ER $\alpha$ .

*17- $\beta$ -estradiol activates Src tyrosine kinase in CGCs cultures*

As indicated above, some reports have shown that ERK activation by estrogens is mediated by activation of the tyrosine kinase Src. In this context we have studied the eventual activation of this kinase by 17- $\beta$ -estradiol in CGCs cultures. For this purpose we have monitored the phosphorylation of tyrosine 416 of Src. Our results show that treatment of CGCs cultured in K5 with the estrogen caused a transient activation of Src (Fig. 4A). The role of Src in the activation of ERK by 17- $\beta$ -estradiol was further supported by the use of PP2, a specific inhibitor of Src. Addition of PP2 was able to inhibit the activation of ERK by PPT (an agonist of ER $\alpha$ ; Fig. 4B) or 17- $\beta$ -estradiol (data not shown). Moreover, in cellular subfractionation studies we have seen that Src is located in the membrane fraction as ER $\alpha$  is. We believe that a direct interaction of Src (and probably Shc) with activated ER $\alpha$  could be responsible for its activation.

*p21ras mediates ERK activation by 17- $\beta$ -estradiol*

It is well known that ras activation is a MEK/ERK pathway initiator signal (Bouschet et al., 2003; Lev et al., 1995) and it is also known that under certain circumstances it has been described that Src could activate ras (Nethrapalli et al., 2001; Rusanescu et al.,

1995). Thus, we determined whether 17- $\beta$ -estradiol was able to activate ras in our CGCs cultures. As indicated in Fig. 5A, 17- $\beta$ -estradiol produced a sustained activation of ras (monitored as ras-GTP) during two hours. Maximal activation was observed at 30 min. In order to determine whether this activation of ras is directly related to ERK activation by 17- $\beta$ -estradiol we co-transfected the CGCs cultures with ras (in order to over express this protein) and c-myc ERK to monitor ERK activation by its translocation to the nucleus. When transfected CGCs were challenged with 17- $\beta$ -estradiol, a clear translocation of c-myc ERK was observed (Fig. 5B). Similarly, BDNF and IGF-I were able to stimulate ERK translocation to nucleus (Fig. 5B). Accordingly with the implication of ras in ERK activation, CGCs co-transfected with rasV12 (a constitutive active mutant) and c-myc ERK also showed ERK translocation (see additional Fig. S3). Also, the expression of the inactive mutant of ras (rasN17) did block ERK translocation by IGF-I (see additional Fig. S3).

*17- $\beta$ -estradiol activates the transcription factor cAMP response element-binding protein (CREB).*

Several evidences indicate that estrogens cause the phosphorylation and activation of CREB in different cells types, including neurons (Gu et al., 1996; Lee et al., 2004; Wade and Dorsa, 2003; Zhou et al., 1996). Since CREB is involved in synaptic plasticity and in the generation of new dendrites and spines (Finkbeiner et al., 1997; Segal and Murphy, 1998), it is considered that CREB activation could be involved in the effects of estrogens on dendritic elongation and other plasticity events (Yokomaku et al., 2003). Since the activation of MEK/ERK is one of the main pathway involved in CREB activation, we wanted to know if 17- $\beta$ -estradiol was able to stimulate CREB phosphorylation. As it is show in Fig. 6, estrogen addition produce an increase in CREB phosphorylation (serine 133) after 30 min. Maximal effect was observed after 1 hr, well after the increase in ERK activity by 17- $\beta$ -estradiol (Fig. 1A).

*17- $\beta$ -estradiol promotes the maintenance of dendritic arborisation under proapoptotic conditions.*

It has been reported that 17- $\beta$ -estradiol has an important role in structural plasticity in the brain and also a compensatory effect in response to cortical lesions has been described (Dubal et al., 1998). In the present report we have shown that 17- $\beta$ -estradiol was able to stimulate CREB by a Src/Ras/ERK pathway in CGCs cultures deprived of trophic factors (K5 without B27). Under this condition, CGCs lost the morphological integrity of their neurites and the neuritic network almost disappear (Fig. 7A). These

features correlated with a decrease in the MAP2 immunolabelling and an evident disorganization of the neuronal cytoskeleton (Fig. 7C). By contrast the integrity of neurites and neuritic network appear better preserved in CGCs cultures treated with 17- $\beta$ -estradiol (Fig. 7A). Accordingly, the presence of 17- $\beta$ -estradiol-BSA or the ER $\alpha$  agonist PPT increased the levels of MAP2 (Fig. 2B) and preserved the integrity of the cytoskeleton (Fig. 2C). The maintenance of the neurites morphology by 17- $\beta$ -estradiol was accompanied by an increase in the levels of the synaptic protein synaptotagmin I observed in CGCs cultures deprived from potassium and B27 (Fig. 7B). These results suggest that estradiol is able to preserve the dendritic structure and the levels of synaptic proteins in CGCs cultures deprived from trophic factors. Moreover, the effect of 17- $\beta$ -estradiol is eliminated by the Src inhibitor PP2 (Fig. 7A), suggesting that the Src/Ras/ERK pathway described here could be involved.

## DISCUSSION

Activation of ERK/MAPK pathway has been shown to mediate some effects of 17 $\beta$ -estradiol on cellular survival and differentiation in different systems (Migliaccio et al., 1996; Dos Santos et al., 2002; Singer et al., 1999; Watters et al., 1997). In the present study we have confirmed the activation of ERK by 17 $\beta$ -estradiol in CGCs reported previously (Wong et al., 2003; Belcher et al., 2005). However, when we started this study, nothing was known about the mechanisms upstream and downstream ERK activation in CGCs. Moreover, we have observed that ERK activation was unrelated to a neuroprotective effect of the estrogen in CGCs (A. Miñano, M.A. Cerbón and J. Rodríguez-Alvarez). However, it was unknown whether ERK activation was related to the role of 17 $\beta$ -estradiol in the described regulation of the morphology and number of dendrites and dendritic spines in the cerebellum (Sakamoto et al., 2003).

Several reports have suggested that ERK/MAPK pathway activation by 17 $\beta$ -estradiol is mediated by ER- $\alpha$  stimulation (Kahlert et al., 2000; Migliaccio et al., 1998; Song et al., 2002), although the implication of a different ER has been also proposed (Bjornstrom and Sjoberg, 2002; Duan et al., 2001; Kelly and Levin, 2001; Mize et al., 2003; Singh et al., 2000a; Wade et al., 2001; Watters et al., 1997). Also, an important controversy exists around the localization of ER between the classical presence in the nucleus and cytoplasm and their presence in the plasma membrane (Fiorelli et al., 1996; Razandi et al., 1999). For example, Toran-Allerand et al. (Toran-Allerand et al., 2002) have recently suggested the existence of a new ER $\alpha$  variant, the ERX that have a very close molecular weight and is also recognized by ER $\alpha$  antibodies. Our data will suggest that

ERK/MAPK activation by  $17\beta$ -estradiol in CGCs is mediated by the stimulation of ER $\alpha$  (probably ERX) located in the plasma membrane since: 1) treatment of CGCs with  $17\beta$ -estradiol conjugated with BSA which is not permeable to plasma membrane (Stavis et al., 1999; Falkenstein et al., 2000) is able to mimic ERK activation; 2) cellular subfractionation and confocal microscopy show that ER $\alpha$  but not ER $\beta$  is located in the plasma membrane and 3) PPT, a selective agonist of ER- $\alpha$  (Cordey and Pike, 2005), was able to activate ERK in a similar way than  $17\beta$ -estradiol. These results are similar to the ones observed in MCF-7 cells (Song et al., 2002), adipocytes (Dos Santos et al., 2002), endothelial cells (Pedram et al., 2006) and astrocytes (Pawlak et al., 2005). However, it has been also reported the activation of ERK by  $17\beta$ -estradiol in the absence of ER $\alpha$  (Singh et al., 2000a).

ERK/MAPK pathway stimulation by  $17\beta$ -estradiol has been reported to be mediated by a transactivation of IGFI-R by ER (Kahlert et al., 2000). Garcia-Segura and co-workers have shown that estradiol administration results in a tyrosine phosphorylation of IGF-IR in the hypothalamus, indicating that the hormone is able to activate IGF-IR in this brain area (Mendez et al., 2003). However our results did not support an implication of IGF1-R in the observed ERK/MAPK pathway stimulation by  $17\beta$ -estradiol in CGCs since we did not see the phosphorylation of IGFI-R. Which was then the mechanism involved in the stimulation of ERK/MAPK pathway by  $17\beta$ -estradiol? It has been suggested that the presence of ER- $\alpha$  in the membrane allows the formation of protein complexes (Toran-Allerand et al., 1999) in which Src kinase protein could be involved (Nethrapalli et al., 2001). Src activation by  $17\beta$ -estradiol has been reported in several systems including human cancer-derived cell lines (Migliaccio et al., 2000; Wong et al., 2002), in the neocortex (Nethrapalli et al., 2001) and in CGCs (Belcher et al., 2005). Here, we confirm that  $17\beta$ -estradiol is able to promote the phosphorylation of a tyrosine residue that is essential to Src activation, Y416, in a time-course that precedes ERK phosphorylation. Accordingly, PP2, an inhibitor of Src, produced a decrease in ERK/MAPK pathway activation by  $17\beta$ -estradiol. We have also found a colocalization of ER $\alpha$  and Src in the membrane fraction. However we could not know whether a direct interaction between both proteins (Migliaccio et al., 1998) or the mediation of a G protein (Dos Santos et al., 2002; Razandi et al., 2003; Belcher et al., 2005) is responsible for the activation of Src by  $17\beta$ -estradiol.

Few data is available about the downstream elements that are involved in the Src-mediated activation of ERK/MAPK pathway by  $17\beta$ -estradiol. It has been described that ER $\alpha$  stimulation produces the phosphorylation of Shc and the formation of the Shc-

Grb2-Sos complex in MCF-7 cells (Song et al., 2002) that has been reported to activate p21Ras (Song et al., 2004). Accordingly a report by Nethrapalli et al (Nethrapalli et al., 2001) reported that Src and p21Ras are activated by 17 $\beta$ -estradiol in organotypic cultures from the neocortex. However, no direct link was established between the phosphorylation of Src and ERK by 17 $\beta$ -estradiol and p21Ras. Our results indicate that ERK/MAPK pathway activation by ER $\alpha$ /Src could be dependent on p21Ras. We show here that maximal activation of p21Ras by 17 $\beta$ -estradiol is observed between 10 and 30 min after the addition of the hormone. Moreover, we also demonstrate the translocation of ERK to the nucleus upon stimulation with 17 $\beta$ -estradiol, IGF-I or BDNF of cells transfected with c-myc-ERK and wild-type Ras. No nuclear translocation of c-myc-ERK was observed in cells transfected with the inactive mutant of p21Ras (RasN17) upon stimulation, suggesting that ERK activation by 17 $\beta$ -estradiol in CGCs is dependent on p21Ras. Accordingly, transfection of CGCs with the constitutive active mutant of p21Ras (RasV12) produced a nuclear translocation of c-myc-ERK in the absence of extracellular stimulation.

Several evidences indicate that activation of ERK and the subsequent translocation to the cellular nucleus elicited by 17 $\beta$ -estradiol is associated to the phosphorylation and activation of the transcription factor CREB (cAMP response element-binding protein) (Lee et al., 2004; Szego et al., 2006; Wu et al., 2005; Zhao et al., 2005). CREB has been widely involved in cellular survival, differentiation and also in synaptic plasticity processes that require a remodelling of the dendritic arborisation or the number of synaptic spines (Finkbeiner et al., 1997; Murphy and Segal, 1996; Segal and Murphy, 1998). Accordingly it is likely that CREB activation could be mediating some of the reported effects of 17 $\beta$ -estradiol on synaptogenesis, regulation of dendritic spines and dendritic growth (Dominguez et al., 2004; Murphy and Segal, 1997; Reyna-Neyra et al., 2002; Sakamoto et al., 2003; Segal and Murphy, 1998). Accordingly blocking CREB activation causes a decrease in synapse formation by 17 $\beta$ -estradiol *in vitro* (Murphy and Segal, 1997). In this context we were able to observe the activation of CREB by 17 $\beta$ -estradiol in CGCs. However, further experiments should be addressed to link CREB activation to the Src/Ras/ERK pathway described here.

A direct involvement of 17 $\beta$ -estradiol and ERK/MAPK pathway activation in plasticity has been described in hippocampal and forebrain cholinergic neurons (Bi et al., 2001; Dominguez et al., 2004). It has been also reported that this pathway is regulating mitosis and cell death in immature (Wong et al., 2003) but not in mature CGCs (A. Miñano, M.A. Cerbón and J. Rodríguez-Alvarez; unpublished observations). However,

during these studies it became evident that  $17\beta$ -estradiol contributed to the maintenance of the neuritic structure of CGCs cultures in the absence of trophic support. This effect was dependent on Src/ERK activation since inhibition of these proteins dramatically abolished the maintenance of the morphology by  $17\beta$ -estradiol. Moreover,  $17\beta$ -estradiol was also able to inhibit the lost of the cytoskeletal structure mediated by the withdrawal of tropic support in CGCs cultures and the protein levels of MAP2. This preventive effect was also dependent on Src and ERK activity suggesting that in CGCs the Src/Ras/ERK pathway triggered by  $ER\alpha$  stimulation is involved in the maintenance of the structure and neuritic morphology of CGCs. Also, the fact that estradiol is able to increase the levels of synaptotagmin, a protein of the machinery involved in synaptic vesicles exocytosis, suggest that the hormone could also be related to the regulation of synapse function in CGCs. Further work is in progress to support this possibility.

In summary, in the present study we have demonstrated that  $17\beta$ -estradiol, acting through  $ER\alpha$ , activate the Src/Ras/ERK/CREB pathway and that this pathway could be involved in the effect of the hormone in the maintenance of the morphology and synaptic activity in CGCs cultures.

**Acknowledgments:** This work was supported by grants from Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF2001-1941 and SAF2005-05106) and Ministerio de Sanidad y Consumo (Red G03/167) to J.R.A. A.M is a recipient of a predoctoral fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia and B.B is a recipient of a predoctoral fellowship from the Universidad Autónoma de Barcelona.

## MATERIALS AND METHODS

### *Reagents*

Human recombinant IGF-I was from R&D Systems. 4,4',4''-(4-Propyl-[1H]-pyrazole-1,3,5-triyl)trisphenol (PPT) were from Tocris. PP2 was from Alexis Biochemical. All other chemicals were purchased from Sigma. IGF-I was dissolved in PBS containing 10mM acetic acid and 0.1% BSA. E2-BSA (17- $\beta$ -estradiol 6-(o-carboxymethyl)oxime:BSA) was dissolved in PBS and the solution filtered by a 3 kDa cut-off filter (Millipore, Billerica, MA) to remove free estrogens and subjected to centrifugation at 3.000 x g for 4h at 4°C. The retentate was washed twice with PBS and resuspended immediately before use.

### *Cell cultures*

Cerebellar granule neurons cultures (CGCs) were obtained from 7-8 days-old-rat pups as described previously (Rodriguez et al., 1991). Cells were enzymatically and mechanically disrupted and plated at  $300 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> in poly-L-lysine pre-coated wells or dishes. Cultures were kept at 37 C, 100% humidity and in 95% air, 5%CO<sub>2</sub> atmosphere until use. CGCs were cultured in DMEM without red phenol supplemented with 2% B-27 (Invitrogen), 30mM glucose, 2mM glutamine, 25.000 units of penicillin, 25mg streptomycin and 25mM KCl. When necessary, KCl deprivation-mediated apoptotic death of CGCs cultures was induced by changing at 8 DIV the 25 mM KCl (K25) and B-27 containing medium towards a K5 or K25 medium without B-27.

MCF7 cells were (a generous gift from Dr. Miquel Saceda, Universidad Miguel Hernández, Alicante) plated in 10% foetal calf serum (FCS)-DMEM and maintained in a humidified 95% air, 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C. Two days later the medium was changed into phenol red-free DMEM supplemented with 2,5% dextrane-coated charcoal stripped FCS (DCC-FCS) that was replaced every two days.

### *Evaluation of cellular viability.*

Neuronal viability was measured by the 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay (Behl et al., 1994;Behl et al., 1995). Briefly, MTT (0.2 mg/ml) was added to cultures and incubated for 45 min at 37°C. The medium was then gently aspirated and DMSO was added to solubilize the blue formazan product. Quantification of formazan production was done in a Multiskan (Labsystems) plate



reader at 560 and 620 nm. Data are presented as mean  $\pm$  SEM of values obtained from three or four independent experiments repeated six times.

#### *Cell Stimulation and lysate preparation*

CGCs cultures were treated with 17- $\beta$ -estradiol, PPT, IGF-I or BDNF as indicated in the figure legends. In some experiments cells were pre-treated for 30 min prior to 17- $\beta$ -estradiol addition with PP2. Cultures were washed once with ice-cold PBS and lysed in binding buffer (20mM Tris pH 7.5, 1% NP-40, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 1mM PMSF, 10 $\mu$ g/ml aprotinine, 20 $\mu$ g/ml leupeptine, 1mM Na<sub>2</sub>VO<sub>4</sub>). Lysates were centrifuged at 13,000 x g for 10 min at 4°C and the protein in the supernatant was quantified by a DC protein assay kit based on the Bradford method (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

#### *Subcellular fractionation*

Cerebellar granule neurons were rinsed twice with PBS and homogenated in buffer containing 10mM HEPES, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM KCl and protease inhibitors (pH 7.9). The homogenate was centrifuged at 2,000 X g for 15 min at 4°C. Pellet represented the nuclear fraction. The supernatant was further centrifuged at 100,000 X g for 1 hour at 4°C to yield membranous (pellet) and cytosolic fractions.

#### *Immunoblotting*

Cellular lysates (30  $\mu$ g protein) were resolved in a 10% SDS-PAGE gel and transferred onto Hybond-P polyvinylidene difluoride or Hybond-C Extra, Nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences). Blots were blocked at room temperature for 1 hour with 5% BSA (fraction V) or 5% fat-free milk in TBS containing 0.1% Tween 20 and incubated at 4°C overnight in blocking buffer using one of the following primary antibodies: monoclonal estrogen receptor ER- $\alpha$  (SRA-1010, C-542; StressGen Biotechnologies Corp; 1:1000), polyclonal estrogen receptor ER- $\alpha$  (sc-542, MC-20; Santa Cruz Biotechnology, Inc; 1:1000), polyclonal estrogen receptor ER- $\beta$  (sc-8974, H-150; Santa Cruz Biotechnology, Inc; 1:1000), polyclonal anti-IGF-IR $\beta$  antibody (sc-713, C-20; Santa Cruz Biotechnology, Inc; 1:1000), polyclonal phospho-p42/44 Map Kinase (Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>) (#9101; Cell Signalling Technology; 1:1000), polyclonal p42/44 Map Kinase (#9102; Cell Signalling Technology; 1:1000), polyclonal phospho-Akt (Ser<sup>473</sup>) (#9271; Cell Signalling Technology; 1:1000), polyclonal Akt (#9272; Cell Signalling Technology; 1:1000), polyclonal phospho-CREB (Ser<sup>133</sup>) (#9191; Cell Signalling Technology; 1:1000), polyclonal CREB (#9192; Cell Signalling Technology; 1:1000),  $\beta$ -

## RESULTADOS

tubulin (556321, 5H1; BD PharMingen; 1µg/ml), monoclonal phosphotyrosine (4G10; Upstate Cell Signalling; 1:1000), polyclonal phospho-Src (Tyr<sup>416</sup>) (#2101; Cell Signalling Technology; 1:1000), monoclonal v-Src (clone 327, S1686; Sigma; 1:1000), monoclonal GAPDH (clone 6C5, 4300; Ambion Inc; 1:40000), Histone H1 (sc-8616, C-17; Santa Cruz Biotechnology, Inc.; 1:1000), monoclonal MAP2 (clone AP20, MAB3418; Chemicon International Inc.; 1:1000), monoclonal Synaptotagmin 1 (clone 41.1, 105 011; Synaptic Systems; 1:2000). After washing, blots were then incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies diluted in blocking buffer and developed using the ECL<sup>TM</sup> Western Blotting Detection Reagents (Amersham Biosciences).

### *Immunoprecipitation*

Cellular lysates (0.5-1mg protein) were immunoprecipitated with 1 µg of the following antibodies: monoclonal anti-phosphotyrosine, polyclonal anti-IGF-IR $\beta$ , monoclonal anti-ER $\alpha$  or polyclonal anti-ER $\alpha$ . Incubations proceeded for 1h or overnight at 4°C in the presence of 30µL of 50% slurry protein-G Sepharose beads (Amersham Biosciences). The beads were washed three times in cold binding buffer and proteins were eluted and detected by western blot.

### *GST Pull-Down for Ras activity Assay.*

c-raf-RBD-GST was produced in *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (the expression plasmid was kindly provided by Néstor Gómez) and conjugated to glutathione-sepharose beads (Amersham Pharmacia Biotech). 25µL of 50% slurry suspension were incubated in binding buffer (20mM Tris pH 7.5, 1% NP-40, 200mM NaCl, 2.5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM NaF, 10µg/ml Aprotinine, 20µg/ml Leupeptine, 1mM Na<sub>2</sub>VO<sub>4</sub>) with 1mg of cellular lysate for 45 min at 4°C. After incubation, the beads were washed and coupled proteins were released by heating the samples to 95°C while they were resuspended in sample buffer. The samples were subjected to 10% SDS-PAGE electrophoresis, transferred to nitrocellulose membranes and detected by immunoblotting using monoclonal anti-Ras (61001; BD Biosciences; 1:1000).

### *Plasmids and Transfection*

Mammalian expression vectors encoding c-myc-ERK, YFP, RasWT-YFP, RasV12-YFP and Ras N17-YFP were gifts from Dr. Pablo Rodríguez-Viciano (Cancer Research Institute and Comprehensive Cancer Center, University of California). CGCs were co-

transfected at 5 DIV with 1 $\mu$ g c-myc-ERK and 5 $\mu$ g of each Ras-expressing vectors using Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 (Invitrogen Inc). Cells were incubated with Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 in DMEM without B27 during 4 hours and the medium was changed with original conditioned medium for 24 h. Cells were then treated with E2, IGF-I or BDNF at 8 DIV as indicated in figure legends and processed by immunocytochemistry.

#### *Immunocytochemistry*

CGCs cultures (7-8 DIV) were gently washed with ice-cold PBS and fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 1 hr at 4°C. After washing, cells were incubated in PBS - Glycine 0,1M during 10 min, washed with TBS-Tween 0.1% (TBS-T) and permeabilized with TBS-T + Triton X-100 0.1%. Cells were then blocked at 4°C for 1 hr in TBS-T containing 0,5% normal goat serum and then incubated overnight at 4°C with the primary antibodies against polyclonal c-myc (1:100), estrogen receptor ER- $\alpha$  (1:100) or MAP-2 (1:200) in TBS-T containing 0,5% goat serum. Samples were treated with RNase A (1mg/ml) before incubation with the primary antibodies when PI or Hoescht was used to counterstain the cells. Cells were then washed with TBS-T and then incubated during 1 hr at room temperature with the appropriate secondary antibody conjugated with fluorescein or rhodamine (1:500) in blocking buffer. Cells were then stained with propidium iodide (10 $\mu$ M) or Hoechst 33258 (1 $\mu$ g/mL) during 2 min and observed under epifluorescence or confocal microscopy.

#### *RNA isolation and RT-PCR amplification*

RNA was extracted from 6 or 8 DIV CGCs cultures or adult rat brain with Trizol (Invitrogen) as indicated by the manufacturer. First-strand cDNA synthesis was obtained using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) by using oligo(dT) and PCR amplification was realized with Taq DNA polymerase recombinant as indicated in manufacturer's protocol (Invitrogen). The PCR reaction conditions consisted of 1 cycle of 95°C for 5 min; 35 cycles of: 94°C for 30s, 60°C for 30s, 72°C for 45s followed by 1 cycle of 72°C 5 min for ER $\alpha$  amplification and 1 cycle of 94°C for 2 min; 35 cycles of: 94°C for 30s, 60°C for 30s, 64°C for 1min followed by 1 cycle of 72°C 5 min for 18S rRNA amplification. The final volume of each reaction was 50 $\mu$ l and contained 1 $\mu$ M of each primer and 2 unit of Taq DNA polymerase. Standard buffer and Mg<sup>2+</sup> concentrations recommended by the manufacturer were used. Primers used were:

ER $\alpha$  (accession Y00102: 5'<sub>62</sub>TTCCGTCTTACTGTCTCAGC<sub>81</sub>;

## RESULTADOS

5'<sub>1460</sub>CCTGTCCAAGAGCAAGTTAG<sub>1441</sub>) and for 18S rRNA (accession V01270: 5'<sub>1029</sub>TCAAGAACGAAAGTCGGAGG<sub>1048</sub>; 5'<sub>1517</sub>GGACATCTAAGGGCATCACA<sub>1498</sub>). Following amplification, 2.5 $\mu$ L 5X DNA loading buffer was added to 10 $\mu$ L of each sample and the resulting mixture was analyzed by fractionation on 1% agarose gels stained with ethidium bromide in 1X TAE buffer. Gels were analyzed using a Gene Genius Bio Imagin System (Syngene). All digital images analyzed were within the dynamic range of the imager and there were no saturated pixels. Following analysis, images were transferred into PhotoShop (Adobe) and digitally inverted for generation of images.

### *Statistical analysis*

Statistical significance was determined by one-way analysis of variance followed by Tukey's multiple comparison test. A value of  $P < 0.05$  was accepted as denoting statistical significance.

### *Online supplemental material*

Fig. S1 shows the weak activation of Akt by estradiol in comparison with the neuroprotective factor IGF-I. Fig. S2 shows the time-course of ERK activation by estradiol. Fig S3 shows Nuclear translocation of ERK in CGCs transfected with Ras V12 whereas no translocation is observed by IGF-I in RasN17 transfected CGCs.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Altman, J. 1972. Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. 3. Maturation of the components of the granular layer. *J. Comp Neurol.* 145:465-513.
2. Behl, C., J.B.Davis, R.Lesley, and D.Schubert. 1994. Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell* 77:817-827.
3. Behl, C., M.Widmann, T.Trapp, and F.Holsboer. 1995. 17-beta estradiol protects neurons from oxidative stress-induced cell death in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 216:473-482.
4. Belcher, S.M. 1999. Regulated expression of estrogen receptor alpha and beta mRNA in granule cells during development of the rat cerebellum. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 115:57-69.
5. Belcher, S.M., H.H.Le, L.Spurling, and J.K.Wong. 2005. Rapid estrogenic regulation of extracellular signal- regulated kinase 1/2 signaling in cerebellar granule cells involves a G protein- and protein kinase A-dependent mechanism and intracellular activation of protein phosphatase 2A. *Endocrinology* 146:5397-5406.
6. Bi, R., G.Broutman, M.R.Foy, R.F.Thompson, and M.Baudry. 2000. The tyrosine kinase and mitogen-activated protein kinase pathways mediate multiple effects of estrogen in hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97:3602-3607.

## RESULTADOS

7. Bi, R., M.R.Foy, R.M.Vouimba, R.F.Thompson, and M.Baudry. 2001. Cyclic changes in estradiol regulate synaptic plasticity through the MAP kinase pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98:13391-13395.
8. Bjornstrom, L. and M.Sjoberg. 2002. Signal transducers and activators of transcription as downstream targets of nongenomic estrogen receptor actions. *Mol. Endocrinol.* 16:2202-2214.
9. Bouschet, T., V.Perez, C.Fernandez, J.Bockaert, A.Eychene, and L.Journot. 2003. Stimulation of the ERK pathway by GTP-loaded Rap1 requires the concomitant activation of Ras, protein kinase C, and protein kinase A in neuronal cells. *J. Biol. Chem.* 278:4778-4785.
10. Burgoyne, R.D., M.E.Graham, and M.Cambray-Deakin. 1993. Neurotrophic effects of NMDA receptor activation on developing cerebellar granule cells. *J. Neurocytol.* 22:689-695.
11. Cardona-Gomez, G.P., P.Mendez, L.L.DonCarlos, I.Azcoitia, and L.M.Garcia-Segura. 2001. Interactions of estrogens and insulin-like growth factor-I in the brain: implications for neuroprotection. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 37:320-334.
12. Cardona-Gomez, G.P., P.Mendez, L.L.DonCarlos, I.Azcoitia, and L.M.Garcia-Segura. 2002. Interactions of estrogen and insulin-like growth factor-I in the brain: molecular mechanisms and functional implications. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 83:211-217.
13. Cordey, M. and C.J.Pike. 2005. Neuroprotective properties of selective estrogen receptor agonists in cultured neurons. *Brain Res.* 1045:217-223.

14. D'Mello, S.R., K.Borodezt, and S.P.Soltoff. 1997. Insulin-like growth factor and potassium depolarization maintain neuronal survival by distinct pathways: possible involvement of PI 3-kinase in IGF-1 signaling. *J. Neurosci.* 17:1548-1560.
15. Dominguez, R., C.Jalali, and L.S.de. 2004. Morphological effects of estrogen on cholinergic neurons in vitro involves activation of extracellular signal-regulated kinases. *J. Neurosci.* 24:982-990.
16. Dos Santos, E.G., M.N.Dieudonne, R.Pecquery, M.Le, V, Y.Giudicelli, and D.Lacasa. 2002. Rapid nongenomic E2 effects on p42/p44 MAPK, activator protein-1, and cAMP response element binding protein in rat white adipocytes. *Endocrinology* 143:930-940.
17. Duan, R., W.Xie, R.C.Burghardt, and S.Safe. 2001. Estrogen receptor-mediated activation of the serum response element in MCF-7 cells through MAPK-dependent phosphorylation of Elk-1. *J. Biol. Chem.* 276:11590-11598.
18. Dubal, D.B., M.L.Kashon, L.C.Pettigrew, J.M.Ren, S.P.Finklestein, S.W.Rau, and P.M.Wise. 1998. Estradiol protects against ischemic injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 18:1253-1258.
19. Falkenstein, E., H.C.Tillmann, M.Christ, M.Feuring, and M.Webling. 2000. Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol. Rev.* 52:513-556.
20. Filardo, E.J., J.A.Quinn, K.I.Bland, and A.R.Frackelton, Jr. 2000. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor

## RESULTADOS

- homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol. Endocrinol.* 14:1649-1660.
21. Finkbeiner, S., S.F.Tavazoie, A.Maloratsky, K.M.Jacobs, K.M.Harris, and M.E.Greenberg. 1997. CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses. *Neuron* 19:1031-1047.
  22. Fiorelli, G., F.Gori, U.Frediani, F.Franceschelli, A.Tanini, C.Tosti-Guerra, S.Benvenuti, L.Gennari, L.Becherini, and M.L.Brandi. 1996. Membrane binding sites and non-genomic effects of estrogen in cultured human pre-osteoclastic cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 59:233-240.
  23. Gallo, V., A.Kingsbury, R.Balazs, and O.S.Jorgensen. 1987. The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J. Neurosci.* 7:2203-2213.
  24. Goldin, M. and M.Segal. 2003. Protein kinase C and ERK involvement in dendritic spine plasticity in cultured rodent hippocampal neurons. *Eur. J. Neurosci.* 17:2529-2539.
  25. Gonzalez-Vidal, M.D., M.Cervera-Gaviria, R.Ruelas, A.Escobar, G.Morali, and M.Cervantes. 1998. Progesterone: protective effects on the cat hippocampal neuronal damage due to acute global cerebral ischemia. *Arch. Med. Res.* 29:117-124.
  26. Gould, E., C.S.Woolley, M.Frankfurt, and B.S.McEwen. 1990. Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. *J. Neurosci.* 10:1286-1291.



27. Gu, G., A.A.Rojo, M.C.Zee, J.Yu, and R.B.Simerly. 1996. Hormonal regulation of CREB phosphorylation in the anteroventral periventricular nucleus. *J. Neurosci.* 16:3035-3044.
28. Kahlert, S., S.Nuedling, M.van Eickels, H.Vetter, R.Meyer, and C.Grohe. 2000. Estrogen receptor alpha rapidly activates the IGF-1 receptor pathway. *J. Biol. Chem.* 275:18447-18453.
29. Kelly, M.J. and E.R.Levin. 2001. Rapid actions of plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol. Metab* 12:152-156.
30. Koh, I.Y., W.B.Lindquist, K.Zito, E.A.Nimchinsky, and K.Svoboda. 2002. An image analysis algorithm for dendritic spines. *Neural Comput.* 14:1283-1310.
31. Kumar, V., M.X.Zhang, M.W.Swank, J.Kunz, and G.Y.Wu. 2005. Regulation of dendritic morphogenesis by Ras-PI3K-Akt-mTOR and Ras-MAPK signaling pathways. *J. Neurosci.* 25:11288-11299.
32. Lee, S.J., C.R.Campomanes, P.T.Sikat, A.T.Greenfield, P.B.Allen, and B.S.McEwen. 2004. Estrogen induces phosphorylation of cyclic AMP response element binding (pCREB) in primary hippocampal cells in a time-dependent manner. *Neuroscience* 124:549-560.
33. Lev, S., H.Moreno, R.Martinez, P.Canoll, E.Peles, J.M.Musacchio, G.D.Plowman, B.Rudy, and J.Schlessinger. 1995. Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca(2+)-induced regulation of ion channel and MAP kinase functions. *Nature* 376:737-745.

## RESULTADOS

34. Mendez, P., I.Azcoitia, and L.M.Garcia-Segura. 2003. Estrogen receptor alpha forms estrogen-dependent multimolecular complexes with insulin-like growth factor receptor and phosphatidylinositol 3-kinase in the adult rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 112:170-176.
35. Migliaccio, A., G.Castoria, D.M.Di, F.A.de, A.Bilancio, M.Lombardi, M.V.Barone, D.Ametrano, M.S.Zannini, C.Abbondanza, and F.Auricchio. 2000. Steroid-induced androgen receptor-oestradiol receptor beta-*Src* complex triggers prostate cancer cell proliferation. *EMBO J.* 19:5406-5417.
36. Migliaccio, A., M.Di Domenico, G.Castoria, A.de Falco, P.Bontempo, E.Nola, and F.Auricchio. 1996. Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *EMBO J.* 15:1292-1300.
37. Migliaccio, A., D.Piccolo, G.Castoria, M.Di Domenico, A.Bilancio, M.Lombardi, W.Gong, M.Beato, and F.Auricchio. 1998. Activation of the *Src*/p21ras/*Erk* pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor. *EMBO J.* 17:2008-2018.
38. Mize, A.L., R.A.Shapiro, and D.M.Dorsa. 2003. Estrogen receptor-mediated neuroprotection from oxidative stress requires activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *Endocrinology* 144:306-312.
39. Murphy, D.D. and M.Segal. 1997. Morphological plasticity of dendritic spines in central neurons is mediated by activation of cAMP response element binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94:1482-1487.

40. Murphy, D.D. and M.Segal. 1996. Regulation of dendritic spine density in cultured rat hippocampal neurons by steroid hormones. *J. Neurosci.* 16:4059-4068.
41. Nethrapalli, I.S., M.Singh, X.Guan, Q.Guo, D.B.Lubahn, K.S.Korach, and C.D.Toran-Allerand. 2001. Estradiol (E2) elicits SRC phosphorylation in the mouse neocortex: the initial event in E2 activation of the MAPK cascade? *Endocrinology* 142:5145-5148.
42. Pawlak, J., M.Karolczak, A.Krust, P.Chambon, and C.Beyer. 2005. Estrogen receptor-alpha is associated with the plasma membrane of astrocytes and coupled to the MAP/Src-kinase pathway. *Glia* 50:270-275.
43. Pedram, A., M.Razandi, and E.R.Levin. 2006. Nature of Functional Estrogen Receptors at the Plasma Membrane. *Mol. Endocrinol.*
44. Razandi, M., A.Pedram, G.L.Greene, and E.R.Levin. 1999. Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells. *Mol. Endocrinol.* 13:307-319.
45. Razandi, M., A.Pedram, S.T.Park, and E.R.Levin. 2003. Proximal events in signaling by plasma membrane estrogen receptors. *J. Biol. Chem.* 278:2701-2712.
46. Reyna-Neyra, A., I.Camacho-Arroyo, P.Ferrera, and C.Arias. 2002. Estradiol and progesterone modify microtubule associated protein 2 content in the rat hippocampus. *Brain Res. Bull.* 58:607-612.

## RESULTADOS

47. Rodriguez, J., W.Jacques-Berg, and A.J.Patel. 1991. Differential regulation of cerebellar granule neurons by two types of quisqualate receptors. *Neuroreport* 2:517-520.
48. Ropero, A.B., B.Soria, and A.Nadal. 2002. A nonclassical estrogen membrane receptor triggers rapid differential actions in the endocrine pancreas. *Mol. Endocrinol.* 16:497-505.
49. Rusanescu, G., H.Qi, S.M.Thomas, J.S.Brugge, and S.Halegoua. 1995. Calcium influx induces neurite growth through a Src-Ras signaling cassette. *Neuron* 15:1415-1425.
50. Sakamoto, H., Y.Mezaki, H.Shikimi, K.Ukena, and K.Tsutsui. 2003. Dendritic growth and spine formation in response to estrogen in the developing Purkinje cell. *Endocrinology* 144:4466-4477.
51. Segal, M. and D.D.Murphy. 1998. CREB activation mediates plasticity in cultured hippocampal neurons. *Neural Plast.* 6:1-7.
52. Shah, R.D., K.L.Anderson, M.Rapoport, and A.Ferreira. 2003. Estrogen-induced changes in the microtubular system correlate with a decreased susceptibility of aging neurons to beta amyloid neurotoxicity. *Mol. Cell Neurosci.* 24:503-516.
53. Singer, C.A., X.A.Figueroa-Masot, R.H.Batchelor, and D.M.Dorsa. 1999. The mitogen-activated protein kinase pathway mediates estrogen neuroprotection after glutamate toxicity in primary cortical neurons. *J. Neurosci.* 19:2455-2463.

54. Singh, M., G.Setalo, Jr., X.Guan, D.E.Frail, and C.D.Toran-Allerand. 2000a. Estrogen-induced activation of the mitogen-activated protein kinase cascade in the cerebral cortex of estrogen receptor-alpha knock-out mice. *J. Neurosci.* 20:1694-1700.
55. Singh, M., G.Setalo, Jr., X.Guan, D.E.Frail, and C.D.Toran-Allerand. 2000b. Estrogen-induced activation of the mitogen-activated protein kinase cascade in the cerebral cortex of estrogen receptor-alpha knock-out mice. *J. Neurosci.* 20:1694-1700.
56. Singh, M., G.Setalo, Jr., X.Guan, M.Warren, and C.D.Toran-Allerand. 1999. Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase in cerebral cortical explants: convergence of estrogen and neurotrophin signaling pathways. *J. Neurosci.* 19:1179-1188.
57. Song, R.X., C.J.Barnes, Z.Zhang, Y.Bao, R.Kumar, and R.J.Santen. 2004. The role of Shc and insulin-like growth factor 1 receptor in mediating the translocation of estrogen receptor alpha to the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101:2076-2081.
58. Song, R.X., R.A.McPherson, L.Adam, Y.Bao, M.Shupnik, R.Kumar, and R.J.Santen. 2002. Linkage of rapid estrogen action to MAPK activation by ERalpha-Shc association and Shc pathway activation. *Mol. Endocrinol.* 16:116-127.
59. Stevis, P.E., D.C.Deecher, L.Suhadolnik, L.M.Mallis, and D.E.Frail. 1999. Differential effects of estradiol and estradiol-BSA conjugates. *Endocrinology* 140:5455-5458.

## RESULTADOS

60. Szego, E.M., K.Barabas, J.Balog, N.Szilagyi, K.S.Korach, G.Juhasz, and I.M.Abraham. 2006. Estrogen induces estrogen receptor alpha-dependent cAMP response element-binding protein phosphorylation via mitogen activated protein kinase pathway in basal forebrain cholinergic neurons in vivo. *J. Neurosci.* 26:4104-4110.
61. Toran-Allerand, C.D., X.Guan, N.J.MacLusky, T.L.Horvath, S.Diano, M.Singh, E.S.Connolly, Jr., I.S.Nethrapalli, and A.A.Tinnikov. 2002. ER-X: a novel, plasma membrane-associated, putative estrogen receptor that is regulated during development and after ischemic brain injury. *J. Neurosci.* 22:8391-8401.
62. Toran-Allerand, C.D., M.Singh, and G.Setalo, Jr. 1999. Novel mechanisms of estrogen action in the brain: new players in an old story. *Front Neuroendocrinol.* 20:97-121.
63. Vaillant, A.R., P.Zanassi, G.S.Walsh, A.Aumont, A.Alonso, and F.D.Miller. 2002. Signaling mechanisms underlying reversible, activity-dependent dendrite formation. *Neuron* 34:985-998.
64. Vongher, J.M. and C.A.Frye. 1999. Progesterone in conjunction with estradiol has neuroprotective effects in an animal model of neurodegeneration. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 64:777-785.
65. Wade, C.B. and D.M.Dorsa. 2003. Estrogen activation of cyclic adenosine 5'-monophosphate response element-mediated transcription requires the extracellularly regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway. *Endocrinology* 144:832-838.

66. Wade, C.B., S.Robinson, R.A.Shapiro, and D.M.Dorsa. 2001. Estrogen receptor (ER)alpha and ERbeta exhibit unique pharmacologic properties when coupled to activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *Endocrinology* 142:2336-2342.
67. Watson, C.S., C.H.Campbell, and B.Gametchu. 1999. Membrane oestrogen receptors on rat pituitary tumour cells: immuno-identification and responses to oestradiol and xenoestrogens. *Exp. Physiol* 84:1013-1022.
68. Watters, J.J., J.S.Campbell, M.J.Cunningham, E.G.Krebs, and D.M.Dorsa. 1997. Rapid membrane effects of steroids in neuroblastoma cells: effects of estrogen on mitogen activated protein kinase signalling cascade and c-fos immediate early gene transcription. *Endocrinology* 138:4030-4033.
69. Wong, C.W., C.McNally, E.Nickbarg, B.S.Komm, and B.J.Cheskis. 2002. Estrogen receptor-interacting protein that modulates its nongenomic activity-crosstalk with Src/Erk phosphorylation cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99:14783-14788.
70. Wong, J.K., H.H.Le, A.Zsarnovszky, and S.M.Belcher. 2003. Estrogens and ICI182,780 (Faslodex) modulate mitosis and cell death in immature cerebellar neurons via rapid activation of p44/p42 mitogen-activated protein kinase. *J. Neurosci.* 23:4984-4995.
71. Woolley, C.S. and B.S.McEwen. 1994. Estradiol regulates hippocampal dendritic spine density via an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism. *J. Neurosci.* 14:7680-7687.

## RESULTADOS

72. Wu, T.W., J.M.Wang, S.Chen, and R.D.Brinton. 2005. 17Beta-estradiol induced Ca<sup>2+</sup> influx via L-type calcium channels activates the Src/ERK/cyclic-AMP response element binding protein signal pathway and BCL-2 expression in rat hippocampal neurons: a potential initiation mechanism for estrogen-induced neuroprotection. *Neuroscience* 135:59-72.
73. Xifro, X., C.Malagelada, A.Minano, and J.Rodriguez-Alvarez. 2005. Brief exposure to NMDA produces long-term protection of cerebellar granule cells from apoptosis. *Eur. J. Neurosci.* 21:827-840.
74. Yokomaku, D., T.Numakawa, Y.Numakawa, S.Suzuki, T.Matsumoto, N.Adachi, C.Nishio, T.Taguchi, and H.Hatanaka. 2003. Estrogen enhances depolarization-induced glutamate release through activation of phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase in cultured hippocampal neurons. *Mol. Endocrinol.* 17:831-844.
75. Zhao, L., S.Chen, W.J.Ming, and R.D.Brinton. 2005. 17beta-estradiol induces Ca<sup>2+</sup> influx, dendritic and nuclear Ca<sup>2+</sup> rise and subsequent cyclic AMP response element-binding protein activation in hippocampal neurons: a potential initiation mechanism for estrogen neurotrophism. *Neuroscience* 132:299-311.
76. Zhou, Y., J.J.Watters, and D.M.Dorsa. 1996. Estrogen rapidly induces the phosphorylation of the cAMP response element binding protein in rat brain. *Endocrinology* 137:2163-2166.



## FIGURE LEGENDS

**Figure 1.- E2 activates ERK pathway via ER- $\alpha$  located in the plasma membrane.** **A** CGCs were treated with E2 at 10nM for the times indicated (see material and method for more details). The phosphorylation status of MAPK (thr 202 and tyr 204) from whole-cell lysates was assessed using an antibody recognising phosphorylated dual phosphorylated MAPK (top). Levels of total MAPK protein were determined on the same blot to control for loading variations (bottom). E2 activates ERK phosphorylation. **B** E2 effects occur via action at the plasma membrane, is mimicked by the estrogen receptor alpha agonist 4,4',4''-(4-Propyl-[1H]-pyrazole-1,3,5-triyl)trisphenol (PPT) but not by the biological inactive isomer 17- $\alpha$ -estradiol. The membrane impermeable estrogen analog E2-BSA mimicked the effects of E2 on ERK1/2 phosphorylation by immunoblot also showing the maximum activation between 1 and 2 hours. The effect of PPT also paralleled the effect of E2 but the structural isomer 17- $\alpha$ -E2 was not able to stimulate ERK1/2 at any time. The phosphorylation status of MAPK (thr 202 and tyr 204) from whole-cell lysates was assessed using an antibody recognising dual phosphorylated MAPK (top). Levels of total MAPK protein were determined on the same blot to control for loading variations (bottom). These results are representative of at least three independent experiments.

**Figure 2.- Estrogen receptor alpha is expressed in CGCs, is not modified by treatments and is located in the plasmatic membrane.** **A** mRNA of ER- $\alpha$  is synthesised in CGCs at 8DIV. PCR products were generated from 8DIV CGCs and cerebellum homogenate cDNA. Following reverse transcriptase and 35 cycles of PCR, resulting products were analyzed on a 1% agarose gels stained with ethidium bromide. Negative controls were treated identically to experimental samples except that reverse transcriptase was not included during cDNA synthesis (see Materials & Methods for more details). **B** Lysates of CGCs untreated and treated for 24hr with E2 10nM, PPT 10nM and E2-BSA 10nM in K5 were subjected to immunoblot for ER- $\alpha$ . Top panel does not show any differences between treatments in K5 suggesting that potassium deprivation or steroids treatment does not modifies the amount of ER- $\alpha$  protein. Whole lysate of MCF7 cells was used as a control for ER- $\alpha$  localization. Lower panel shows the immunoblotting for  $\beta$ -tubulin like a control for loading variations. **C** Nuclear (N), membrane (M) and cytosolic (C) fractions prepared from CGCs were subjected to immunoblotting for ER- $\alpha$ , ER- $\beta$ , the nuclear marker Histone H1, the membrane marker IGF-IR, and cytosolic marker GAPDH. A total lysate was used as a control of total amount of each protein and to compare with each fraction. ER- $\alpha$  is located mainly in

the plasmatic membrane of CGCs comparing to ER- $\beta$ , located only in the nucleus. Representative immunoblots of three independent experiments are shown. **D** CGCs were subjected to immunofluorescence using antibody to ER- $\alpha$  and the DNA dye propidium iodide (PI) and analyzed by confocal microscopy. Immunoreactivity to ER- $\alpha$  was observed apparently at plasmatic membrane.

**Figure 3.- ER- $\alpha$  is not able to interact and induce the IGF-I Receptor autophosphorylation and pathway.** CGCs were stimulated with 10nM E2 for 1 min to 2 hours. Phosphorylation of IGF-IR was detected by immunoprecipitation with a phosphotyrosine antibody, followed by immunoblotting for IGF-IR $\beta$  subunit as shows the first of four blots, and immunoprecipitation with an IGF-IR $\beta$  subunit antibody and subsequent immunoblot analysis with an antibody against phosphotyrosine residues, ER- $\alpha$  and IGF-IR $\beta$ . As an activation control, cells were treated with IGF-I 50ng/mL during 1min and immunoblots shows an earlier IGF-IR activation by the growth factor. Estrogen receptor does not interact with IGF-IR and is not able to activate pathways associated to IGF-I receptor. These results are representative of at least three independent experiments.

**Figure 4.- E2 elicits c-Src activation and the induction of MAPK pathway.** **A** The effect of E2 on the tyrosine 416 phosphorylation of c-Src was evaluated using immunoblot analysis. E2 treatment in CGCs elicits the activation of c-Src kinase with a maximum at 15 min and reducing this activation from 30 min (Top panel). The lowest blot represent reprobing of the upper blot for total c-Src protein to control for loading variations. **B** Immunoblot showing the effect of Src family tyrosine kinase inhibitor, PP2 (20 $\mu$ M), on E2-induced ERK1/2 phosphorylation. PP2 pretreatment resulted in the inhibition of E2-induced ERK 1/2 phosphorylation at 2h of treatment with PPT. **C** Membrane (M) and cytosolic (C) fractions prepared from CGCs were subjected to immunoblotting for c-Src, ER- $\alpha$ , the membrane marker IGF-IR, and cytosolic marker GAPDH. c-Src is located in membrane fraction close to ER- $\alpha$  suggesting that c-Src could be activated through direct interaction with membrane-associated ER- $\alpha$ . These results are representative of at least three independent experiments.

**Figure 5.- E2 activates monomeric G-protein p21ras via ER- $\alpha$ .** **A** CGCs were treated with E2-BSA 10nM for 1 min to 2 hours. Lysates were precipitated with c-Raf-RBD-Sepharose and subjected to immunoblot with an antibody against Ras protein, revealing the increase in Ras activity at 30 min maximum in response to E2-BSA. Lower panel shows an immunoblot against Ras protein from the same lysates before

precipitation as a control for loading variation. The bar graph show densitometric analysis of the immunoblots. **B** Activation of ERK is depending of Ras activity. Neurons were co-transfected either with c-myc-ERK plasmid and rasWT or c-myc-ERK and negative dominant RasN17 (as a control) at 5DIV and at 8DIV were untreated (control) or treated with E2 10nM, BDNF 50ng/mL or IGF-I 50ng/mL to see the translocation of ERK to the nucleus. Images monitoring the translocation in E2, BDNF and IGF-I cells treated were observed under epifluorescence in a Leica microscopy.

**Figure 6.- E2 induces CREB phosphorylation within CGCs in a time-dependent manner.** CGCs were treated at 8DIV with E2 10nM at 30 min to 2 hr. and subjected to immunoblot against activated CREB (phospho-Ser 133). Immunoblot analysis shows an activation curve with maximal activation at 1hr reducing this activation from 2hr (top panel). Lower panel shows an immunoblot against CREB protein as a control for loading variation. These results are representative of at least three independent experiments.

**Figure 7.- E2 promotes the maintenance of dendritic arborisation under proapoptotic conditions via ER- $\alpha$ /Src/p21ras/ERK pathway.** **A** Effect of E2 on the morphology of CGC induced to die by potassium deprivation. Cells were cultured for 8 DIV and then treated with E2 10nM for 24 hr. in the presence or absence of Src family tyrosine kinase inhibitor, PP2 (20 $\mu$ M). Cells were fixed, DNA dyed by Hoechst 33258 and observed under epifluorescence in a Leica microscopy. As shows the photomicrographies of phase contrast, CGCs in presence of E2 were able to maintain their dendritic integrity. When cells were pretreated with an inhibitor of Src, the integrity was lost. Moreover, the number of apoptotic nuclei (Hoechst staining) was reduced significantly comparing K5 cells with K5 + E2. These effect was reverted in presence of Src inhibitor, PP2. In every experiment, more than 500 cells were individually examined for each experimental condition. Condensed and / or fragmented nuclei were considered as apoptotic nuclei. Data are given as mean  $\pm$  SEM of values obtained in three or four independent experiments performed in duplicate. Results are expressed as the percentage of apoptotic nuclei vs. total nuclei. **B** PPT and E2-BSA maintain cytoskeleton structure and up-regulated expression of the presynaptic protein synaptotagmin 1. CGCs were cultured up to 7DIV when then were untreated o treated with PPT and E2-BSA (10nM) in apoptotic conditions (K5) for 24 hr. Cell lysates were subjected to immunoblot against MAP-2 and synaptotagmin 1 antibodies. The graph bars shows densitometric analysis of the immunoblots. **C** E2 induces MAP-2 maintenance in apoptotic condition (K5). A representatives photomicrographies of dual

## RESULTADOS

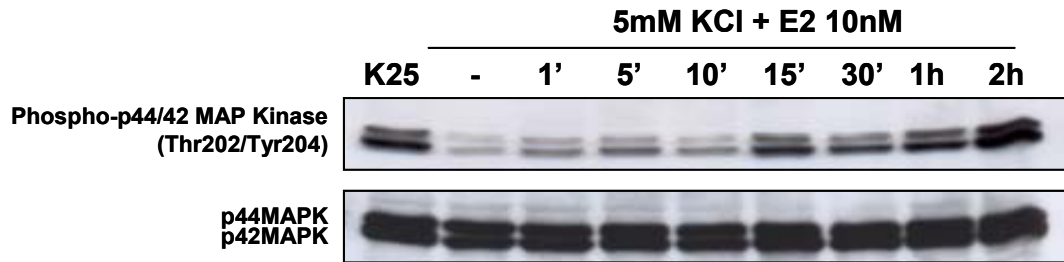
labeling of cytoskeleton, MAP-2 (green) and nuclei (blue) is shown (confocal microscopy, 40x). More of apoptotic neurons (condensed and / or fragmented nuclei) did not co-localize with MAP-2 labeling indicating that cells had lost their cytoskeleton. In presence of E2 there were a lot of cells that maintain the cytoskeleton comparing an equal number of cells in K5 condition.

**Supplemental Figure 1.- Weak Akt activation by E2 is not enough to protect CGCs from apoptotic death like IGF-I.** Qualitative comparison of E2-induced and growth factor-induced Akt stimulation by immunoblot. CGCs were treated with E2-BSA at 10nM or IGF-I at 50ng/mL for the times indicated. The phosphorylation status of Akt (ser 473) from whole-cell lysates was assessed using an antibody recognising phosphorylated Akt (top). Levels of total Akt protein were determined on the same blot to control for loading variations (bottom). Akt activation by IGF-I at 2hr (promotes CGCs survival) is higher than E2 at 6hr. These results are representative of at least three independent experiments.

**Supplemental Figure 2.- Activation of MAPK (ERK-1 y ERK-2) by E2 reach the higher point at 2hr and decrease to basal levels at 4hr.** CGC's were cultured in K25 in a DMEM medium containing B27 until 7 DIV when the medium was changed towards a B27-free K5-based medium. CGCs were treated with E2-BSA at 10nM at times indicated in the figure. The phosphorylation status of MAPK (thr 202 and tyr 204) from whole-cell lysates was assessed using an antibody recognising dual phosphorylated MAPK (top). Levels of total MAPK protein were determined on the same blot to control for loading variations (bottom). At 2hr E2-BSA elicits maximum activation of MAPK and this activation decrease to basal levels from 4hr. These results are representative of at least three independent experiments.

**Supplemental Figure 3.- Transfection and treatment controls using a constitutively active form (RasV12) or dominant negative (RasN17) of ras.** Neurons were co-transfected either with c-myc-ERK plasmid and rasV12 or RasN17 at 5DIV or RasWT and at 8DIV were untreated (control) or treated with IGF-I 50ng/mL to see the translocation of ERK to the nucleus. Images shows ERK translocation to the nucleus in untreated cells transfected with RasV12 and no ERK translocation in IGF-I treated cells transfected with RasN17. In RasWT transfected and treated with IGF-I cells ERK is translocated. Images were observed under epifluorescence in a Leica microscopy.

**A**



**B**

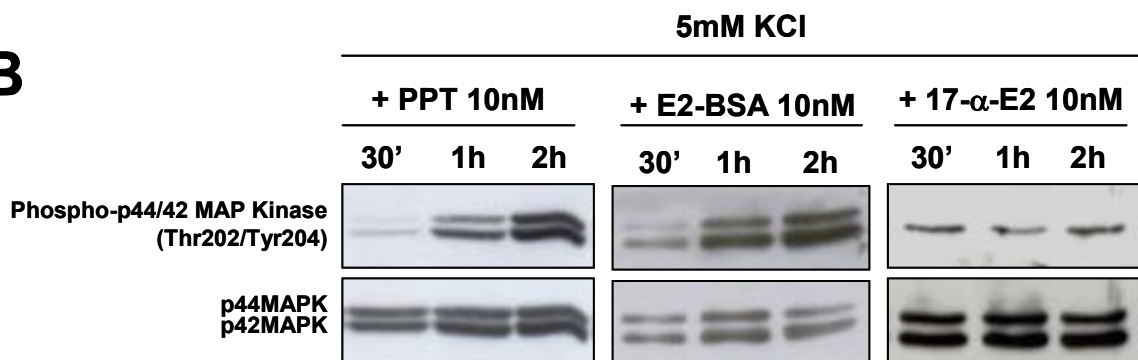


Figure 1 – Miñano et al.

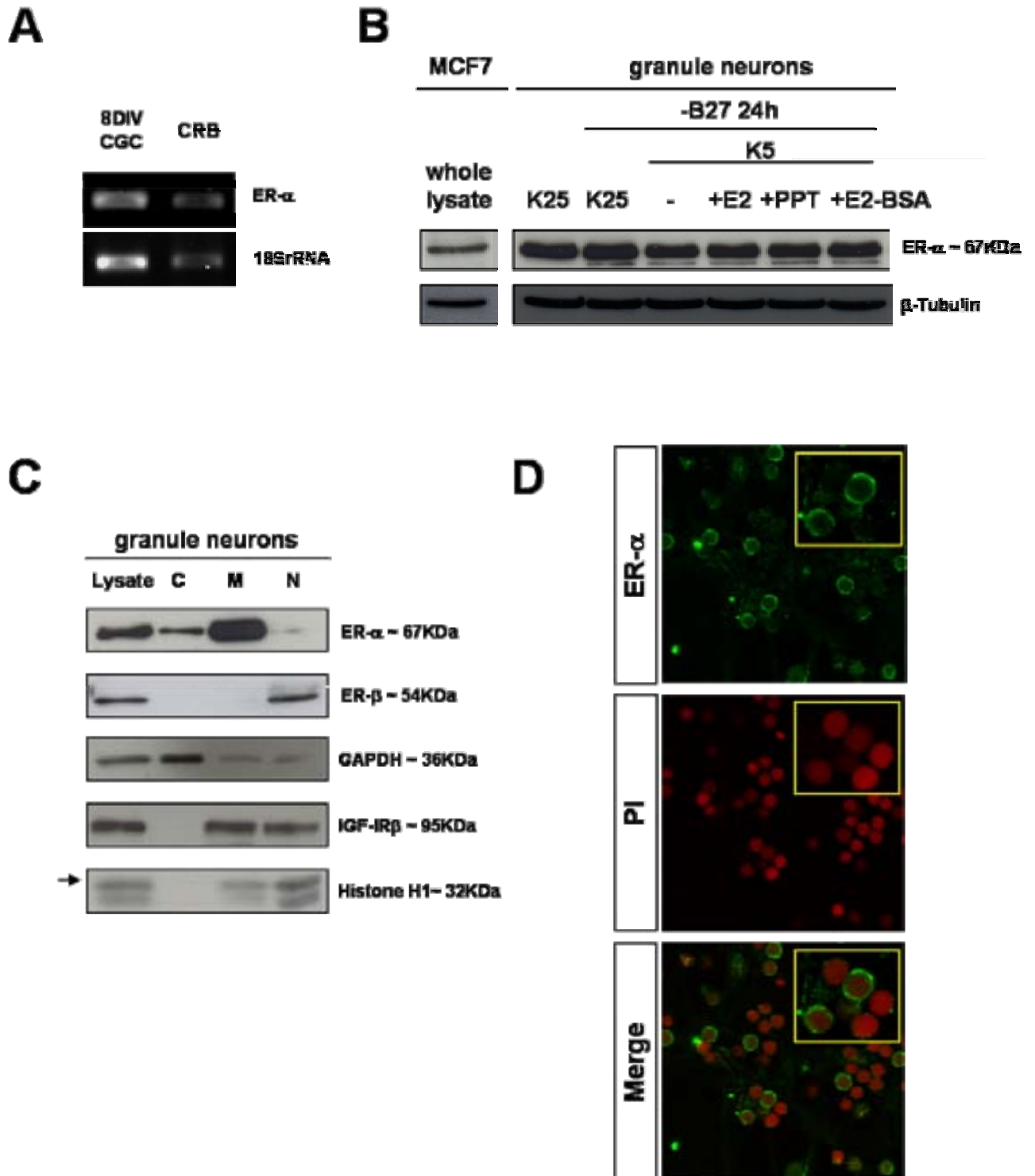


Figure 2 – Miñano et al.

RESULTADOS

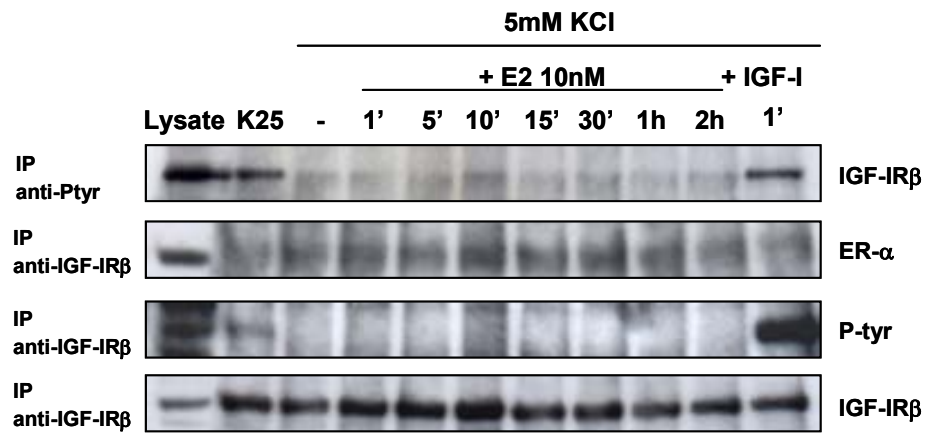


Figure 3 – Miñano et al.



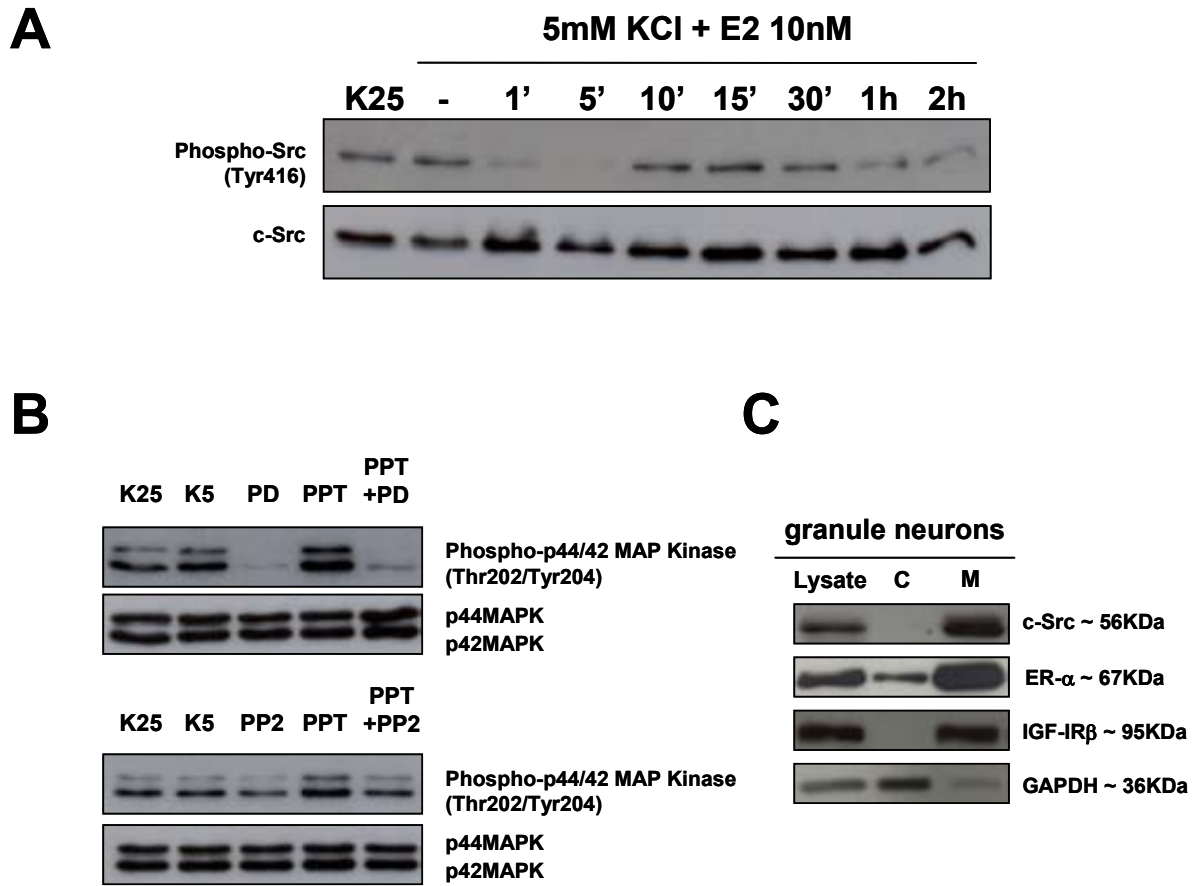
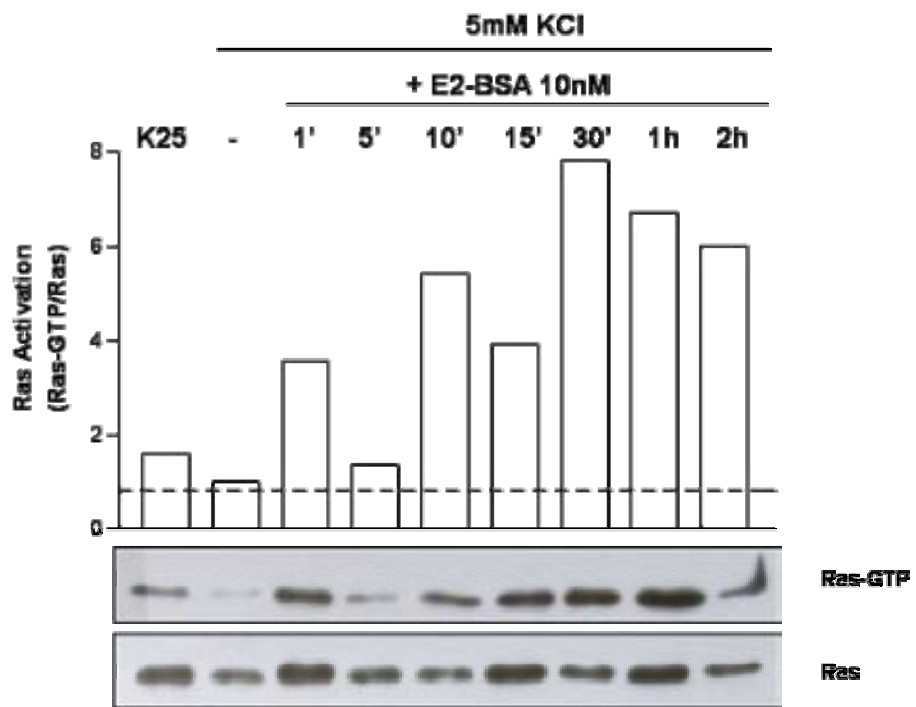


Figure 4 – Miñano et al.

**A**



**B**

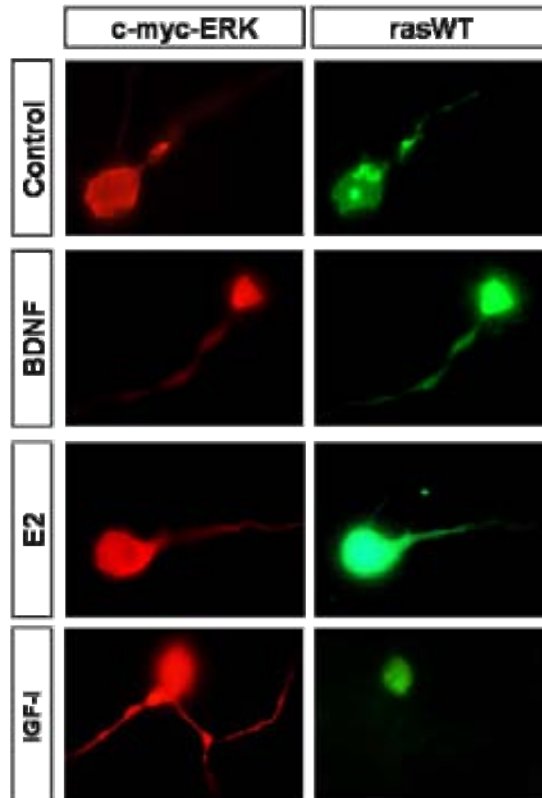


Figure 5 – Miñano et al.

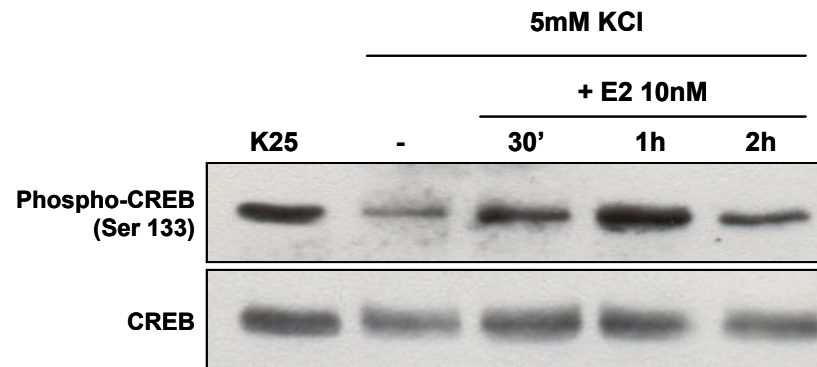


Figure 6 – Miñano et al.

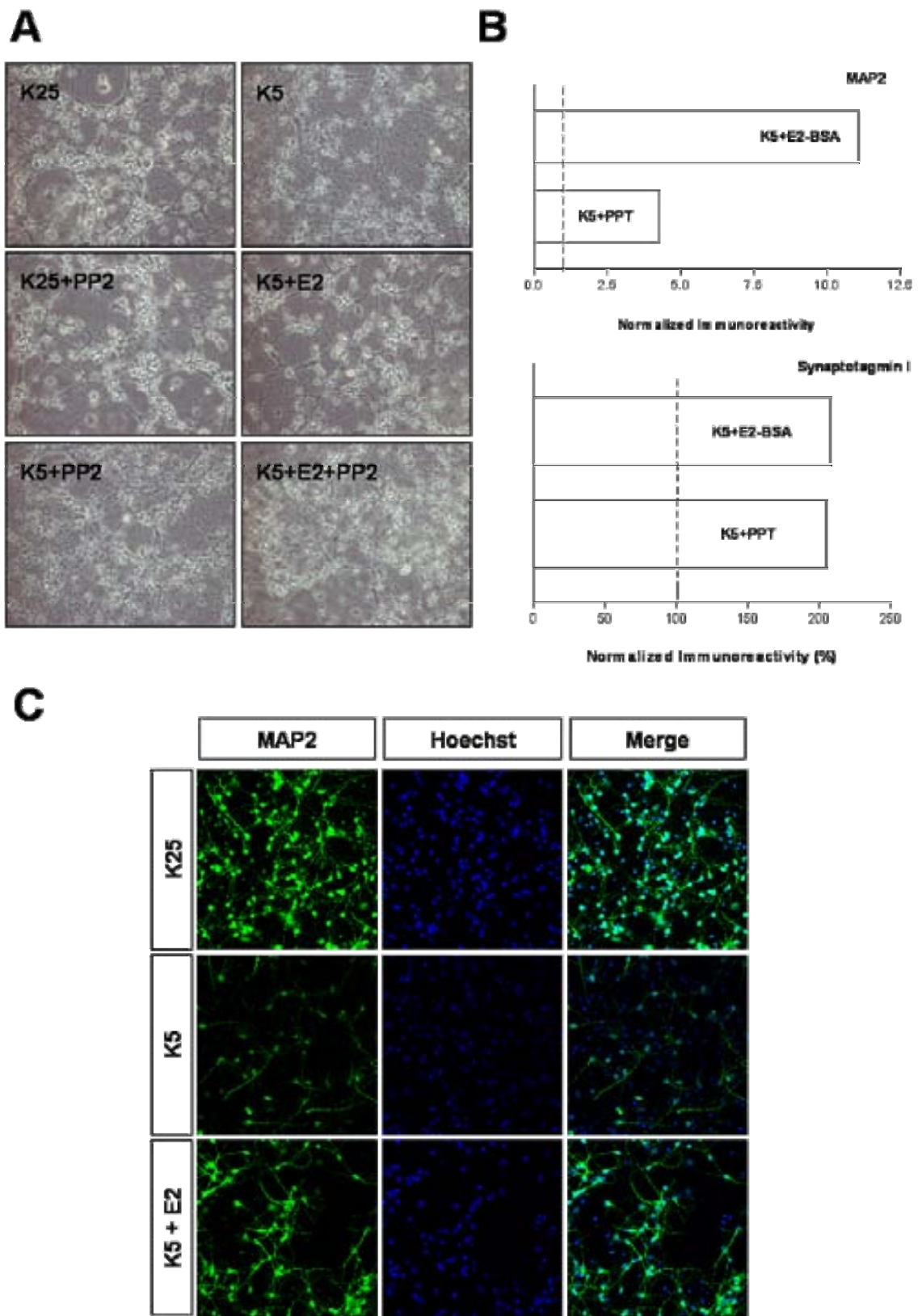
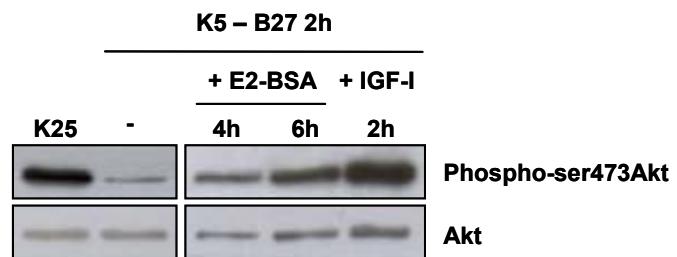
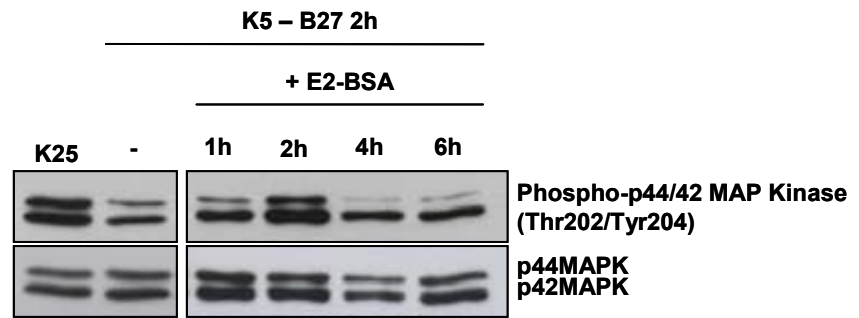


Fig 7 – Miñano et al.



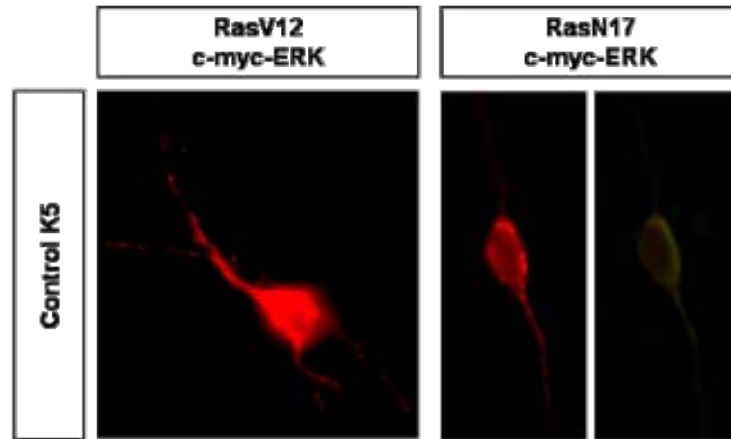
*Supplemental Figure 1 – Miñano et al.*

RESULTADOS

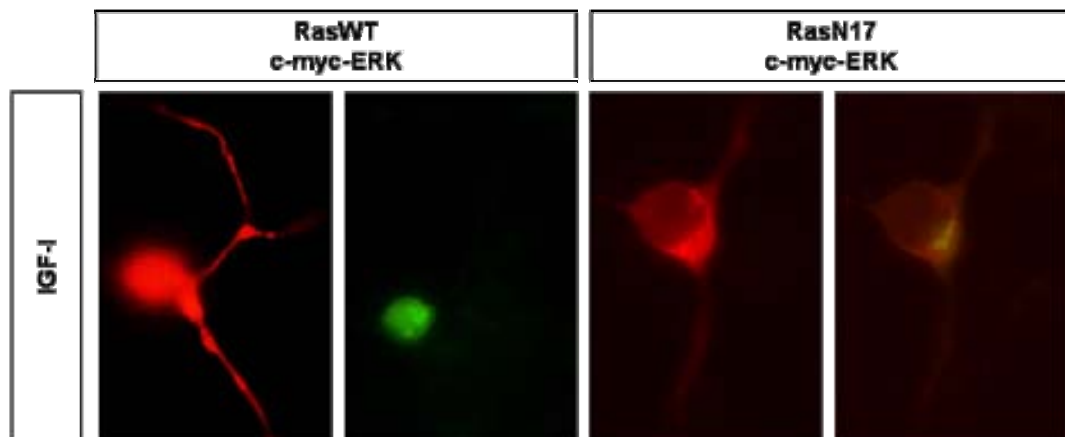


*Supplemental Figure 2 – Miñano et al.*

**A**



**B**



*Supplemental Figure 3 – Miñano et al.*

## V – DISCUSIÓN

*[...]*  
*Itaca te ha dado el bello viaje.*  
*Sin ella no habrías emprendido el camino.*  
*Nada más te puede ya ofrecer.*  
*Y si la encuentras pobre, no es que Itaca te haya engañado.*  
*Sabio como bien te has hecho, con tanta experiencia,*  
*ya habrás podido entender qué quieren decir las Itacas.*  
*[...]*



## V – DISCUSIÓN

### **Las neuronas granulares de cerebelo: un buen modelo para la caracterización de la muerte apoptótica por C2-ceramida.**

La apoptosis es un proceso fisiológico importante que tiene un papel clave durante el desarrollo del SNC manteniendo la homeóstasis celular (Oppenheim, 1991). El cerebelo es una de las regiones del cerebro en la cual este fenómeno en el desarrollo es especialmente dramático. El desarrollo de las neuronas granulares de cerebelo (CGCs) depende de una gran actividad básicamente postnatal (Burgoyne and Cambray-Deakin, 1988) y prácticamente la mitad de las CGCs se pierden durante el proceso apoptótico (Raff et al., 1993; Wood et al., 1993). Este fenómeno que es tan claro en el desarrollo de las neuronas granulares de cerebelo puede mimetizarse *in vitro*, a partir de un cultivo puro de CGCs. El cultivo primario de las CGCs es un modelo ampliamente utilizado para el estudio de la apoptosis (Sastry and Rao, 2000) ya que a partir de diferentes concentraciones de potasio se puede lograr que las neuronas sobrevivan o desencadenen el proceso apoptótico. Si las dejamos crecer en un medio con concentraciones fisiológicas de potasio (5mM KCl; K5) provocamos que éstas mueran por apoptosis (Gallo et al., 1987b). Sin embargo, estímulos externos que induzcan despolarización o directamente concentraciones despolarizantes de potasio (25mM KCl; K25) permiten a las CGCs sobrevivir y desarrollarse (Gallo et al., 1987b; Balazs et al., 1988). Esta influencia del potasio es similar cuando las neuronas han madurado ya que si posteriormente se deprivan del potasio, mueren por apoptosis (D'Mello et al., 1993). Otra forma de estimular las CGCs e impedir que mueran por apoptosis en situaciones de K5 es la presencia de factores tróficos en el medio, siendo uno de los mejor establecidos el IGF-I (D'Mello et al., 1997; D'Mello et al., 1993) y otros como BDNF (Kubo et al., 1995) o NMDA (Xifro et al., 2005).

Numerosos estudios han demostrado que esta muerte apoptótica por privación de potasio se lleva a cabo por la activación de las ejecutoras de la apoptosis, las caspasas, en concreto la activación de tanto la caspasa-9 como la caspasa-3 (Eldadah et al., 1997; D'Mello et al., 1998; Moran et al., 1999; Gerhardt et al., 2001), pero seguramente junto a otros mecanismos que también juegan un papel importante en esta muerte. Se ha observado que en la muerte apoptótica por privación de potasio se produce un incremento en las concentraciones intracelulares de ceramida (Toman et al., 2002) y del disialogangliosido GD3 (Melchiorri et al., 2002; Castiglione et al., 2004) haciendo muy interesante el estudio de cómo la ceramida podría estar

influyendo en la muerte apoptótica de las CGCs. Hoy día no está del todo claro cuales serían los mecanismos que relacionarían la síntesis de ceramida y la privación de señales excitadoras en CGCs, aunque estudios recientes apuntan a la implicación del receptor Fas (Castiglione et al., 2004). Desde que análogos de cadena corta de la ceramida, en particular C2-ceramida y C6-ceramida, pueden mimetizar algunos de los efectos de la ceramida endógena, se han utilizado para el estudio de la apoptosis mediada por ceramida en varios tipos celulares. Varios estudios han mostrado que la C2-ceramida induce apoptosis en CGCs (Manev and Cagnoli, 1997; Centeno et al., 1998; Monti et al., 2001; Vaudry et al., 2003) y este efecto parece depender del estado de madurez de las células (Taniwaki et al., 1999). Por estos motivos y por la amplitud de oportunidades de estudio que nos ofrece el modelo del cultivo primario de las CGCs nos interesamos en el laboratorio en el estudio de los mecanismos implicados en el programa de muerte apoptótica por ceramida en neuronas maduras.

### **C2-ceramida induce apoptosis en CGCs activando tanto caspasa-9 como caspasa-2; dos vías de muerte *a priori* paralelas.**

Primeramente, para acercarnos a la situación de desarrollo *in vivo*, establecimos cultivos de CGCs maduros creciéndolas en condiciones despolarizantes de potasio (K25) durante 7 – 8 días *in vitro* (DIV). Confirmamos que la muerte celular inducida por C2-ceramida es apoptótica porque observamos la aparición de fragmentos del DNA internucleosomal y la condensación y fragmentación de la cromatina, rasgos fenotípicos claros de la muerte apoptótica (Fraser et al., 1996). Es también en la apoptosis donde se pone en marcha el programa de proteasas que son las encargadas de iniciar y ejecutar la muerte, la activación de caspasas. Diversos trabajos afirman que en la apoptosis mediada por ceramida se activa la caspasa-3 (Keane et al., 1997; Movsesyan et al., 2002; Vaudry et al., 2003). El papel de las caspasas en la muerte apoptótica por ceramida sigue siendo hoy día bastante controvertido, ya que podemos encontrar trabajos en la literatura que afirman que en CGCs cultivadas en medios sin suero, la muerte apoptótica por C2-ceramida es independiente de la activación de caspasas (Monti et al., 2001). Por el contrario, Vaudry y colaboradores (2003) han descrito que la caspasa-3 está implicada en la muerte apoptótica por C2-ceramida de las CGCs que crecían en medio con suero. A partir de estos datos aparentemente contradictorios quisimos explorar el posible papel de las caspasas en la muerte apoptótica inducida por C2-ceramida en las CGCs. Nuestros resultados muestran claramente que la C2-ceramida induce la activación de la caspasa-3. Una activación que empieza 12hr después de la adición de C2-ceramida

y que es máxima entre las 24hr y las 36hr. Estos datos están de acuerdo y se complementan con los tiempos en los que observamos uno de los sustratos de la caspasa-3, utilizado como marcador de la actividad caspasa, la proteólisis de la proteína PARP. El ensayo de western blot muestra una proteólisis a partir de las 16hr, 4hr posterior a la activación de la caspasa-3. Nuestros datos están en la línea de los datos previos (Vaudry et al., 2003) sobre la activación de la caspasa-3 por C2-ceramida en las CGCs. Y esta activación de caspasa-3 está directamente relacionada con la muerte apoptótica por C2-ceramida, ya que inhibiendo la caspasa-3 somos capaces de inhibir la muerte apoptótica mediada por C2-ceramida.

La caspasa-3 es una de las caspasas llamadas ejecutoras que proteoliza diversos sustratos celulares encabezando la muerte apoptótica. La activación de la caspasa-3 viene dada por la activación de otras caspasas situadas corriente arriba (o caspasas iniciadoras) como la caspasa-2, -8 o -9. La activación de la caspasa-9, iniciadora de la llamada vía apoptótica intrínseca, requiere de la formación del complejo protéico llamado apoptosoma, formado por la caspasa-9, Apaf-1 (*apoptosis activating activator-1*), ATP y el citocromo c liberado de la mitocondria (Cecconi et al., 1998; Yoshida et al., 1998; Krajewski et al., 1999). La caspasa-2 y -8 son consideradas caspasas implicadas en la vía extrínseca de la apoptosis, que normalmente requiere la activación de receptores de membrana (Juo et al., 1998; Wagner et al., 2004). En nuestras condiciones experimentales observamos que la C2-ceramida activa la caspasa-2 y -9, pero no la -8. Hemos detectado que la activación de la caspasa-2 empieza 8hr después de la adición de C2-ceramida y permanece activa 48hr. Por otra parte, observamos una temprana activación de la caspasa-9. Fue una sorpresa inesperada el encontrar que la liberación del citocromo c de la mitocondria empezó a las 12hr, después de la activación de la caspasa-9. El hecho que la caspasa-9 estaba activa antes que la caspasa-2 no significa que esta caspasa sea activada por la -9 como estaba descrito para la línea celular SK-N-MC (Ito and Horigome, 1995), porque la inhibición de la caspasa-9 con LEDH-CHO no afectó a la activación de la caspasa-2 por C2-ceramida. También la inhibición de la caspasa-2 con VDVAD-CHO no modificó la activación de la caspasa-9 por el lípido, sugiriendo que la C2-ceramida activa las dos caspasas por diferentes vías. Caspasa-2 tiene un dominio CARD y podría interaccionar con diversas proteínas adaptadoras implicadas en vías asociadas a receptores de membrana de la superfamilia de TNF- $\alpha$  (Wagner et al., 2004). También se cree que su dimerización podría iniciar la activación inicial de la caspasa-2 (Butt et al., 1998) aunque los mecanismos que implican la activación de la caspasa-2 por ceramida siguen siendo una incógnita. Algunos estudios apoyan la tesis inicial de que

la caspasa-2 tendría un papel en la apoptosis a través de un mecanismo paralelo al que pueda jugar la caspasa-9, aunque pueden estar íntimamente relacionados (Troy et al., 2001). Por otra parte, estudios recientes en líneas celulares de células T muestran como en la apoptosis inducida por ceramida, la caspasa-2 juega un papel determinante en la regulación de la apoptosis mitocondrial (intrínseca), activada por la vía apoptótica extrínseca junto a la caspasa-8 (Lin et al., 2004), o por un mecanismo similar a caspasa-8 sin necesidad de activar a ésta y que implica la proteólisis de Bid (Bonzon et al., 2006), abriendo nuevas expectativas para la función de la caspasa-2 y nuevos mecanismos que en todo caso implican claramente a la mitocondria (Guo et al., 2002; Lin et al., 2005). Teniendo en cuenta estos datos novedosos, si comparamos nuestros resultados, quizás podríamos incidir más profundamente en la especulación sobre la implicación de la caspasa-2 en la muerte apoptótica por C2-ceramida en CGCs. Si relacionamos la secuencia de activación de las diferentes caspasas y eventos relacionados con ellas (liberación de citocromo C y proteólisis de PARP) podemos observar que en nuestro modelo hay una correlación entre la activación de la caspasa-2 (8hr) y los sucesos que ocurren *a posteriori*. Estos sucesos, la liberación del citocromo C (12hr), actividad caspasa-9 (12hr a 32hr), actividad caspasa-3 (12hr a 36hr) y proteólisis de PARP (16hr), podrían describirnos un mecanismo de muerte apoptótica por ceramida que implicaría la vía intrínseca, y que no sería incompatible con una activación pronta y paralela de la caspasa-9 por la ceramida a través de otros mecanismos, anterior en el tiempo, pero puede que inhibida por proteínas de la familia de las IAPs (Hengartner, 2000) como sucede en la muerte apoptótica por privación de potasio (Gerhardt et al., 2001) aportando un dato más a la relación entre el modelo de la privación de potasio y la muerte apoptótica inducida por ceramida. Se abren pues, a la vista de nuestros resultados, nuevas vías respecto a los mecanismos por los cuales la C2-ceramida induce apoptosis caspasa dependiente y que estos nos lleven a entender mejor cómo mueren las neuronas granulares de cerebelo a lo largo de su desarrollo.

### **La inhibición de Akt y la activación de las MAPKs están implicadas en la muerte apoptótica por C2-ceramida en las CGCs.**

Se ha descrito que la C2-ceramida es capaz de activar la caspasa-9 en neuronas corticales por una vía que media la inactivación de la actividad Akt y la desfosforilación de Bad (Zhou et al., 1998; Stoica et al., 2003). Bad desfosforilada podría translocar a la mitocondria donde promovería la liberación del citocromo c y la subsiguiente activación de la caspasa-9 (Datta et al., 1997). Nosotros observamos como, en

nuestras condiciones experimentales, la C2-ceramida inhibe la activación basal de Akt que está claramente implicada en la supervivencia de las CGCs, además de producirse una activación de la vía de las MAPKs. En nuestro modelo esta activación parece estar implicada en la muerte por C2-ceramida ya que el tratamiento con PD98059 (inhibidor de la vía ERK1/2) parece atenuar la muerte de las neuronas como ocurre en trabajos de Stoica y colaboradores (Stoica et al., 2005), no siendo suficiente para protegerlas de la muerte determinada por el ensayo del MTT, seguramente por la importancia de esta vía para otras funciones vitales para la célula. Posiblemente una inhibición puntual, sí que podría mediar un efecto más positivo que no la inhibición total de la vía a lo largo del tiempo (Subramaniam et al., 2005). Estos efectos podrían considerarse contradictorios con algunos datos existentes en las CGCs (Vaudry et al., 2003). Son muchos los estudios que han implicado a los miembros de la familia de las MAPKs como reguladores de la apoptosis dependiente de la mitocondria (Ghatan et al., 2000). Se han descrito numerosos trabajos donde se refleja que la ceramida puede modular la actividad de las MAPKs en diversos sistemas y modelos de trabajo (Blazquez et al., 2000; Kitatani et al., 2001; Shin et al., 2002; Vaudry et al., 2003; Willaime-Morawek et al., 2003a; Willaime et al., 2001; Stoica et al., 2005). Todos estos estudios también plantean efectos *a priori* contradictorios en cuanto al papel que pueda jugar ERK1/2 en la muerte por ceramida. Estos efectos tan diversos nos hacen pensar que en el modelo de las CGCs, donde los mecanismos de muerte apoptótica por ceramida todavía no son del todo claros, la vía ERK1/2 puede que esté implicada en la muerte de las neuronas.

**El E2 ejerce un efecto neuroprotector en las CGCs debido a sus propiedades como molécula antioxidante.**

Durante los últimos años, numerosos grupos de investigación han desempeñado un gran esfuerzo en el estudio del papel de las hormonas esteroideas en el contexto tanto de las enfermedades neurodegenerativas como de la recuperación frente a daños neurológicos traumáticos. Estas hormonas pueden desempeñar estas funciones implicando diferentes procesos como la supervivencia celular, respuestas regenerativas, crecimiento axonal, potenciación de la señal sináptica y neurogénesis. El E2, una de las hormonas esteroideas más estudiadas, se ha visto implicado en multitud de estos procesos, desde la neuroprotección frente a procesos apoptóticos pasando por la plasticidad y crecimiento neurítico, hasta ejercer un efecto antioxidante beneficioso para el organismo (García-Segura et al., 2001; Lee and McEwen, 2001). Todos estos procesos los ha llevado a cabo por mecanismos que todavía hoy día no

## DISCUSIÓN

están del todo claros. En este contexto de multifuncionalidad de los estrógenos, estuvimos interesados en estudiar los posibles efectos que esta hormona podría tener en nuestro modelo de trabajo, el cultivo de CGCs.

Existían datos previos que mostraban los efectos antioxidantes del estradiol en cultivos neuronales (Sawada et al., 1998; Moosmann and Behl, 1999; Dare et al., 2000; Behl, 2000). Nuestros resultados mostraron cómo el E2 reducía la muerte celular necrótica mediada por peróxido de hidrógeno en medios de cultivo con el suplemento B27 sin antioxidantes, además de observar una reducción en el número de células con la membrana plasmática comprometida (yoduro de propidio positivas). Sin embargo, estos efectos no fueron observados en presencia de medios de cultivo con el suplemento normal B27 con antioxidantes (vitamina E, vitamina E acetato, superóxido dismutasa, catalasa y glutatión; B27 supplement minus AO 50x, cat nº 10889, GIBCO, Invitrogen Inc.), confirmando que estos efectos neuroprotectores eran debidos a las propiedades antioxidantes del E2. Además, confirmamos estas propiedades obteniendo resultados similares en presencia del isómero estructural biológicamente inactivo, el 17- $\alpha$ -estradiol.

**Las CGCs presentan ambos receptores de E2, ER- $\alpha$  y ER- $\beta$ , necesarios para ejercer sus acciones neurotróficas o neuroprotectoras.**

Quisimos estudiar más en profundidad los efectos de los estrógenos en nuestro modelo, empezando por caracterizar los elementos clave en la maquinaria celular de neuroprotección independiente de los efectos antioxidantes. El cerebelo no se considera una de las regiones sensible a estrógenos más importante, aunque datos previos han mostrado la presencia de ambos receptores, ER- $\alpha$  y ER- $\beta$ , en las CGCs (Shughrue et al., 1997; Belcher, 1999; Price, Jr. and Handa, 2000) y que varían su expresión a lo largo del desarrollo postnatal de las neuronas granulares de cerebelo. Nuestros datos muestran claramente la presencia de ambos receptores en los cultivos de CGCs, demostrando su presencia tanto en la síntesis de mRNA, expresión de la proteína como su localización por inmunohistoquímica para llevar a cabo sus funciones. Este hecho nos hacía pensar que existía la maquinaria celular necesaria para que el E2 pueda ejercer sus eventuales efectos a través de los diversos mecanismos que implican la presencia de sus receptores, ya sean mecanismos de acción genómicos o no-genómicos. El E2 protege en diferentes sistemas de la muerte apoptótica, actuando a través de sus receptores, directamente en la actividad de las caspasas (Pelzer et al., 2000; Zhang et al., 2001) o a través de mecanismos que

modifican la expresión de genes anti-apoptóticos, ya sea regulando su expresión directamente (Pike, 1999; Singer et al., 1998; Dubal et al., 1999; Sawada et al., 2000) o a través de la activación de segundos mensajeros que interaccionen con las vías apoptóticas o den lugar a cambios en la expresión génica (Bi et al., 2000; Singer et al., 1999; Honda et al., 2000) como la vía PI3-K y la vía de las MAPKs.

A partir de estos datos, observamos que en el modelo de CGCs, el E2 no ejercía un efecto neuroprotector frente a la muerte apoptótica por C2-ceramida y por privación de potasio. De acuerdo con nuestros resultados, en la muerte apoptótica por C2-ceramida, no observamos diferencias en la viabilidad de los cultivos en presencia de E2, ni de análogos estables como el DES. Cuando realizamos los experimentos teniendo en cuenta las variables que podrían implicar la actuación por los diferentes mecanismos conocidos para el E2, observamos que ni a través de mecanismos genómicos, añadiendo el E2 24hr antes de inducir la muerte apoptótica, ni a través de mecanismos no-genómicos de respuesta rápida vía segundos mensajeros, añadiendo el E2 pocas horas antes del estímulo de muerte, era capaz de variar la viabilidad de las CGCs o reducir la aparición de núcleos fragmentados y/o condensados característicos de la muerte apoptótica. Utilizamos el modelo de la privación de potasio para estudiar si los mecanismos por los cuales el E2 podría ejercer alguna función neurotrófica o neuroprotectora podían depender del estímulo de muerte y del estado de desarrollo de los cultivos. Quizás podríamos aportar más datos que pudieran evidenciar que la muerte apoptótica por C2-ceramida estaría implicando unos mecanismos que diferirían de los presentes en la privación de potasio, y que siendo así el E2 podría incidir sobre dianas moleculares presentes en un tipo de muerte que no lo estarían en el otro. Primeramente, el cultivo de las CGCs en condiciones de K5 nos permitía estudiar si el E2 podría actuar como soporte neurotrófico y permitir a las neuronas desarrollarse y madurar *in vitro*. De acuerdo a los resultados presentados, el E2 no era capaz de ejercer de factor trófico clave para una evolución favorable del cultivo a lo largo de los diferentes días *in vitro*, ya que estas neuronas no eran capaces de sobrevivir como en presencia de condiciones K25, muriendo por apoptosis a lo largo de los días. Estaba claro pues, que el E2 no estaba ejerciendo un efecto como agente neurotrófico en nuestros cultivos de CGCs. Probablemente la necesidad de que las células tuvieran un estado de madurez determinado para que en nuestro sistema y frente a un estímulo de muerte apoptótico, el E2 pudiera ejercer un efecto neurotrófico pero si neuroprotector era necesario. Así pues, nos planteamos la posibilidad de inducir la muerte una vez el cultivo fuese maduro. Habíamos visto anteriormente que frente a la muerte por C2-ceramida no tenía efecto neuroprotector,

¿qué pasaría frente a la muerte por K5? Nuestros datos mostraron la misma línea que frente a la ceramida. El E2 no incrementó la viabilidad de las CGCs en la muerte por K5 y aunque sí se apreció una tendencia a la disminución de la aparición de núcleos de cromatina condensados y/o fragmentados, estas diferencias no resultaron significativas. Si bien es cierto, según el estado del cultivo, los efectos podían ser más importantes. Estos efectos probablemente sean debidos a que estas neuronas en cultivo son sensibles a variaciones en la densidad del mismo. En cultivos donde hay mayor densidad, las neuronas establecen mayor número de interconexiones que podría favorecer un incremento de señales positivas para su supervivencia. En estos casos, quizás el incremento de conexiones sumado a la presencia del E2 podría estar mimetizando alguna señal que el E2 por si solo no es capaz de activar y que sería necesaria para ejercer un efecto neuroprotector.

También para los estudios en condiciones de K5, realizamos los tratamientos en las diferentes condiciones, a fin de descartar posibles efectos mediante mecanismos distintos. Utilizamos los mismos tiempos que en presencia de ceramida y tanto en ese modelo como en K5 se utilizaron siempre medios de cultivo en ausencia de suero, potencial portador de estrógenos que pudieran interferir en los resultados. En todos los casos se utilizó un suplemento, el B-27, libre de estrógenos, en sustitución del suero. Los resultados no variaron en ninguno de los casos, indicando que el E2 no ejercía ningún efecto como neuroprotector.

Para poder determinar si realmente el E2 estaba fallando en la activación de alguna de las vías de señalización más importantes relacionadas con procesos de neuroprotección o aporte trófico en desarrollo, quisimos estudiar si el E2 podía activar estas vías en situaciones en las que las células vieran comprometido su futuro.

**El E2 falla como neuroprotector frente a la apoptosis en las CGCs: la ausencia de activación de Akt puede ser clave en la falta de neuroprotección.**

Una de las vías importantes cuando hablamos de neuroprotección es la vía PI3-K/Akt. En la supervivencia de las CGCs parece fundamental la activación de esta vía por factores extracelulares, en particular IGF-I se ha descrito como un promotor de la supervivencia de las CGCs a través de la activación de esta vía en células cultivadas en K5 (D'Mello et al., 1997). Muchos de los efectos neuroprotectores mediados por E2 implican la activación de esta vía por diversos mecanismos (Honda et al., 2000; Campbell et al., 2001; Harms et al., 2001; Haynes et al., 2003; Mendez et al., 2003). Cuando estudiamos si el E2 podía activar la vía PI3-K/Akt en una situación donde las



células estaban en presencia de estímulo despolarizante (K25) y sin B27, observamos que la vía mantenía una activación basal, no alterada por la presencia de E2. Teniendo en cuenta los datos comentados anteriormente respecto a la muerte por ceramida, donde ésta inhibía la actividad Akt, cuando tratamos con E2 células en cultivo y las ponemos en presencia de ceramida, ésta inhibe Akt jugando un papel clave en el destino de las células sin que el E2 pueda hacer nada al respecto. Esta misma situación ocurre cuando a las células las deprivamos de potasio y en ausencia de B27. En este caso, teniendo como ejemplo de mecanismo de neuroprotección al IGF-I en las CGCs (D'Mello et al., 1997; D'Mello et al., 1993), observamos que el E2 en condiciones de inducción de apoptosis, no era capaz de estimular Akt de la misma manera que sí lo hacía el IGF-I. Se observó una activación mucho más tardía en el tiempo, sobre las 6hr que en ningún caso era comparable a la obtenida por el IGF-I y que muy probablemente llegaba tarde al rescate, pudiendo no obstante formar parte de algún otro mecanismo puesto en marcha por el E2 que da lugar a otros efectos como los relacionados con la plasticidad sináptica (Lee et al., 2004). Según los datos existentes en la bibliografía al respecto de la importancia de la vía PI3-K/Akt en los procesos de neuroprotección en las CGCs, se demostró que esta vía era fundamental para la protección por IGF-I (D'Mello et al., 1997), como confirman también nuestros datos, aunque de alguna manera puedan participar otras vías (Subramaniam et al., 2005). En cambio, en el caso de la protección por K25, esta vía no es decisiva para sus efectos neuroprotectores (D'Mello et al., 1993; Chin and D'Mello, 2004). Así pues, nuestros datos apuntan a que la ausencia del efecto neuroprotector del E2 sea debido en gran parte a su imposibilidad de activar la vía PI3-K. Inicialmente podríamos pensar que esta activación debería producirse atendiendo a los numerosos trabajos que apuntan a la importancia que tiene ER- $\alpha$  en el mecanismo de activación de esta vía a través de su interacción con la subunidad reguladora de PI3-K, p85 y su relación con los mecanismos asociados a las neurotrofinas (Cardona-Gomez et al., 2001, Cardona-Gomez et al., 2002; Mendez et al., 2003; Mendez et al., 2005), como es la interacción con el receptor de IGF-I. En nuestro modelo tenemos ER- $\alpha$  y sabemos que los mecanismos asociados a receptores de neurotrofinas funcionan, como en el caso del IGF-I, además de ser neuroprotectores. Así pues, nos sorprende que en este modelo, a diferencia de otros descritos, ER- $\alpha$  no pueda activar la vía PI3-K y ejercer ni de agente neurotrófico (Duenas et al., 1996) ni como agente neuroprotector (Cardona-Gomez et al., 2001) como si ocurre en otros modelos.

**El receptor de estrógenos ER- $\alpha$  no interacciona con el receptor de IGF-I: posible causa de la ausencia de neuroprotección.**

Quisimos asegurarnos que realmente no se producían esas interacciones entre el receptor de estrógenos, ER- $\alpha$  y el receptor de IGF-I, IGF-IR, para poder explicar la ausencia de protección. Lo que uno se plantea rápidamente es si se dan las condiciones para que ambos se encuentren. Si no hay posible interacción física, posiblemente sea porque no están en el mismo sitio. Puesto que anteriormente ya demostramos la presencia del receptor en las CGCs, pasamos a caracterizar dónde se encontraba nuestro receptor ER- $\alpha$  y si podía interaccionar o no con IGF-IR. Nuestros datos aportaron más controversia a los resultados obtenidos, ya que el receptor ER- $\alpha$ , a diferencia de ER- $\beta$  localizado en el núcleo, estaba situado en la membrana plasmática como veremos ampliamente más adelante. Estos datos reveladores se sumaban a la controversia general en la literatura respecto a la localización de este receptor y sus posibles funciones y mecanismos asociados. Ya desde hace algún tiempo se vienen barajando la existencia de posibles formas del receptor situadas en la membrana (Fiorelli et al., 1996) que no sean las formas clásicas (Toran-Allerand et al., 2002) o sí lo sean y se muevan libremente entre la membrana, el citosol y el núcleo (Pedram et al., 2002; Razandi et al., 2003b). El IGF-IR también está presente en las CGCs, luego se están produciendo las circunstancias idóneas para que en presencia de ligando, ER- $\alpha$  interaccione con IGF-IR y desencadene la activación de sus vías asociadas dando lugar a fenómenos de neuroprotección. Avanzamos en el estudio de esa interacción pero los resultados fueron negativos, según nuestros datos el E2 no interaccionaba con IGF-IR ni era capaz de activar a este receptor como si ocurría en otros sistemas de estudio con estrógenos (Kahlert et al., 2000; Song et al., 2002; Song et al., 2004).

En este sentido, sumando los datos de la ausencia de interacción de ER- $\alpha$  con IGF-IR, la incapacidad del E2 de activar a este receptor y viendo que tampoco puede activar Akt, todos nuestros datos apuntan a que el E2, debido a todas estas causas, en las CGCs no puede ejercer de neuroprotector.

Pero, y las otras funciones atribuibles a los estrógenos tales como respuestas regenerativas frente al daño neuronal, el crecimiento axonal, potenciación de la señal sináptica y neurogénesis. Quizás sí es capaz de activar otras vías de señalización que están dando lugar a otros fenómenos que nos han pasado por alto.

**La activación de la vía clásica de las MAPKs por E2 implica un mecanismo diferente de acción para E2 en el modelo de las CGCs.**

Diversos trabajos evidencian que el E2 puede ejercer su efecto neuroprotector a través de mecanismos que implican la vía de las MAPKs, como frente a la muerte por glutamato en cultivos de neuronas corticales (Singer et al., 1999; Singer et al., 1996). Por otra parte se ha descrito que el E2 activa esta misma vía en CGCs (Wong et al., 2003; Belcher et al., 2005).

Como comentamos al inicio de la discusión, el modelo de las neuronas granulares de cerebelo se basa en la necesidad de éstas de recibir señales excitadoras que mimeticen lo que sucede en situaciones *in vivo*. Durante el desarrollo de estas neuronas la despolarización de éstas (K25) puede ser simulada por la presencia de NMDA (agonista glutamatérgico) que simularía el requerimiento de la invasión glutamatérgica por las fibras musgosas durante la fase crítica del desarrollo del cerebelo (Balazs et al., 1988). Esta estimulación en cultivo da como resultado la supervivencia y diferenciación de estas neuronas (Gallo et al., 1987b; Moran and Patel, 1989; Xifro et al., 2005). Por otra parte, en neuronas maduras, esta estimulación del receptor de glutamato es crítica para la supervivencia neuronal (Ankarcrona et al., 1995), muriendo éstas por apoptosis o por necrosis. Este modelo de trabajo nos permitía poder inducir mediante el estímulo glutamatérgico un tipo de muerte celular diferente al apoptótico por privación de potasio y poder determinar si en el modelo de las CGCs el E2 podría tener un efecto neuroprotector diferente. Una vez más nos encontramos que, independientemente de las condiciones utilizadas, el E2 no tenía ningún efecto neuroprotector frente a la muerte excitotóxica en las CGCs. Por el contrario, confirmamos los resultados previos (Singer et al., 1999; Wong et al., 2003; Belcher et al., 2005) mostrando neuroprotección en cultivos de neuronas corticales y activación de la vía de las MAPKs. Así, el E2 no protegía las CGCs de la muerte mediada por glutamato, pero era capaz de activar la vía de las MAPKs sugiriendo que esta vía quizás no participa directamente en la protección de las CGCs pero pone en marcha otros mecanismos implicados en procesos que puedan ocurrir paralelamente al proceso de muerte de las CGCs. En este sentido, quisimos comprobar los efectos de esta activación de ERK1/2 frente al estímulo de muerte por ceramida. Si recordamos, C2-ceramida activaba ERK1/2 y esa activación estaba relacionada con la muerte de las neuronas, ya que la presencia de PD 98059, inhibidor de la vía MAPKs, parecía atenuar esa muerte. Cuando tratamos las CGCs con E2 durante 2hr (cuando la activación de ERK1/2 es máxima) y posteriormente añadimos ceramida al cultivo,

## DISCUSIÓN

observamos cómo el E2 es capaz de inhibir la activación de ERK1/2 por C2-ceramida, aunque esa inhibición no es suficiente para proteger las neuronas de la muerte ya que como comentamos anteriormente no va acompañada de una activación de la vía PI3-K/Akt necesaria para ello como ocurre en otros sistemas (Subramaniam et al., 2005). Otros mecanismos se ponen en marcha en presencia del E2, falta por saber qué repercusión tiene esta activación de MAPK en el modelo de las CGCs.

Quisimos ahondar en el estudio de la activación de la vía de las MAPKs por el E2 para comprobar si podría estar ejerciendo alguna otra de las funciones atribuidas a esta vía comentadas anteriormente, como pudiera ser la regeneración frente al daño neuronal, el crecimiento axonal, potenciación de la señal sináptica y la neurogénesis. Utilizamos el modelo de la privación de potasio de las CGCs, ya que en estas condiciones de ausencia de factores tróficos, K25 y B-27, y a diferencia de lo que ocurría en presencia de IGF-I, el E2 activa la vía de las MAPKs siguiendo una cinética de activación muy similar a la producida por el IGF-I iniciándose a los 30 min y siendo máxima a las 2hr volviendo al nivel basal entre las 4hr y 6hr. ¿Podría el E2 poner en marcha mecanismos alternativos? ¿Estarán esos mecanismos relacionados con la necesidad de las CGCs de establecer contactos sinápticos y así asegurarse la supervivencia?

Como comentamos anteriormente, respecto al debate de la función del ER- $\alpha$  en los mecanismos de acción del E2 y su localización, nuestros resultados confirman la presencia de ER- $\alpha$ , como muestran tanto nuestros datos de inmunoblots de lisados de CGCs en cultivos, principalmente en la membrana plasmática (con una pequeña fracción en el citosol), mediante el inmunoblot de fracciones subcelulares e inmunoreactivo para anticuerpos anti-ER- $\alpha$  y su localización mediante inmunocitoquímica visualizada por microscopía confocal. Experimentos preliminares descartaron la presencia de ER- $\alpha$  en subdominios específicos de membrana llamados balsas lipídicas o *Lipid Rafts*, confirmándonos su integración a la membrana y descartando un posible tránsito citosol-membrana. En todo momento, detectamos un receptor cuyo peso molecular está acorde con el peso molecular de ER- $\alpha$  (aprox. 67KDa), descartando inicialmente posibles variantes de *splicing* (Figtree et al., 2003), aunque no descartamos que este receptor pueda tener algún tipo de modificación post-traducciona con ácidos grasos (Li et al., 2003) como posible explicación a su direccionalidad a las membranas. Nuestros resultados demuestran la activación de la vía ERK1/2 a través de ER- $\alpha$  mediante el tratamiento de las CGCs con un agonista selectivo para ER- $\alpha$ , el PPT (Cordey and Pike, 2005), descartando la acción de otros

receptores. La cinética de activación de ERK1/2 fue idéntica en presencia de PPT a la obtenida con E2. Además, con la finalidad de excluir posibles influencias del E2 mediante otros receptores, tanto en el citosol como en el núcleo, utilizamos el E2 conjugado a BSA e impermeable a la membrana, el E2-BSA, asumiendo que estos conjugados imitan al E2 (Stavis et al., 1999). La cinética de activación fue idéntica a la que presentaban las CGCs en presencia de E2. También tratamos a las CGCs con 17- $\alpha$ -estradiol, isómero biológicamente no funcional, para descartar otros efectos en la activación de ERK1/2 no asociados a la acción de ER- $\alpha$ . Éste isómero fue incapaz de estimular ERK1/2, confirmando todos estos datos que la activación de ERK1/2 por el E2 se producía vía ER- $\alpha$  y que estaba localizado en la membrana plasmática. Algunos datos previos apuntan a que la presencia de ER- $\alpha$  en la membrana puede permitir a éste la formación de complejos protéicos (Toran-Allerand et al., 1999), en los que la proteína kinasa Src podría estar implicada en la transducción de señales por E2 (Nethrapalli et al., 2001). Nosotros demostramos como E2 fosforila el residuo tirosina clave para la activación de Src (Y416), mostrando una cinética temporal anterior a la activación de ERK1/2, que se inicia a los 10min y es máxima los 15min. Esta activación media la de ERK1/2, ya que utilizando un inhibidor de la familia Src, el PP2, vemos una disminución en la activación de ERK1/2 por el E2. No podemos concluir con estos resultados si esta activación responde a una interacción entre ER- $\alpha$  y Src, aunque el análisis del fraccionamiento subcelular nos muestra como ambas proteínas se encuentran en la membrana, no descartando que este mecanismo pueda producirse (Migliaccio et al., 1998), aunque datos recientes apuntan a que ER- $\alpha$  pueda acoplarse a proteínas del tipo G $\alpha$ i (Dos Santos et al., 2002; Razandi et al., 2003b; Razandi et al., 2003a; Belcher et al., 2005), que serían las encargadas de inducir la activación de Src-ERK1/2. Estos efectos han sido observados en CGCs previamente por Belcher y cols. (Belcher et al., 2005), donde la inhibición de la proteína G $\alpha$ i con PTX, bloquea totalmente la activación de la vía Src-ERK1/2 por E2. Una proteína reguladora de estas vías de transducción y que es importante en el control de la activación de ERK1/2 es la proteína monomérica G p21ras, de la familia de proteínas ras (Nethrapalli et al., 2001). A ésta se unen diferentes efectores, activando la vía de las MAPKs. Nuestros resultados muestran que E2 activa p21ras, con un máximo de actividad a los 30 min, una activación que es posterior en el tiempo a la activación de Src y situada corriente abajo de ésta. Además, en nuestras condiciones experimentales esa actividad ras está asociada a la activación de ERK, ya que en células transfectadas con c-myc-ERK y ras, estimulando tanto con E2, IGF-I o BDNF, activan ERK haciendo que transloque al núcleo. Estos datos confirmarían que E2

activa ERK y que esa activación pasa por el control de ras. La activación y translocación al núcleo de ERK por E2 puede desencadenar la activación de una serie de factores de transcripción implicados en múltiples procesos. Entre ellos, destaca CREB (*cAMP response element-binding protein*) (Dos Santos et al., 2002; Wade and Dorsa, 2003; Lee et al., 2004), implicado en procesos de supervivencia, diferenciación y plasticidad sináptica (Finkbeiner et al., 1997), y donde específicamente es necesario en procesos que dan lugar a generación de nuevas espinas dendríticas, como ocurre en neuronas hipocampales (Murphy and Segal, 1996; Segal and Murphy, 1998).

**La activación de la vía Src/Ras/ERK/CREB estaría relacionada con fenómenos de plasticidad sináptica y el mantenimiento de conexiones entre neuronas de las CGCs aunque no sería suficiente para proteger las CGCs de la muerte apoptótica.**

La activación transcripcional de CREB pasa por la fosforilación de la serina 133 (S133) por la proteína kinasa A (Gonzalez and Montminy, 1989), Ca<sup>2+</sup>-Calmodulina Kinasa (CaMK) o MAPK (Beitner-Johnson and Millhorn, 1998; Shaywitz and Greenberg, 1999; Yokomaku et al., 2003; Boulware et al., 2005). Se ha visto que el E2 puede regular los niveles de pCREB durante procesos de sinaptogénesis (Murphy and Segal, 1997; Segal and Murphy, 1998), por ejemplo, el bloqueo de la activación de CREB causa una disminución de la formación de sinapsis por E2 *in vitro* (Murphy and Segal, 1997). En el estudio de la activación de CREB por E2 en nuestro modelo y condiciones experimentales, vimos que la activación de CREB en presencia de E2 ocurre a partir de los 30 min. y decrece pasada 1hr de activación. La activación de CREB aparece en paralelo a la activación de ERK1/2, pero no se mantiene máxima hasta las 2hr. como ERK1/2. Esta activación que implica la señalización vía ER- $\alpha$ /Src/ERK pero que no es sostenida en el tiempo sugiere que probablemente se activen otras vías de señalización vía ER- $\alpha$ , que impliquen mecanismos paralelos, pudiendo converger en ERK determinando el estado de fosforilación de CREB. Quizás estos mecanismos paralelos dependan vía ER- $\alpha$  de la activación directa de proteínas G (Belcher et al., 2005) o mediante la activación por parte de E2 vía ER- $\alpha$  de otros receptores acoplados a proteínas G (Boulware et al., 2005). Más estudios en esa dirección deberían realizarse para dilucidar cómo se llega a la activación de CREB por E2 en el modelo de las CGCs.

Cómo E2 podría contribuir a la plasticidad neuronal todavía hoy día sigue siendo una incógnita. A tenor de nuestros resultados y otros resultados previos, el E2 mediante estos mecanismos y otros paralelos podría estar induciendo cambios en las corrientes

de  $\text{Ca}^{2+}$  que impliquen la activación de factores de crecimiento como CREB o c-fos implicados en la plasticidad (Impey et al., 1999; Wu et al., 2005), afectando la expresión de proteínas estructurales y otras relacionadas con la plasticidad como MAP2, *synaptotagmin* y *spinophilin* (Yokomaku et al., 2003; Zhao et al., 2005). Nuestros resultados muestran como en ausencia de factores tróficos, el E2 contribuye al mantenimiento de la estructura dendrítica de las neuronas en cultivo mediante el mecanismo descrito anteriormente. Como se observa en las microfotografías, en presencia de E2, las neuronas mantienen mayores y mejores contactos con las neuronas vecinas, mientras que en presencia de E2 y del inhibidor de Src, PP2, el mejor estado del cultivo desaparece. Hemos comprobado que esos efectos del E2 se traducen en un mantenimiento de la estructura del citoesqueleto, mostramos como el E2 impide la desestructuración del esqueleto de la proteína estructural MAP2. Uno de los rasgos característicos y tempranos de la degeneración neuronal en cultivo es la pérdida de la morfología neurítica (Nuydens et al., 2000), relacionada con la degradación de proteínas estructurales de la familia MAP (Reyna-Neyra et al., 2002). Las neuronas con el núcleo condensado y/o fragmentado pierden el citoesqueleto. En presencia de E2 observamos un mayor número de células que mantienen su esqueleto respecto a las neuronas en K5, aunque no es suficiente para protegerlas de la muerte por apoptosis más allá de las 24h. Además del mantenimiento de la integridad dendrítica, nuestros resultados apuntan a un leve incremento en la síntesis de sinaptotagmina I, proteína implicada en la liberación vesicular presente en las terminales sinápticas, asociando un incremento de su expresión con un incremento de conexiones sinápticas. No obstante, más experimentos en esta dirección deben ser realizados, incluyendo alguna otra proteína implicada en estos procesos de plasticidad, para poder determinar si los efectos del E2 en las CGCs se limita tan solo a la puesta en marcha de un mecanismo para iniciar un intento desesperado por contactar con las neuronas vecinas y lograr sobrevivir, sin saber que ya está condenada, retrasando su muerte.

**VI – CONCLUSIONES**



## VI – CONCLUSIONES

- 1.- La presencia de C2-ceramida induce apoptosis en CGCs activando tanto caspasa-9 como caspasa-2; dos vías de muerte *a priori* paralelas.
- 2.- La inhibición de Akt y la activación de las MAPKs están implicadas en la muerte apoptótica por C2-ceramida en las CGCs.
- 3.- Las CGCs presentan ambos receptores de estrógenos, ER- $\alpha$  y ER- $\beta$ , necesarios para ejercer sus acciones neurotróficas o neuroprotectoras.
- 4.- ER- $\alpha$  está localizado en la membrana plasmática de las CGCs y media la activación de ERK1/2 por 17- $\beta$ -estradiol.
- 5.- El 17- $\beta$ -estradiol ejerce un efecto neuroprotector en las CGCs debido a sus propiedades como molécula antioxidante.
- 6.- El 17- $\beta$ -estradiol no ejerce un efecto neuroprotector frente a la apoptosis en las CGCs: la ausencia de activación de Akt puede ser clave en la falta de neuroprotección.
- 7.- El receptor de estrógenos ER- $\alpha$  no interacciona con el receptor de IGF-I: posible causa de la ausencia de activación de Akt y de la neuroprotección.
- 8.- La activación de la vía clásica de las MAPKs por 17- $\beta$ -estradiol implica un mecanismo de acción independiente de IGF-IR en el modelo de las CGCs.
- 9.- La activación de la vía Src/Ras/ERK/CREB estaría relacionada con fenómenos de plasticidad sináptica y el mantenimiento de conexiones entre neuronas de las CGCs aunque no sería suficiente para proteger las CGCs de la muerte apoptótica.

**VII – BIBLIOGRAFÍA**

**VII – BIBLIOGRAFIA**

Adams JM, Cory S (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281:1322-1326.

Alavez S, Pedroza D, Moran J (2003) Mechanisms of cell death by deprivation of depolarizing conditions during cerebellar granule neurons maturation. *Neurochem Int* 43:581-590.

Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT, Saltiel AR (1995) PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 270:27489-27494.

Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, Cohen P (1997) Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol* 7:261-269.

Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J (1996) Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87:171.

Ambrosini G, Adida C, Altieri DC (1997) A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 3:917-921.

Andersson IK, Edwall D, Norstedt G, Rozell B, Skottner A, Hansson HA (1988) Differing expression of insulin-like growth factor I in the developing and in the adult rat cerebellum. *Acta Physiol Scand* 132:167-173.

Ankarcrona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, Nicotera P (1995) Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 15:961-973.

Arimatsu Y, Hatanaka H (1986) Estrogen treatment enhances survival of cultured fetal rat amygdala neurons in a defined medium. *Brain Res* 391:151-159.

Armstrong RC, Aja TJ, Hoang KD, Gaur S, Bai X, Alnemri ES, Litwack G, Karanewsky DS, Fritz LC, Tomaselli KJ (1997) Activation of the CED3/ICE-related protease CPP32 in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis but not necrosis. *J Neurosci* 17:553-562.

## BIBLIOGRAFÍA

Aronica SM, Kraus WL, Katzenellenbogen BS (1994) Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:8517-8521.

Atwal JK, Massie B, Miller FD, Kaplan DR (2000) The TrkB-Shc site signals neuronal survival and local axon growth via MEK and P13-kinase. *Neuron* 27:265-277.

Balazs R, Jorgensen OS, Hack N (1988) N-methyl-D-aspartate promotes the survival of cerebellar granule cells in culture. *Neuroscience* 27:437-451.

Behl C (2000) Vitamin E protects neurons against oxidative cell death in vitro more effectively than 17-beta estradiol and induces the activity of the transcription factor NF-kappaB. *J Neural Transm* 107:393-407.

Behl C, Skutella T, Lezoualc'h F, Post A, Widmann M, Newton CJ, Holsboer F (1997) Neuroprotection against oxidative stress by estrogens: structure-activity relationship. *Mol Pharmacol* 51:535-541.

Beitner-Johnson D, Millhorn DE (1998) Hypoxia induces phosphorylation of the cyclic AMP response element-binding protein by a novel signaling mechanism. *J Biol Chem* 273:19834-19839.

Belcher SM (1999) Regulated expression of estrogen receptor alpha and beta mRNA in granule cells during development of the rat cerebellum. *Brain Res Dev Brain Res* 115:57-69.

Belcher SM, Le HH, Spurling L, Wong JK (2005) Rapid estrogenic regulation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling in cerebellar granule cells involves a G protein- and protein kinase A-dependent mechanism and intracellular activation of protein phosphatase 2A. *Endocrinology* 146:5397-5406.

Belcher SM, Zsarnovszky A (2001) Estrogenic actions in the brain: estrogen, phytoestrogens, and rapid intracellular signaling mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther* 299:408-414.

Benchoua A, Couriaud C, Guegan C, Tartier L, Couvert P, Friocourt G, Chelly J, Menissier-de Murcia J, Onteniente B (2002) Active caspase-8 translocates into the nucleus of apoptotic cells to inactivate poly(ADP-ribose) polymerase-2. *J Biol Chem* 277:34217-34222.

Bi R, Broutman G, Foy MR, Thompson RF, Baudry M (2000) The tyrosine kinase and mitogen-activated protein kinase pathways mediate multiple effects of estrogen in hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3602-3607.

Bishop J, Simpkins JW (1994) Estradiol treatment increases viability of glioma and neuroblastoma cells in vitro. *Mol Cell Neurosci* 5:303-308.

Blatt NB, Glick GD (2001) Signaling pathways and effector mechanisms pre-programmed cell death. *Bioorg Med Chem* 9:1371-1384.

Blazquez C, Galve-Roperh I, Guzman M (2000) De novo-synthesized ceramide signals apoptosis in astrocytes via extracellular signal-regulated kinase. *FASEB J* 14:2315-2322.

Boka G, Anglade P, Wallach D, Javoy-Agid F, Agid Y, Hirsch EC (1994) Immunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 172:151-154.

Bondy CA (1991) Transient IGF-I gene expression during the maturation of functionally related central projection neurons. *J Neurosci* 11:3442-3455.

Bonnefont AB, Munoz FJ, Inestrosa NC (1998) Estrogen protects neuronal cells from the cytotoxicity induced by acetylcholinesterase-amyloid complexes. *FEBS Lett* 441:220-224.

Bonni A, Brunet A, West AE, Datta SR, Takasu MA, Greenberg ME (1999) Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* 286:1358-1362.

Bonzon C, Bouchier-Hayes L, Pagliari LJ, Green DR, Newmeyer DD (2006) Caspase-2-induced Apoptosis Requires Bid Cleavage: A Physiological Role for Bid in Heat Shock-induced Death. *Mol Biol Cell* 17:2150-2157.

Borsello T, Clarke PG, Hirt L, Vercelli A, Repici M, Schorderet DF, Bogousslavsky J, Bonny C (2003) A peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase protects against excitotoxicity and cerebral ischemia. *Nat Med* 9:1180-1186.

## BIBLIOGRAFÍA

Bose R, Chen P, Loconti A, Grulich C, Abrams JM, Kolesnick RN (1998) Ceramide generation by the Reaper protein is not blocked by the caspase inhibitor, p35. *J Biol Chem* 273:28852-28859.

Bothwell M (1996) p75<sup>NTR</sup>: a receptor after all. *Science* 272:506-507.

Bottomley MJ, Salim K, Panayotou G (1998) Phospholipid-binding protein domains. *Biochim Biophys Acta* 1436:165-183.

Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD, DePinho RA, Panayotatos N, Cobb MH, Yancopoulos GD (1991) ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* 65:663-675.

Boulton TG, Yancopoulos GD, Gregory JS, Slaughter C, Moomaw C, Hsu J, Cobb MH (1990) An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science* 249:64-67.

Boulware MI, Weick JP, Becklund BR, Kuo SP, Groth RD, Mermelstein PG (2005) Estradiol activates group I and II metabotropic glutamate receptor signaling, leading to opposing influences on cAMP response element-binding protein. *J Neurosci* 25:5066-5078.

Bouschet T, Perez V, Fernandez C, Bockaert J, Eychene A, Journot L (2003) Stimulation of the ERK pathway by GTP-loaded Rap1 requires the concomitant activation of Ras, protein kinase C, and protein kinase A in neuronal cells. *J Biol Chem* 278:4778-4785.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.

Brady RO, Kanfer JN, Mock MB, Fredrickson DS (1966) The metabolism of sphingomyelin. II. Evidence of an enzymatic deficiency in Niemann-Pick disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 55:366-369.

Brenner S (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77:71-94.

Brown DA, London E (1998) Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14:111-136.

Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME (1999) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96:857-868.

Burek MJ, Oppenheim RW (1996) Programmed cell death in the developing nervous system. *Brain Pathol* 6:427-446.

Burgoyne RD, Cambray-Deakin MA (1988) The cellular neurobiology of neuronal development: the cerebellar granule cell. *Brain Res* 472:77-101.

Butt AJ, Harvey NL, Parasivam G, Kumar S (1998) Dimerization and autoprocessing of the Nedd2 (caspase-2) precursor requires both the prodomain and the carboxyl-terminal regions. *J Biol Chem* 273:6763-6768.

Caballero-Benitez A, Moran J (2003) Caspase activation pathways induced by staurosporine and low potassium: role of caspase-2. *J Neurosci Res* 71:383-396.

Cain K, Brown DG, Langlais C, Cohen GM (1999) Caspase activation involves the formation of the aposome, a large (approximately 700 kDa) caspase-activating complex. *J Biol Chem* 274:22686-22692.

Calissano P, Ciotti MT, Battistini L, Zona C, Angelini A, Merlo D, Mercanti D (1993) Recombinant human insulin-like growth factor I exerts a trophic action and confers glutamate sensitivity on glutamate-resistant cerebellar granule cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8752-8756.

Campbell RA, Bhat-Nakshatri P, Patel NM, Constantinidou D, Ali S, Nakshatri H (2001) Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha: a new model for anti-estrogen resistance. *J Biol Chem* 276:9817-9824.

Cao J, Semenova MM, Solovyan VT, Han J, Coffey ET, Courtney MJ (2004) Distinct requirements for p38alpha and c-Jun N-terminal kinase stress-activated protein kinases in different forms of apoptotic neuronal death. *J Biol Chem* 279:35903-35913.

## BIBLIOGRAFÍA

Cardona-Gomez GP, Mendez P, DonCarlos LL, Azcoitia I, Garcia-Segura LM (2001) Interactions of estrogens and insulin-like growth factor-I in the brain: implications for neuroprotection. *Brain Res Brain Res Rev* 37:320-334.

Cardona-Gomez GP, Mendez P, DonCarlos LL, Azcoitia I, Garcia-Segura LM (2002) Interactions of estrogen and insulin-like growth factor-I in the brain: molecular mechanisms and functional implications. *J Steroid Biochem Mol Biol* 83:211-217.

Cardona-Gomez P, Perez M, Avila J, Garcia-Segura LM, Wandosell F (2004) Estradiol inhibits GSK3 and regulates interaction of estrogen receptors, GSK3, and beta-catenin in the hippocampus. *Mol Cell Neurosci* 25:363-373.

Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC (1998) Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282:1318-1321.

Casanova E, Garate C, Ovalle S, Calvo P, Chinchetru MA (1996) Identification of four splice variants of the mouse stress-activated protein kinase JNK/SAPK alpha-isoform. *Neuroreport* 7:1320-1324.

Castiglione M, Spinsanti P, Iacovelli L, Lenti L, Martini F, Gradini R, Di GG, V, Caricasole A, Caruso A, De Maria R, Nicoletti F, Melchiorri D (2004) Activation of Fas receptor is required for the increased formation of the disialoganglioside GD3 in cultured cerebellar granule cells committed to apoptotic death. *Neuroscience* 126:889-898.

Cecconi F, Alvarez-Bolado G, Meyer BI, Roth KA, Gruss P (1998) Apaf1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development. *Cell* 94:727-737.

Centeno F, Mora A, Fuentes JM, Soler G, Claro E (1998) Partial lithium-associated protection against apoptosis induced by C2-ceramide in cerebellar granule neurons. *Neuroreport* 9:4199-4203.

Chaban VV, Lakhter AJ, Micevych P (2004) A membrane estrogen receptor mediates intracellular calcium release in astrocytes. *Endocrinology* 145:3788-3795.

Chen HJ, Rojas-Soto M, Oguni A, Kennedy MB (1998a) A synaptic Ras-GTPase activating protein (p135 SynGAP) inhibited by CaM kinase II. *Neuron* 20:895-904.



Chen L, Kim TJ, Pillai S (1998b) Inhibition of caspase activity prevents anti-IgM induced apoptosis but not ceramide generation in WEHI 231 B cells. *Mol Immunol* 35:195-205.

Chen RH, Sarnecki C, Blenis J (1992) Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Mol Cell Biol* 12:915-927.

Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T, Korsmeyer SJ (2001) BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* 8:705-711.

Cheung EC, Slack RS (2004) Emerging role for ERK as a key regulator of neuronal apoptosis. *Sci STKE* 2004:E45.

Chin PC, D'Mello SR (2004) Survival of cultured cerebellar granule neurons can be maintained by Akt-dependent and Akt-independent signaling pathways. *Brain Res Mol Brain Res* 127:140-145.

Chin PC, Liu L, Morrison BE, Siddiq A, Ratan RR, Bottiglieri T, D'Mello SR (2004) The c-Raf inhibitor GW5074 provides neuroprotection in vitro and in an animal model of neurodegeneration through a MEK-ERK and Akt-independent mechanism. *J Neurochem* 90:595-608.

Chin PC, Majdzadeh N, D'Mello SR (2005) Inhibition of GSK3beta is a common event in neuroprotection by different survival factors. *Brain Res Mol Brain Res* 137:193-201.

Choi DW (1995) Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *Trends Neurosci* 18:58-60.

Choi DW (1996) Ischemia-induced neuronal apoptosis. *Curr Opin Neurobiol* 6:667-672.

Chowen JA, Torres-Aleman I, Garcia-Segura LM (1992) Trophic effects of estradiol on fetal rat hypothalamic neurons. *Neuroendocrinology* 56:895-901.

Clarke PG (1990) Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol (Berl)* 181:195-213.

Clarke PG, Clarke S (1996) Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena. *Anat Embryol (Berl)* 193:81-99.

## BIBLIOGRAFÍA

Colell A, Garcia-Ruiz C, Roman J, Ballesta A, Fernandez-Checa JC (2001) Ganglioside GD3 enhances apoptosis by suppressing the nuclear factor-kappa B-dependent survival pathway. *FASEB J* 15:1068-1070.

Colombaioni L, Garcia-Gil M (2004) Sphingolipid metabolites in neural signalling and function. *Brain Res Brain Res Rev* 46:328-355.

Colucci-D'Amato L, Perrone-Capano C, di PU (2003) Chronic activation of ERK and neurodegenerative diseases. *Bioessays* 25:1085-1095.

Compton MM (1992) A biochemical hallmark of apoptosis: internucleosomal degradation of the genome. *Cancer Metastasis Rev* 11:105-119.

Conus S, Kaufmann T, Fellay I, Otter I, Rosse T, Borner C (2000) Bcl-2 is a monomeric protein: prevention of homodimerization by structural constraints. *EMBO J* 19:1534-1544.

Cooper JA, Hunter T (1983) Identification and characterization of cellular targets for tyrosine protein kinases. *J Biol Chem* 258:1108-1115.

Copani A, Bruno VM, Barresi V, Battaglia G, Condorelli DF, Nicoletti F (1995) Activation of metabotropic glutamate receptors prevents neuronal apoptosis in culture. *J Neurochem* 64:101-108.

Copani A, Melchiorri D, Caricasole A, Martini F, Sale P, Carnevale R, Gradini R, Sortino MA, Lenti L, De Maria R, Nicoletti F (2002) Beta-amyloid-induced synthesis of the ganglioside GD3 is a requisite for cell cycle reactivation and apoptosis in neurons. *J Neurosci* 22:3963-3968.

Cordey M, Pike CJ (2005) Neuroprotective properties of selective estrogen receptor agonists in cultured neurons. *Brain Res* 1045:217-223.

Costa MM, Reus VI, Wolkowitz OM, Manfredi F, Lieberman M (1999) Estrogen replacement therapy and cognitive decline in memory-impaired post-menopausal women. *Biol Psychiatry* 46:182-188.

Cowley SM, Hoare S, Mosselman S, Parker MG (1997) Estrogen receptors alpha and beta form heterodimers on DNA. *J Biol Chem* 272:19858-19862.

Creedon DJ, Johnson EM, Lawrence JC (1996) Mitogen-activated protein kinase-independent pathways mediate the effects of nerve growth factor and cAMP on neuronal survival. *J Biol Chem* 271:20713-20718.

Cregan SP, Dawson VL, Slack RS (2004) Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death. *Oncogene* 23:2785-2796.

Cregan SP, MacLaurin JG, Craig CG, Robertson GS, Nicholson DW, Park DS, Slack RS (1999) Bax-dependent caspase-3 activation is a key determinant in p53-induced apoptosis in neurons. *J Neurosci* 19:7860-7869.

Crews CM, Alessandrini A, Erikson RL (1992) The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science* 258:478-480.

Crissman HA, Oka MS, Steinkamp JA (1976) Rapid staining methods for analysis of deoxyribonucleic acid and protein in mammalian cells. *J Histochem Cytochem* 24:64-71.

Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378:785-789.

Crowder RJ, Freeman RS (2000) Glycogen synthase kinase-3 beta activity is critical for neuronal death caused by inhibiting phosphatidylinositol 3-kinase or Akt but not for death caused by nerve growth factor withdrawal. *J Biol Chem* 275:34266-34271.

Cuenda A, Cohen P, Buee-Scherrer V, Goedert M (1997) Activation of stress-activated protein kinase-3 (SAPK3) by cytokines and cellular stresses is mediated via SAPKK3 (MKK6); comparison of the specificities of SAPK3 and SAPK2 (RK/p38). *EMBO J* 16:295-305.

Cutler RG, Mattson MP (2001) Sphingomyelin and ceramide as regulators of development and lifespan. *Mech Ageing Dev* 122:895-908.

D'Mello SR, Aglioco F, Roberts MR, Borodezt K, Haycock JW (1998) A DEVD-inhibited caspase other than CPP32 is involved in the commitment of cerebellar granule neurons to apoptosis induced by K<sup>+</sup> deprivation. *J Neurochem* 70:1809-1818.

## BIBLIOGRAFÍA

D'Mello SR, Borodezt K, Soltoff SP (1997) Insulin-like growth factor and potassium depolarization maintain neuronal survival by distinct pathways: possible involvement of PI 3-kinase in IGF-1 signaling. *J Neurosci* 17:1548-1560.

D'Mello SR, Galli C, Ciotti T, Calissano P (1993) Induction of apoptosis in cerebellar granule neurons by low potassium: inhibition of death by insulin-like growth factor I and cAMP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:10989-10993.

Dai T, Rubie E, Franklin CC, Kraft A, Gillespie DA, Avruch J, Kyriakis JM, Woodgett JR (1995) Stress-activated protein kinases bind directly to the delta domain of c-Jun in resting cells: implications for repression of c-Jun function. *Oncogene* 10:849-855.

Dare E, Gotz ME, Zhivotovsky B, Manzo L, Ceccatelli S (2000) Antioxidants J811 and 17beta-estradiol protect cerebellar granule cells from methylmercury-induced apoptotic cell death. *J Neurosci Res* 62:557-565.

Darwin C (1859) *Natural Selection. The Origin of Species* Chapter 4.

Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91:231-241.

Daum G, Eisenmann-Tappe I, Fries HW, Troppmair J, Rapp UR (1994) The ins and outs of Raf kinases. *Trends Biochem Sci* 19:474-480.

Dbaibo GS, Perry DK, Gamard CJ, Platt R, Poirier GG, Obeid LM, Hannun YA (1997) Cytokine response modifier A (CrmA) inhibits ceramide formation in response to tumor necrosis factor (TNF)-alpha: CrmA and Bcl-2 target distinct components in the apoptotic pathway. *J Exp Med* 185:481-490.

De Maria R, Lenti L, Malisan F, d'Agostino F, Tomassini B, Zeuner A, Rippo MR, Testi R (1997) Requirement for GD3 ganglioside in. *Science* 277:1652-1655.

De Maria R, Rippo MR, Schuchman EH, Testi R (1998) Acidic sphingomyelinase (ASM) is necessary for fas-induced GD3 ganglioside accumulation and efficient apoptosis of lymphoid cells. *J Exp Med* 187:897-902.

Deisseroth K, Mermelstein PG, Xia H, Tsien RW (2003) Signaling from synapse to nucleus: the logic behind the mechanisms. *Curr Opin Neurobiol* 13:354-365.

Dent P, Haser W, Haystead TA, Vincent LA, Roberts TM, Sturgill TW (1992) Activation of mitogen-activated protein kinase kinase by v-Raf in NIH 3T3 cells and in vitro. *Science* 257:1404-1407.

Derijard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Su B, Deng T, Karin M, Davis RJ (1994) JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* 76:1025-1037.

Deveraux QL, Reed JC (1999) IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 13:239-252.

Deveraux QL, Roy N, Stennicke HR, Van Arsdale T, Zhou Q, Srinivasula SM, Alnemri ES, Salvesen GS, Reed JC (1998) IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J* 17:2215-2223.

Dluzen D (1997) Estrogen decreases corpus striatal neurotoxicity in response to 6-hydroxydopamine. *Brain Res* 767:340-344.

Dluzen DE (2000) Neuroprotective effects of estrogen upon the nigrostriatal dopaminergic system. *J Neurocytol* 29:387-399.

Dluzen DE, McDermott JL, Liu B (1996a) Estrogen alters MPTP-induced neurotoxicity in female mice: effects on striatal dopamine concentrations and release. *J Neurochem* 66:658-666.

Dluzen DE, McDermott JL, Liu B (1996b) Estrogen as a neuroprotectant against MPTP-induced neurotoxicity in C57/B1 mice. *Neurotoxicol Teratol* 18:603-606.

Dobrowsky RT, Hannun YA (1992) Ceramide stimulates a cytosolic protein phosphatase. *J Biol Chem* 267:5048-5051.

Dos Santos EG, Dieudonne MN, Pecquery R, Le M, V, Giudicelli Y, Lacasa D (2002) Rapid nongenomic E2 effects on p42/p44 MAPK, activator protein-1, and cAMP response element binding protein in rat white adipocytes. *Endocrinology* 143:930-940.

Drewes G, Lichtenberg-Kraag B, Doring F, Mandelkow EM, Biernat J, Goris J, Doree M, Mandelkow E (1992) Mitogen activated protein (MAP) kinase transforms tau protein into an Alzheimer-like state. *EMBO J* 11:2131-2138.

## BIBLIOGRAFÍA

Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102:33-42.

Du K, Montminy M (1998) CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. *J Biol Chem* 273:32377-32379.

Dubal DB, Kashon ML, Pettigrew LC, Ren JM, Finklestein SP, Rau SW, Wise PM (1998) Estradiol protects against ischemic injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:1253-1258.

Dubal DB, Shughrue PJ, Wilson ME, Merchenthaler I, Wise PM (1999) Estradiol modulates bcl-2 in cerebral ischemia: a potential role for estrogen receptors. *J Neurosci* 19:6385-6393.

Dubik D, Shiu RP (1992) Mechanism of estrogen activation of c-myc oncogene expression. *Oncogene* 7:1587-1594.

Dubois MF, Nguyen VT, Dahmus ME, Pages G, Pouyssegur J, Bensaude O (1994) Enhanced phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II upon serum stimulation of quiescent cells: possible involvement of MAP kinases. *EMBO J* 13:4787-4797.

Duckett CS, Li F, Wang Y, Tomaselli KJ, Thompson CB, Armstrong RC (1998) Human IAP-like protein regulates programmed cell death downstream of Bcl-xL and cytochrome c. *Mol Cell Biol* 18:608-615.

Dudley DT, Pang L, Decker SJ, Bridges AJ, Saltiel AR (1995) A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:7686-7689.

Duenas M, Torres-Aleman I, Naftolin F, Garcia-Segura LM (1996) Interaction of insulin-like growth factor-I and estradiol signaling pathways on hypothalamic neuronal differentiation. *Neuroscience* 74:531-539.

Dumaz N, Light Y, Marais R (2002) Cyclic AMP blocks cell growth through Raf-1-dependent and Raf-1-independent mechanisms. *Mol Cell Biol* 22:3717-3728.

Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH (1999) Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 68:383-424.

Ehrhardt A, Ehrhardt GR, Guo X, Schrader JW (2002) Ras and relatives--job sharing and networking keep an old family together. *Exp Hematol* 30:1089-1106.

El Ashry D, Chrysogelos SA, Lippman ME, Kern FG (1996) Estrogen induction of TGF-alpha is mediated by an estrogen response element composed of two imperfect palindromes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 59:261-269.

Eldadah BA, Yakovlev AG, Faden AI (1997) The role of CED-3-related cysteine proteases in apoptosis of cerebellar granule cells. *J Neurosci* 17:6105-6113.

Ellis HM, Horvitz HR (1986) Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 44:817-829.

Eminel S, Klettner A, Roemer L, Herdegen T, Waetzig V (2004) JNK2 translocates to the mitochondria and mediates cytochrome c release in PC12 cells in response to 6-hydroxydopamine. *J Biol Chem* 279:55385-55392.

Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391:43-50.

Enguita M, DeGregorio-Rocasolano N, Abad A, Trullas R (2005) Glycogen synthase kinase 3 activity mediates neuronal pentraxin 1 expression and cell death induced by potassium deprivation in cerebellar granule cells. *Mol Pharmacol* 67:1237-1246.

Enslin H, Raingeaud J, Davis RJ (1998) Selective activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6. *J Biol Chem* 273:1741-1748.

Errede B, Cade RM, Yashar BM, Kamada Y, Levin DE, Irie K, Matsumoto K (1995) Dynamics and organization of MAP kinase signal pathways. *Mol Reprod Dev* 42:477-485.

Evans RM (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240:889-895.

Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM (1992) Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 148:2207-2216.

## BIBLIOGRAFÍA

Fantl WJ, Muslin AJ, Kikuchi A, Martin JA, MacNicol AM, Gross RW, Williams LT (1994) Activation of Raf-1 by 14-3-3 proteins. *Nature* 371:612-614.

Farrar WL, Kilian PL, Ruff MR, Hill JM, Pert CB (1987) Visualization and characterization of interleukin 1 receptors in brain. *J Immunol* 139:459-463.

Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Feeser WS, Van Dyk DE, Pitts WJ, Earl RA, Hobbs F, Copeland RA, Magolda RL, Scherle PA, Trzaskos JM (1998) Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem* 273:18623-18632.

Ferrell JE, Jr. (1997) How responses get more switch-like as you move down a protein kinase cascade. *Trends Biochem Sci* 22:288-289.

Ferrell JE, Jr. (1999) Building a cellular switch: more lessons from a good egg. *Bioessays* 21:866-870.

Ferrell JE, Jr., Bhatt RR (1997) Mechanistic studies of the dual phosphorylation of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 272:19008-19016.

Ferri KF, Kroemer G (2001) Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol* 3:E255-E263.

Figtree GA, McDonald D, Watkins H, Channon KM (2003) Truncated estrogen receptor alpha 46-kDa isoform in human endothelial cells: relationship to acute activation of nitric oxide synthase. *Circulation* 107:120-126.

Finkbeiner S, Tavazoie SF, Maloratsky A, Jacobs KM, Harris KM, Greenberg ME (1997) CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses. *Neuron* 19:1031-1047.

Fiore RS, Bayer VE, Pelech SL, Posada J, Cooper JA, Baraban JM (1993) p42 mitogen-activated protein kinase in brain: prominent localization in neuronal cell bodies and dendrites. *Neuroscience* 55:463-472.

Fiorelli G, Gori F, Frediani U, Franceschelli F, Tanini A, Tosti-Guerra C, Benvenuti S, Gennari L, Becherini L, Brandi ML (1996) Membrane binding sites and non-genomic effects of estrogen in cultured human pre-osteoclastic cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 59:233-240.



Fournier B, Gutzwiller S, Dittmar T, Matthias G, Steenbergh P, Matthias P (2001) Estrogen receptor (ER)-alpha, but not ER-beta, mediates regulation of the insulin-like growth factor I gene by antiestrogens. *J Biol Chem* 276:35444-35449.

Fox TO (1977) Estradiol and testosterone binding in normal and mutant mouse cerebellum: biochemical and cellular specificity. *Brain Res* 128:263-273.

Frandsen A, Schousboe A (1990) Development of excitatory amino acid induced cytotoxicity in cultured neurons. *Int J Dev Neurosci* 8:209-216.

Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC, Toker A (1997) Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science* 275:665-668.

Fraser A, McCarthy N, Evan GI (1996) Biochemistry of cell death. *Curr Opin Neurobiol* 6:71-80.

Frodin M, Gammeltoft S (1999) Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction. *Mol Cell Endocrinol* 151:65-77.

Frodin M, Peraldi P, Van Obberghen E (1994) Cyclic AMP activates the mitogen-activated protein kinase cascade in PC12 cells. *J Biol Chem* 269:6207-6214.

Fruman DA, Rameh LE, Cantley LC (1999) Phosphoinositide binding domains: embracing 3-phosphate. *Cell* 97:817-820.

Fujita E, Jinbo A, Matuzaki H, Konishi H, Kikkawa U, Momoi T (1999) Akt phosphorylation site found in human caspase-9 is absent in mouse caspase-9. *Biochem Biophys Res Commun* 264:550-555.

Fukunaga K, Miyamoto E (1998) Role of MAP kinase in neurons. *Mol Neurobiol* 16:79-95.

Fukunaga R, Hunter T (1997) MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates. *EMBO J* 16:1921-1933.

Gallo V, Kingsbury A, Balazs R, Jorgensen OS (1987b) The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J Neurosci* 7:2203-2213.

## BIBLIOGRAFÍA

Gallo V, Kingsbury A, Balazs R, Jorgensen OS (1987a) The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J Neurosci* 7:2203-2213.

Garcia-Segura LM, Azcoitia I, DonCarlos LL (2001) Neuroprotection by estradiol. *Prog Neurobiol* 63:29-60.

Garcia-Segura LM, Cardona-Gomez P, Naftolin F, Chowen JA (1998) Estradiol upregulates Bcl-2 expression in adult brain neurons. *Neuroreport* 9:593-597.

Gerhardt E, Kugler S, Leist M, Beier C, Berliocchi L, Volbracht C, Weller M, Bahr M, Nicotera P, Schulz JB (2001) Cascade of caspase activation in potassium-deprived cerebellar granule neurons: targets for treatment with peptide and protein inhibitors of apoptosis. *Mol Cell Neurosci* 17:717-731.

Ghatan S, Lerner S, Kinoshita Y, Hetman M, Patel L, Xia Z, Youle RJ, Morrison RS (2000) p38 MAP kinase mediates bax translocation in nitric oxide-induced apoptosis in neurons. *J Cell Biol* 150:335-347.

Gille H, Kortenjann M, Thomae O, Moomaw C, Slaughter C, Cobb MH, Shaw PE (1995) ERK phosphorylation potentiates Elk-1-mediated ternary complex formation and transactivation. *EMBO J* 14:951-962.

Gire V, Marshall C, Wynford-Thomas D (2000) PI-3-kinase is an essential anti-apoptotic effector in the proliferative response of primary human epithelial cells to mutant RAS. *Oncogene* 19:2269-2276.

Gleichmann M, Weller M, Schulz JB (2000) Insulin-like growth factor-1-mediated protection from neuronal apoptosis is linked to phosphorylation of the pro-apoptotic protein BAD but not to inhibition of cytochrome c translocation in rat cerebellar neurons. *Neurosci Lett* 282:69-72.

Glucksmann A. (1951) Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biol Rev* 26:5986.

Goedert M, Cuenda A, Craxton M, Jakes R, Cohen P (1997) Activation of the novel stress-activated protein kinase SAPK4 by cytokines and cellular stresses is mediated by SKK3 (MKK6); comparison of its substrate specificity with that of other SAP kinases. *EMBO J* 16:3563-3571.

Gonzalez BJ, Basille M, Vaudry D, Fournier A, Vaudry H (1997) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide promotes cell survival and neurite outgrowth in rat cerebellar neuroblasts. *Neuroscience* 78:419-430.

Gonzalez GA, Montminy MR (1989) Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell* 59:675-680.

Goodman Y, Bruce AJ, Cheng B, Mattson MP (1996) Estrogens attenuate and corticosterone exacerbates excitotoxicity, oxidative injury, and amyloid beta-peptide toxicity in hippocampal neurons. *J Neurochem* 66:1836-1844.

Goodman Y, Mattson MP (1996) Ceramide protects hippocampal neurons against excitotoxic and oxidative insults, and amyloid beta-peptide toxicity. *J Neurochem* 66:869-872.

Green PS, Bishop J, Simpkins JW (1997) 17 alpha-estradiol exerts neuroprotective effects on SK-N-SH cells. *J Neurosci* 17:511-515.

Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ (1999) BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 13:1899-1911.

Gu G, Rojo AA, Zee MC, Yu J, Simerly RB (1996) Hormonal regulation of CREB phosphorylation in the anteroventral periventricular nucleus. *J Neurosci* 16:3035-3044.

Gu Q, Korach KS, Moss RL (1999) Rapid action of 17beta-estradiol on kainate-induced currents in hippocampal neurons lacking intracellular estrogen receptors. *Endocrinology* 140:660-666.

Gu X, Spitzer NC (1995) Distinct aspects of neuronal differentiation encoded by frequency of spontaneous Ca<sup>2+</sup> transients. *Nature* 375:784-787.

Guerrini L, Blasi F, Denis-Donini S (1995) Synaptic activation of NF-kappa B by glutamate in cerebellar granule neurons in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9077-9081.

Guo Y, Srinivasula SM, Druilhe A, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES (2002) Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria. *J Biol Chem* 277:13430-13437.

## BIBLIOGRAFÍA

Gupta S, Barrett T, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sluss HK, Derijard B, Davis RJ (1996) Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO J* 15:2760-2770.

Hagemann C, Rapp UR (1999) Isotype-specific functions of Raf kinases. *Exp Cell Res* 253:34-46.

Hamburger V, Levi-Montalcini R (1949) Proliferation, differentiation and degeneration in the spinal ganglia of the chick embryo under normal and experimental conditions. *J Exp Zool* 111:457-502.

Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ (1994) A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 265:808-811.

Han X, Holtzman M, McKeel DW, Jr., Kelley J, Morris JC (2002) Substantial sulfatide deficiency and ceramide elevation in very early Alzheimer's disease: potential role in disease pathogenesis. *J Neurochem* 82:809-818.

Hannun YA (1996) Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science* 274:1855-1859.

Hannun YA (1994) The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide. *J Biol Chem* 269:3125-3128.

Hannun YA, Luberto C (2000) Ceramide in the eukaryotic stress response. *Trends Cell Biol* 10:73-80.

Harms C, Lautenschlager M, Bergk A, Katchanov J, Freyer D, Kapinya K, Herwig U, Megow D, Dirnagl U, Weber JR, Hortnagl H (2001) Differential mechanisms of neuroprotection by 17 beta-estradiol in apoptotic versus necrotic neurodegeneration. *J Neurosci* 21:2600-2609.

Harris CA, Johnson EM, Jr. (2001) BH3-only Bcl-2 family members are coordinately regulated by the JNK pathway and require Bax to induce apoptosis in neurons. *J Biol Chem* 276:37754-37760.

Harris HA, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS (2002) Characterization of the biological roles of the estrogen receptors, ERalpha and ERbeta, in estrogen target

tissues in vivo through the use of an ER $\alpha$ -selective ligand. *Endocrinology* 143:4172-4177.

Hartmann A, Hunot S, Michel PP, Muriel MP, Vyas S, Faucheux BA, Mouatt-Prigent A, Turmel H, Srinivasan A, Ruberg M, Evan GI, Agid Y, Hirsch EC (2000) Caspase-3: A vulnerability factor and final effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:2875-2880.

Haynes MP, Li L, Sinha D, Russell KS, Hisamoto K, Baron R, Collinge M, Sessa WC, Bender JR (2003) Src kinase mediates phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent rapid endothelial nitric-oxide synthase activation by estrogen. *J Biol Chem* 278:2118-2123.

Heidenreich KA, Kummer JL (1996) Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase by insulin in cultured fetal neurons. *J Biol Chem* 271:9891-9894.

Henderson VW, Paganini-Hill A, Miller BL, Elble RJ, Reyes PF, Shoupe D, McCleary CA, Klein RA, Hake AM, Farlow MR (2000) Estrogen for Alzheimer's disease in women: randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neurology* 54:295-301.

Hengartner MO (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407:770-776.

Hengartner MO (1996) Programmed cell death in invertebrates. *Curr Opin Genet Dev* 6:34-38.

Hengartner MO, Horvitz HR (1994) *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*. *Cell* 76:665-676.

Herr I, Martin-Villalba A, Kurz E, Roncaioli P, Schenkel J, Cifone MG, Debatin KM (1999) FK506 prevents stroke-induced generation of ceramide and apoptosis signaling. *Brain Res* 826:210-219.

Hetman M, Cavanaugh JE, Kimelman D, Xia Z (2000) Role of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in neuronal apoptosis induced by trophic withdrawal. *J Neurosci* 20:2567-2574.

Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A, Karin M (1993) Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev* 7:2135-2148.

## BIBLIOGRAFÍA

Hofer F, Fields S, Schneider C, Martin GS (1994) Activated Ras interacts with the Ral guanine nucleotide dissociation stimulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:11089-11093.

Hofmann K, Dixit VM (1998) Ceramide in apoptosis--does it really matter? *Trends Biochem Sci* 23:374-377.

Honda K, Sawada H, Kihara T, Urushitani M, Nakamizo T, Akaike A, Shimohama S (2000) Phosphatidylinositol 3-kinase mediates neuroprotection by estrogen in cultured cortical neurons. *J Neurosci Res* 60:321-327.

Howe LR, Leever SJ, Gomez N, Nakielny S, Cohen P, Marshall CJ (1992) Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase raf. *Cell* 71:335-342.

Hu MC, Qiu WR, Wang YP (1997) JNK1, JNK2 and JNK3 are p53 N-terminal serine 34 kinases. *Oncogene* 15:2277-2287.

Hunot S, Vila M, Teismann P, Davis RJ, Hirsch EC, Przedborski S, Rakic P, Flavell RA (2004) JNK-mediated induction of cyclooxygenase 2 is required for neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:665-670.

Impey S, Obrietan K, Storm DR (1999) Making new connections: role of ERK/MAP kinase signaling in neuronal plasticity. *Neuron* 23:11-14.

Impey S, Obrietan K, Wong ST, Poser S, Yano S, Wayman G, Deloulme JC, Chan G, Storm DR (1998) Cross talk between ERK and PKA is required for Ca<sup>2+</sup> stimulation of CREB-dependent transcription and ERK nuclear translocation. *Neuron* 21:869-883.

Ito A, Horigome K (1995) Ceramide prevents neuronal programmed cell death induced by nerve growth factor deprivation. *J Neurochem* 65:463-466.

Jacobson MD, Weil M, Raff MC (1997) Programmed cell death in animal development. *Cell* 88:347-354.

Jaiswal RK, Weissinger E, Kolch W, Landreth GE (1996) Nerve growth factor-mediated activation of the mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade involves a signaling complex containing B-Raf and HSP90. *J Biol Chem* 271:23626-23629.

Janknecht R, Hunter T (1997) Activation of the Sap-1a transcription factor by the c-Jun N-terminal kinase (JNK) mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 272:4219-4224.

Jarvis WD, Kolesnick RN, Fornari FA, Traylor RS, Gewirtz DA, Grant S (1994) Induction of apoptotic DNA damage and cell death by activation of the sphingomyelin pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:73-77.

Juo P, Kuo CJ, Yuan J, Blenis J (1998) Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Curr Biol* 8:1001-1008.

Kahlert S, Nuedling S, van Eickels M, Vetter H, Meyer R, Grohe C (2000) Estrogen receptor alpha rapidly activates the IGF-1 receptor pathway. *J Biol Chem* 275:18447-18453.

Kallunki T, Su B, Tsigelny I, Sluss HK, Derijard B, Moore G, Davis R, Karin M (1994) JNK2 contains a specificity-determining region responsible for efficient c-Jun binding and phosphorylation. *Genes Dev* 8:2996-3007.

Kandel ES, Hay N (1999) The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp Cell Res* 253:210-229.

Kane LP, Shapiro VS, Stokoe D, Weiss A (1999) Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase. *Curr Biol* 9:601-604.

Kaplan DR, Miller FD (2000) Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 10:381-391.

Kauffmann-Zeh A, Rodriguez-Viciano P, Ulrich E, Gilbert C, Coffey P, Downward J, Evan G (1997) Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB. *Nature* 385:544-548.

Kawas C, Resnick S, Morrison A, Brookmeyer R, Corrada M, Zonderman A, Bacal C, Lingle DD, Metter E (1997) A prospective study of estrogen replacement therapy and the risk of developing Alzheimer's disease: the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Neurology* 48:1517-1521.

Kawasaki H, Morooka T, Shimohama S, Kimura J, Hirano T, Gotoh Y, Nishida E (1997) Activation and involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in glutamate-induced apoptosis in rat cerebellar granule cells. *J Biol Chem* 272:18518-18521.

## BIBLIOGRAFÍA

Keane RW, Srinivasan A, Foster LM, Testa MP, Ord T, Nonner D, Wang HG, Reed JC, Bredesen DE, Kayalar C (1997) Activation of CPP32 during apoptosis of neurons and astrocytes. *J Neurosci Res* 48:168-180.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239-257.

Kingsbury A, Balazs R (1987) Effect of calcium agonists and antagonists on cerebellar granule cells. *Eur J Pharmacol* 140:275-283.

Kitatani K, Akiba S, Hayama M, Sato T (2001) Ceramide accelerates dephosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 to decrease prostaglandin D(2) production in RBL-2H3 cells. *Arch Biochem Biophys* 395:208-214.

Klesse LJ, Meyers KA, Marshall CJ, Parada LF (1999) Nerve growth factor induces survival and differentiation through two distinct signaling cascades in PC12 cells. *Oncogene* 18:2055-2068.

Koike S, Sakai M, Muramatsu M (1987) Molecular cloning and characterization of rat estrogen receptor cDNA. *Nucleic Acids Res* 15:2499-2513.

Kolesnick R, Hannun YA (1999) Ceramide and apoptosis. *Trends Biochem Sci* 24:224-225.

Kolesnick RN (1991) Sphingomyelin and derivatives as cellular signals. *Prog Lipid Res* 30:1-38.

Kolesnick RN, Kronke M (1998) Regulation of ceramide production and apoptosis. *Annu Rev Physiol* 60:643-665.

Komuro H, Rakic P (1998) Distinct modes of neuronal migration in different domains of developing cerebellar cortex. *J Neurosci* 18:1478-1490.

Krajewski S, Krajewska M, Ellerby LM, Welsh K, Xie Z, Deveraux QL, Salvesen GS, Bredesen DE, Rosenthal RE, Fiskum G, Reed JC (1999) Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:5752-5757.

Kristal BS, Brown AM (1999) Apoptogenic ganglioside GD3 directly induces the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem* 274:23169-23175.



Kuan CY, Whitmarsh AJ, Yang DD, Liao G, Schloemer AJ, Dong C, Bao J, Banasiak KJ, Haddad GG, Flavell RA, Davis RJ, Rakic P (2003) A critical role of neural-specific JNK3 for ischemic apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15184-15189.

Kuan CY, Yang DD, Samanta Roy DR, Davis RJ, Rakic P, Flavell RA (1999) The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. *Neuron* 22:667-676.

Kubo T, Nonomura T, Enokido Y, Hatanaka H (1995) Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) can prevent apoptosis of rat cerebellar granule neurons in culture. *Brain Res Dev Brain Res* 85:249-258.

Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA (1997) Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138:863-870.

Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA (1996) Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:5925-5930.

Kure S, Tominaga T, Yoshimoto T, Tada K, Narisawa K (1991) Glutamate triggers internucleosomal DNA cleavage in neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 179:39-45.

Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, Avruch J, Woodgett JR (1994) The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* 369:156-160.

LaFerla FM, Tinkle BT, Bieberich CJ, Haudenschild CC, Jay G (1995) The Alzheimer's A beta peptide induces neurodegeneration and apoptotic cell death in transgenic mice. *Nat Genet* 9:21-30.

Lafon-Cazal M, Perez V, Bockaert J, Marin P (2002) Akt mediates the anti-apoptotic effect of NMDA but not that induced by potassium depolarization in cultured cerebellar granule cells. *Eur J Neurosci* 16:575-583.

Lee SJ, Campomanes CR, Sikat PT, Greenfield AT, Allen PB, McEwen BS (2004) Estrogen induces phosphorylation of cyclic AMP response element binding (pCREB) in primary hippocampal cells in a time-dependent manner. *Neuroscience* 124:549-560.

## BIBLIOGRAFÍA

Lee SJ, McEwen BS (2001) Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogens and their therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41:569-591.

Leevers SJ, Vanhaesebroeck B, Waterfield MD (1999) Signalling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take centre stage. *Curr Opin Cell Biol* 11:219-225.

Lei K, Davis RJ (2003) JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2432-2437.

Leist M, Single B, Castoldi AF, Kühnle S, Nicotera P (1997) Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med* 185:1481-1486.

Lenzen C, Cool RH, Prinz H, Kuhlmann J, Wittinghofer A (1998) Kinetic analysis by fluorescence of the interaction between Ras and the catalytic domain of the guanine nucleotide exchange factor Cdc25Mm. *Biochemistry* 37:7420-7430.

Lesniak MA, Hill JM, Kiess W, Rojeski M, Pert CB, Roth J (1988) Receptors for insulin-like growth factors I and II: autoradiographic localization in rat brain and comparison to receptors for insulin. *Endocrinology* 123:2089-2099.

Lev S, Moreno H, Martinez R, Canoll P, Peles E, Musacchio JM, Plowman GD, Rudy B, Schlessinger J (1995) Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca<sup>2+</sup>-induced regulation of ion channel and MAP kinase functions. *Nature* 376:737-745.

Levi-Montalcini R (1950) The origin and development of the visceral system in the spinal cord of the chick embryo. *J Morphol* 86:253-283.

Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG (1998) Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res* 74:49-139.

Li L, Haynes MP, Bender JR (2003) Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor alpha variant (ER46) in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4807-4812.

Li LY, Luo X, Wang X (2001a) Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412:95-99.

Li M, Linseman DA, Allen MP, Meintzer MK, Wang X, Laessig T, Wierman ME, Heidenreich KA (2001b) Myocyte enhancer factor 2A and 2D undergo phosphorylation and caspase-mediated degradation during apoptosis of rat cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 21:6544-6552.

Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91:479-489.

Li Z, Jiang Y, Ulevitch RJ, Han J (1996) The primary structure of p38 gamma: a new member of p38 group of MAP kinases. *Biochem Biophys Res Commun* 228:334-340.

Lin CF, Chen CL, Chang WT, Jan MS, Hsu LJ, Wu RH, Fang YT, Tang MJ, Chang WC, Lin YS (2005) Bcl-2 rescues ceramide- and etoposide-induced mitochondrial apoptosis through blockage of caspase-2 activation. *J Biol Chem* 280:23758-23765.

Lin CF, Chen CL, Chang WT, Jan MS, Hsu LJ, Wu RH, Tang MJ, Chang WC, Lin YS (2004) Sequential caspase-2 and caspase-8 activation upstream of mitochondria during ceramide and etoposide-induced apoptosis. *J Biol Chem* 279:40755-40761.

Linseman DA, Butts BD, Precht TA, Phelps RA, Le SS, Laessig TA, Bouchard RJ, Florez-McClure ML, Heidenreich KA (2004) Glycogen synthase kinase-3beta phosphorylates Bax and promotes its mitochondrial localization during neuronal apoptosis. *J Neurosci* 24:9993-10002.

Linseman DA, Phelps RA, Bouchard RJ, Le SS, Laessig TA, McClure ML, Heidenreich KA (2002) Insulin-like growth factor-I blocks Bcl-2 interacting mediator of cell death (Bim) induction and intrinsic death signaling in cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 22:9287-9297.

Liston P, Roy N, Tamai K, Lefebvre C, Baird S, Cherton-Horvat G, Farahani R, McLean M, Ikeda JE, MacKenzie A, Korneluk RG (1996) Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature* 379:349-353.

Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X (1997) DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89:175-184.

## BIBLIOGRAFÍA

Lockshin RA, Williams CM (1964) Programmed cell death. II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *J Insect Physiol* 10:643.

Lunkes A, Mandel JL (1997) Polyglutamines, nuclear inclusions and neurodegeneration. *Nat Med* 3:1201-1202.

MacGregor JI, Jordan VC (1998) Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action. *Pharmacol Rev* 50:151-196.

Malisan F, Testi R (1999) Lipid signaling in CD95-mediated apoptosis. *FEBS Lett* 452:100-103.

Manev H, Cagnoli CM (1997) Ceramide-mediated and isoquinolinesulfonamide-sensitive pathways of neuronal death: anything in common? *Neurochem Int* 31:203-206.

Manev H, Favaron M, Guidotti A, Costa E (1989) Delayed increase of Ca<sup>2+</sup> influx elicited by glutamate: role in neuronal death. *Mol Pharmacol* 36:106-112.

Marks JL, Porte D, Jr., Stahl WL, Baskin DG (1990) Localization of insulin receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization. *Endocrinology* 127:3234-3236.

Martin SJ, Finucane DM, Amarante-Mendes GP, O'Brien GA, Green DR (1996) Phosphatidylserine externalization during CD95-induced apoptosis of cells and cytoplasts requires ICE/CED-3 protease activity. *J Biol Chem* 271:28753-28756.

Martinou JC, Dubois-Dauphin M, Staple JK, Rodriguez I, Frankowski H, Missotten M, Albertini P, Talabot D, Catsicas S, Pietra C, . (1994) Overexpression of BCL-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. *Neuron* 13:1017-1030.

Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Jurgensmeier JM, Susin SA, Vieira HL, Prevost MC, Xie Z, Matsuyama S, Reed JC, Kroemer G (1998) Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* 281:2027-2031.

Mathias S, Dressler KA, Kolesnick RN (1991) Characterization of a ceramide-activated protein kinase: stimulation by tumor necrosis factor alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:10009-10013.

Mathias S, Pena LA, Kolesnick RN (1998) Signal transduction of stress via ceramide. *Biochem J* 335 ( Pt 3):465-480.

Mattson MP, Robinson N, Guo Q (1997) Estrogens stabilize mitochondrial function and protect neural cells against the pro-apoptotic action of mutant presenilin-1. *Neuroreport* 8:3817-3821.

McCullough LD, Hurn PD (2003) Estrogen and ischemic neuroprotection: an integrated view. *Trends Endocrinol Metab* 14:228-235.

McGinnis KM, Gnegy ME, Wang KK (1999) Endogenous bax translocation in SH-SY5Y human neuroblastoma cells and cerebellar granule neurons undergoing apoptosis. *J Neurochem* 72:1899-1906.

Melchiorri D, Martini F, Lococo E, Gradini R, Barletta E, De Maria R, Caricasole A, Nicoletti F, Lenti L (2002) An early increase in the disialoganglioside GD3 contributes to the development of neuronal apoptosis in culture. *Cell Death Differ* 9:609-615.

Mendez P, Azcoitia I, Garcia-Segura LM (2003) Estrogen receptor alpha forms estrogen-dependent multimolecular complexes with insulin-like growth factor receptor and phosphatidylinositol 3-kinase in the adult rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 112:170-176.

Mendez P, Azcoitia I, Garcia-Segura LM (2005) Interdependence of oestrogen and insulin-like growth factor-I in the brain: potential for analysing neuroprotective mechanisms. *J Endocrinol* 185:11-17.

Mermelstein PG, Becker JB, Surmeier DJ (1996) Estradiol reduces calcium currents in rat neostriatal neurons via a membrane receptor. *J Neurosci* 16:595-604.

Merrill AH, Jr., Jones DD (1990) An update of the enzymology and regulation of sphingomyelin metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1044:1-12.

Migliaccio A, Di Domenico M, Castoria G, de Falco A, Bontempo P, Nola E, Auricchio F (1996) Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *EMBO J* 15:1292-1300.

## BIBLIOGRAFÍA

Migliaccio A, Piccolo D, Castoria G, Di Domenico M, Bilancio A, Lombardi M, Gong W, Beato M, Auricchio F (1998) Activation of the Src/p21ras/Erk pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor. *EMBO J* 17:2008-2018.

Mikhailov V, Mikhailova M, Degenhardt K, Venkatachalam MA, White E, Saikumar P (2003) Association of Bax and Bak homo-oligomers in mitochondria. Bax requirement for Bak reorganization and cytochrome c release. *J Biol Chem* 278:5367-5376.

Mikhailov V, Mikhailova M, Pulkrabek DJ, Dong Z, Venkatachalam MA, Saikumar P (2001) Bcl-2 prevents Bax oligomerization in the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem* 276:18361-18374.

Miller TM, Moulder KL, Knudson CM, Creedon DJ, Deshmukh M, Korsmeyer SJ, Johnson EM, Jr. (1997) Bax deletion further orders the cell death pathway in cerebellar granule cells and suggests a caspase-independent pathway to cell death. *J Cell Biol* 139:205-217.

Minami T, Oomura Y, Nabekura J, Fukuda A (1990) 17 beta-estradiol depolarization of hypothalamic neurons is mediated by cyclic AMP. *Brain Res* 519:301-307.

Mobbs CV, Kaplitt M, Kow LM, Pfaff DW (1991) PLC-alpha: a common mediator of the action of estrogen and other hormones? *Mol Cell Endocrinol* 80:C187-C191.

Monti B, Zanghellini P, Contestabile A (2001) Characterization of ceramide-induced apoptotic death in cerebellar granule cells in culture. *Neurochem Int* 39:11-18.

Moosmann B, Behl C (1999) The antioxidant neuroprotective effects of estrogens and phenolic compounds are independent from their estrogenic properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:8867-8872.

Moran J, Itoh T, Reddy UR, Chen M, Alnemri ES, Pleasure D (1999) Caspase-3 expression by cerebellar granule neurons is regulated by calcium and cyclic AMP. *J Neurochem* 73:568-577.

Moran J, Patel AJ (1989) Stimulation of the N-methyl-D-aspartate receptor promotes the biochemical differentiation of cerebellar granule neurons and not astrocytes. *Brain Res* 486:15-25.

Morrison DK (1995) Mechanisms regulating Raf-1 activity in signal transduction pathways. *Mol Reprod Dev* 42:507-514.

Morrison DK, Cutler RE (1997) The complexity of Raf-1 regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9:174-179.

Morrison DK, Heidecker G, Rapp UR, Copeland TD (1993) Identification of the major phosphorylation sites of the Raf-1 kinase. *J Biol Chem* 268:17309-17316.

Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63.

Moss RL, Gu Q (1999) Estrogen: mechanisms for a rapid action in CA1 hippocampal neurons. *Steroids* 64:14-21.

Mosselman S, Polman J, Dijkema R (1996) ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 392:49-53.

Movsesyan VA, Yakovlev AG, Dabaghyan EA, Stoica BA, Faden AI (2002) Ceramide induces neuronal apoptosis through the caspase-9/caspase-3 pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 299:201-207.

Mulnard RA, Cotman CW, Kawas C, van Dyck CH, Sano M, Doody R, Koss E, Pfeiffer E, Jin S, Gamst A, Grundman M, Thomas R, Thal LJ (2000) Estrogen replacement therapy for treatment of mild to moderate Alzheimer disease: a randomized controlled trial. Alzheimer's Disease Cooperative Study. *JAMA* 283:1007-1015.

Murphy DD, Segal M (1996) Regulation of dendritic spine density in cultured rat hippocampal neurons by steroid hormones. *J Neurosci* 16:4059-4068.

Murphy DD, Segal M (1997) Morphological plasticity of dendritic spines in central neurons is mediated by activation of cAMP response element binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:1482-1487.

Muzio M, Stockwell BR, Stennicke HR, Salvesen GS, Dixit VM (1998) An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem* 273:2926-2930.

Nabekura J, Oomura Y, Minami T, Mizuno Y, Fukuda A (1986) Mechanism of the rapid effect of 17 beta-estradiol on medial amygdala neurons. *Science* 233:226-228.

## BIBLIOGRAFÍA

Nagata S (1997) Apoptosis by death factor. *Cell* 88:355-365.

Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J (2000) Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403:98-103.

Nethrapalli IS, Singh M, Guan X, Guo Q, Lubahn DB, Korach KS, Toran-Allerand CD (2001) Estradiol (E2) elicits SRC phosphorylation in the mouse neocortex: the initial event in E2 activation of the MAPK cascade? *Endocrinology* 142:5145-5148.

Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA, . (1995) Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376:37-43.

Nilsson A, Duan RD (1999) Alkaline sphingomyelinases and ceramidases of the gastrointestinal tract. *Chem Phys Lipids* 102:97-105.

Nuydens R, Dispersyn G, Van Den KG, de JM, Connors R, Ramaekers F, Borgers M, Geerts H (2000) Bcl-2 protects against apoptosis-related microtubule alterations in neuronal cells. *Apoptosis* 5:43-51.

Obeid LM, Linardic CM, Karolak LA, Hannun YA (1993) Programmed cell death induced by ceramide. *Science* 259:1769-1771.

Ogawa S, Chan J, Chester AE, Gustafsson JA, Korach KS, Pfaff DW (1999) Survival of reproductive behaviors in estrogen receptor beta gene-deficient (betaERKO) male and female mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:12887-12892.

Ogawa S, Lubahn DB, Korach KS, Pfaff DW (1997) Behavioral effects of estrogen receptor gene disruption in male mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:1476-1481.

Ogawa S, Washburn TF, Taylor J, Lubahn DB, Korach KS, Pfaff DW (1998) Modifications of testosterone-dependent behaviors by estrogen receptor-alpha gene disruption in male mice. *Endocrinology* 139:5058-5069.

Ohga Y, Zirrgiebel U, Hamner S, Michaelidis TM, Cooper J, Thoenen H, Lindholm D (1996) Cell density increases Bcl-2 and Bcl-x expression in addition to survival of cultured cerebellar granule neurons. *Neuroscience* 73:913-917.



Oppenheim RW (1991) Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 14:453-501.

Oppenheim RW, Prevetie D, Yin QW, Collins F, MacDonald J (1991) Control of embryonic motoneuron survival in vivo by ciliary neurotrophic factor. *Science* 251:1616-1618.

Ortiz J, Harris HW, Guitart X, Terwilliger RZ, Haycock JW, Nestler EJ (1995) Extracellular signal-regulated protein kinases (ERKs) and ERK kinase (MEK) in brain: regional distribution and regulation by chronic morphine. *J Neurosci* 15:1285-1297.

Paech K, Webb P, Kuiper GG, Nilsson S, Gustafsson J, Kushner PJ, Scanlan TS (1997) Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science* 277:1508-1510.

Paganini-Hill A (1995) Estrogen replacement therapy and stroke. *Prog Cardiovasc Dis* 38:223-242.

Paganini-Hill A, Henderson VW (1996) Estrogen replacement therapy and risk of Alzheimer disease. *Arch Intern Med* 156:2213-2217.

Pearson H, Graham ME, Burgoyne RD (1992) Relationship Between Intracellular Free Calcium Concentration and NMDA-induced Cerebellar Granule Cell Survival In Vitro. *Eur J Neurosci* 4:1369-1375.

Pedram A, Razandi M, Aitkenhead M, Hughes CC, Levin ER (2002) Integration of the non-genomic and genomic actions of estrogen. Membrane-initiated signaling by steroid to transcription and cell biology. *J Biol Chem* 277:50768-50775.

Pelzer T, Schumann M, Neumann M, deJager T, Stimpel M, Serfling E, Neyses L (2000) 17beta-estradiol prevents programmed cell death in cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 268:192-200.

Petersen DN, Tkalcevic GT, Koza-Taylor PH, Turi TG, Brown TA (1998) Identification of estrogen receptor beta2, a functional variant of estrogen receptor beta expressed in normal rat tissues. *Endocrinology* 139:1082-1092.

## BIBLIOGRAFÍA

Pettersson K, Grandien K, Kuiper GG, Gustafsson JA (1997) Mouse estrogen receptor beta forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor alpha. *Mol Endocrinol* 11:1486-1496.

Pfeffer U, Fecarotta E, Arena G, Forlani A, Vidali G (1996) Alternative splicing of the estrogen receptor primary transcript normally occurs in estrogen receptor positive tissues and cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol* 56:99-105.

Pike CJ (1999) Estrogen modulates neuronal Bcl-xL expression and beta-amyloid-induced apoptosis: relevance to Alzheimer's disease. *J Neurochem* 72:1552-1563.

Price RH, Jr., Handa RJ (2000) Expression of estrogen receptor-beta protein and mRNA in the cerebellum of the rat. *Neurosci Lett* 288:115-118.

Qiu J, Bosch MA, Tobias SC, Grandy DK, Scanlan TS, Ronnekleiv OK, Kelly MJ (2003) Rapid signaling of estrogen in hypothalamic neurons involves a novel G-protein-coupled estrogen receptor that activates protein kinase C. *J Neurosci* 23:9529-9540.

Rabizadeh S, Gralla EB, Borchelt DR, Gwinn R, Valentine JS, Sisodia S, Wong P, Lee M, Hahn H, Bredesen DE (1995) Mutations associated with amyotrophic lateral sclerosis convert superoxide dismutase from an antiapoptotic gene to a proapoptotic gene: studies in yeast and neural cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:3024-3028.

Raff MC, Barres BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD (1993) Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science* 262:695-700.

Rameh LE, Cantley LC (1999) The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. *J Biol Chem* 274:8347-8350.

Ranger AM, Malynn BA, Korsmeyer SJ (2001) Mouse models of cell death. *Nat Genet* 28:113-118.

Raoul C, Pettmann B, Henderson CE (2000) Active killing of neurons during development and following stress: a role for p75(NTR) and Fas? *Curr Opin Neurobiol* 10:111-117.

Ray LB, Sturgill TW (1988) Insulin-stimulated microtubule-associated protein kinase is phosphorylated on tyrosine and threonine in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:3753-3757.

Razandi M, Alton G, Pedram A, Ghonshani S, Webb P, Levin ER (2003a) Identification of a structural determinant necessary for the localization and function of estrogen receptor alpha at the plasma membrane. *Mol Cell Biol* 23:1633-1646.

Razandi M, Pedram A, Park ST, Levin ER (2003b) Proximal events in signaling by plasma membrane estrogen receptors. *J Biol Chem* 278:2701-2712.

Resink A, Villa M, Benke D, Mohler H, Balazs R (1995a) Regulation of the expression of NMDA receptor subunits in rat cerebellar granule cells: effect of chronic K(+)-induced depolarization and NMDA exposure. *J Neurochem* 64:558-565.

Resink A, Villa M, Boer GJ, Mohler H, Balazs R (1995b) Agonist-induced down-regulation of NMDA receptors in cerebellar granule cells in culture. *Eur J Neurosci* 7:1700-1706.

Reyna-Neyra A, Camacho-Arroyo I, Ferrera P, Arias C (2002) Estradiol and progesterone modify microtubule associated protein 2 content in the rat hippocampus. *Brain Res Bull* 58:607-612.

Ricart KC, Fiszman ML (2001) Hydrogen peroxide-induced neurotoxicity in cultured cortical cells grown in serum-free and serum-containing media. *Neurochem Res* 26:801-808.

Riccio A, Ahn S, Davenport CM, Blendy JA, Ginty DD (1999) Mediation by a CREB family transcription factor of NGF-dependent survival of sympathetic neurons. *Science* 286:2358-2361.

Rippo MR, Malisan F, Ravagnan L, Tomassini B, Condo I, Costantini P, Susin SA, Rufini A, Todaro M, Kroemer G, Testi R (2000) GD3 ganglioside directly targets mitochondria in a bcl-2-controlled fashion. *FASEB J* 14:2047-2054.

Rissman EF, Early AH, Taylor JA, Korach KS, Lubahn DB (1997) Estrogen receptors are essential for female sexual receptivity. *Endocrinology* 138:507-510.

## BIBLIOGRAFÍA

Rodriguez J, Jacques-Berg W, Patel AJ (1991) Differential regulation of cerebellar granule neurons by two types of quisqualate receptors. *Neuroreport* 2:517-520.

Rodriguez-Viciano P, Warne PH, Dhand R, Vanhaesebroeck B, Gout I, Fry MJ, Waterfield MD, Downward J (1994) Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* 370:527-532.

Rodriguez-Viciano P, Warne PH, Khwaja A, Marte BM, Pappin D, Das P, Waterfield MD, Ridley A, Downward J (1997) Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras. *Cell* 89:457-467.

Rossomando AJ, Payne DM, Weber MJ, Sturgill TW (1989) Evidence that pp42, a major tyrosine kinase target protein, is a mitogen-activated serine/threonine protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:6940-6943.

Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J (2002) Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 288:321-333.

Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC (1997) The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J* 16:6914-6925.

Rusanescu G, Qi H, Thomas SM, Brugge JS, Halegoua S (1995) Calcium influx induces neurite growth through a Src-Ras signaling cassette. *Neuron* 15:1415-1425.

Ryder EF, Cepko CL (1994) Migration patterns of clonally related granule cells and their progenitors in the developing chick cerebellum. *Neuron* 12:1011-1028.

Sastry PS, Rao KS (2000) Apoptosis and the nervous system. *J Neurochem* 74:1-20.

Savage MJ, Lin YG, Ciallella JR, Flood DG, Scott RW (2002) Activation of c-Jun N-terminal kinase and p38 in an Alzheimer's disease model is associated with amyloid deposition. *J Neurosci* 22:3376-3385.

Sawada H, Ibi M, Kihara T, Urushitani M, Akaike A, Shimohama S (1998) Estradiol protects mesencephalic dopaminergic neurons from oxidative stress-induced neuronal death. *J Neurosci Res* 54:707-719.

Sawada H, Ibi M, Kihara T, Urushitani M, Honda K, Nakanishi M, Akaike A, Shimohama S (2000) Mechanisms of antiapoptotic effects of estrogens in nigral dopaminergic neurons. *FASEB J* 14:1202-1214.

Sawada H, Shimohama S (2000) Neuroprotective effects of estradiol in mesencephalic dopaminergic neurons. *Neurosci Biobehav Rev* 24:143-147.

Schlessinger J (2000) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103:211-225.

Schuchman EH, Desnick RJ (2001) Niemann-Pick disease types A and B: acid sphingomyelinase deficiencies. In: *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. (Scriver CR, Sly WS, Childs B, Beaudet AL, Valle D, Kinzler KW, Vogelstein B, eds), pp 3589-3610. New York: McGraw-Hill, Inc.

Schwarz A, Futerman AH (1996) The localization of gangliosides in neurons of the central nervous system: the use of anti-ganglioside antibodies. *Biochim Biophys Acta* 1286:247-267.

Schwarz A, Futerman AH (1997) Distinct roles for ceramide and glucosylceramide at different stages of neuronal growth. *J Neurosci* 17:2929-2938.

Schweichel JU, Merker HJ (1973) The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* 7:253-266.

Scorrano L, Petronilli V, Di Lisa F, Bernardi P (1999) Commitment to apoptosis by GD3 ganglioside depends on opening of the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem* 274:22581-22585.

Segal M, Murphy DD (1998) CREB activation mediates plasticity in cultured hippocampal neurons. *Neural Plast* 6:1-7.

Segal RA, Takahashi H, McKay RD (1992) Changes in neurotrophin responsiveness during the development of cerebellar granule neurons. *Neuron* 9:1041-1052.

Setalo G, Jr., Singh M, Guan X, Toran-Allerand CD (2002) Estradiol-induced phosphorylation of ERK1/2 in explants of the mouse cerebral cortex: the roles of heat shock protein 90 (Hsp90) and MEK2. *J Neurobiol* 50:1-12.

Shaywitz AJ, Greenberg ME (1999) CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem* 68:821-861.

## BIBLIOGRAFÍA

Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y (1999) Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399:483-487.

Shin CY, Lee YP, Lee TS, Song HJ, Sohn UD (2002) C(2)-ceramide-induced circular smooth muscle cell contraction involves PKC-epsilon and p44/p42 MAPK activation in cat oesophagus. *Mitogen-activated protein kinase. Cell Signal* 14:925-932.

Shughrue PJ, Lane MV, Merchenthaler I (1997) Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 388:507-525.

Singer CA, Figueroa-Masot XA, Batchelor RH, Dorsa DM (1999) The mitogen-activated protein kinase pathway mediates estrogen neuroprotection after glutamate toxicity in primary cortical neurons. *J Neurosci* 19:2455-2463.

Singer CA, Rogers KL, Dorsa DM (1998) Modulation of Bcl-2 expression: a potential component of estrogen protection in NT2 neurons. *Neuroreport* 9:2565-2568.

Singer CA, Rogers KL, Strickland TM, Dorsa DM (1996) Estrogen protects primary cortical neurons from glutamate toxicity. *Neurosci Lett* 212:13-16.

Singh M, Setalo G, Jr., Guan X, Warren M, Toran-Allerand CD (1999) Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase in cerebral cortical explants: convergence of estrogen and neurotrophin signaling pathways. *J Neurosci* 19:1179-1188.

Sjolander A, Yamamoto K, Huber BE, Lapetina EG (1991) Association of p21ras with phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:7908-7912.

Slagsvold HH, Rosseland CM, Jacobs C, Khuong E, Kristoffersen N, Gaarder M, Fallgren AB, Huitfeldt HS, Paulsen RE (2003) High molecular weight DNA fragments are processed by caspase sensitive or caspase independent pathways in cultures of cerebellar granule neurons. *Brain Res* 984:111-121.

Sohrabji F, Miranda RC, Toran-Allerand CD (1995) Identification of a putative estrogen response element in the gene encoding brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:11110-11114.

Song RX, Barnes CJ, Zhang Z, Bao Y, Kumar R, Santen RJ (2004) The role of Shc and insulin-like growth factor 1 receptor in mediating the translocation of estrogen receptor alpha to the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:2076-2081.

Song RX, McPherson RA, Adam L, Bao Y, Shupnik M, Kumar R, Santen RJ (2002) Linkage of rapid estrogen action to MAPK activation by ERalpha-Shc association and Shc pathway activation. *Mol Endocrinol* 16:116-127.

Soto AM, Fernandez MF, Luizzi MF, Oles Karasko AS, Sonnenschein C (1997) Developing a marker of exposure to xenoestrogen mixtures in human serum. *Environ Health Perspect* 105 Suppl 3:647-654.

Spence MW, Burgess JK (1978) Acid and neutral sphingomyelinases of rat brain. Activity in developing brain and regional distribution in adult brain. *J Neurochem* 30:917-919.

Sribnick EA, Ray SK, Banik NL (2006) Estrogen prevents glutamate-induced apoptosis in C6 glioma cells by a receptor-mediated mechanism. *Neuroscience* 137:197-209.

Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES (1996) Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: the Fas/APO-1 protease Mch5 is a CrmA-inhibitable protease that activates multiple Ced-3/ICE-like cysteine proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:14486-14491.

Stein DG (2001) Brain damage, sex hormones and recovery: a new role for progesterone and estrogen? *Trends Neurosci* 24:386-391.

Stennicke HR, Salvesen GS (1998) Properties of the caspases. *Biochim Biophys Acta* 1387:17-31.

Stavis PE, Deecher DC, Suhadolnik L, Mallis LM, Frail DE (1999) Differential effects of estradiol and estradiol-BSA conjugates. *Endocrinology* 140:5455-5458.

Stoica BA, Movsesyan VA, Knoblach SM, Faden AI (2005) Ceramide induces neuronal apoptosis through mitogen-activated protein kinases and causes release of multiple mitochondrial proteins. *Mol Cell Neurosci* 29:355-371.

Stoica BA, Movsesyan VA, Lea PM, Faden AI (2003) Ceramide-induced neuronal apoptosis is associated with dephosphorylation of Akt, BAD, FKHR, GSK-3beta, and

## BIBLIOGRAFÍA

induction of the mitochondrial-dependent intrinsic caspase pathway. *Mol Cell Neurosci* 22:365-382.

Stokoe D, Stephens LR, Copeland T, Gaffney PR, Reese CB, Painter GF, Holmes AB, McCormick F, Hawkins PT (1997) Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. *Science* 277:567-570.

Sturgill TW, Ray LB, Erikson E, Maller JL (1988) Insulin-stimulated MAP-2 kinase phosphorylates and activates ribosomal protein S6 kinase II. *Nature* 334:715-718.

Subramaniam S, Shahani N, Strelau J, Laliberte C, Brandt R, Kaplan D, Unsicker K (2005) Insulin-like growth factor 1 inhibits extracellular signal-regulated kinase to promote neuronal survival via the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase A/c-Raf pathway. *J Neurosci* 25:2838-2852.

Subramaniam S, Strelau J, Unsicker K (2003) Growth differentiation factor-15 prevents low potassium-induced cell death of cerebellar granule neurons by differential regulation of Akt and ERK pathways. *J Biol Chem* 278:8904-8912.

Subramaniam S, Zirrgiebel U, Bohlen Und HO, Strelau J, Laliberte C, Kaplan DR, Unsicker K (2004) ERK activation promotes neuronal degeneration predominantly through plasma membrane damage and independently of caspase-3. *J Cell Biol* 165:357-369.

Sudo S, Wen TC, Desaki J, Matsuda S, Tanaka J, Arai T, Maeda N, Sakanaka M (1997) Beta-estradiol protects hippocampal CA1 neurons against transient forebrain ischemia in gerbil. *Neurosci Res* 29:345-354.

Sugden PH, Clerk A (2000) Activation of the small GTP-binding protein Ras in the heart by hypertrophic agonists. *Trends Cardiovasc Med* 10:1-8.

Sulston JE (1976) Post-embryonic development in the ventral cord of *Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 275:287-297.

Sun XM, MacFarlane M, Zhuang J, Wolf BB, Green DR, Cohen GM (1999) Distinct caspase cascades are initiated in receptor-mediated and chemical-induced apoptosis. *J Biol Chem* 274:5053-5060.



Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397:441-446.

Tang MX, Jacobs D, Stern Y, Marder K, Schofield P, Gurland B, Andrews H, Mayeux R (1996) Effect of oestrogen during menopause on risk and age at onset of Alzheimer's disease. *Lancet* 348:429-432.

Taniwaki T, Yamada T, Asahara H, Ohyagi Y, Kira J (1999) Ceramide induces apoptosis to immature cerebellar granule cells in culture. *Neurochem Res* 24:685-690.

Teixeira C, Reed JC, Pratt MA (1995) Estrogen promotes chemotherapeutic drug resistance by a mechanism involving Bcl-2 proto-oncogene expression in human breast cancer cells. *Cancer Res* 55:3902-3907.

Testi R (1996) Sphingomyelin breakdown and cell fate. *Trends Biochem Sci* 21:468-471.

Tettamanti G, Riboni L (1993) Gangliosides and modulation of the function of neural cells. *Adv Lipid Res* 25:235-267.

Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR, Poirier GG, Salvesen GS, Dixit VM (1995) Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* 81:801-809.

Thomas GM, Huganir RL (2004) MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 5:173-183.

Toman RE, Movsesyan V, Murthy SK, Milstien S, Spiegel S, Faden AI (2002) Ceramide-induced cell death in primary neuronal cultures: upregulation of ceramide levels during neuronal apoptosis. *J Neurosci Res* 68:323-330.

Toran-Allerand CD (1976) Sex steroids and the development of the newborn mouse hypothalamus and preoptic area in vitro: implications for sexual differentiation. *Brain Res* 106:407-412.

## BIBLIOGRAFÍA

Toran-Allerand CD, Guan X, MacLusky NJ, Horvath TL, Diano S, Singh M, Connolly ES, Jr., Nethrapalli IS, Tinnikov AA (2002) ER-X: a novel, plasma membrane-associated, putative estrogen receptor that is regulated during development and after ischemic brain injury. *J Neurosci* 22:8391-8401.

Toran-Allerand CD, Singh M, Setalo G, Jr. (1999) Novel mechanisms of estrogen action in the brain: new players in an old story. *Front Neuroendocrinol* 20:97-121.

Tournier C, Hess P, Yang DD, Xu J, Turner TK, Nimmual A, Bar-Sagi D, Jones SN, Flavell RA, Davis RJ (2000) Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* 288:870-874.

Tournier C, Pomerance M, Gavaret JM, Pierre M (1994) MAP kinase cascade in astrocytes. *Glia* 10:81-88.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:4350-4354.

Troy CM, Rabacchi SA, Hohl JB, Angelastro JM, Greene LA, Shelanski ML (2001) Death in the balance: alternative participation of the caspase-2 and -9 pathways in neuronal death induced by nerve growth factor deprivation. *J Neurosci* 21:5007-5016.

Tsai MJ, O'Malley BW (1994) Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem* 63:451-486.

Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM (1985) Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228:1440-1443.

Tsutsui K, Ukena K, Usui M, Sakamoto H, Takase M (2000) Novel brain function: biosynthesis and actions of neurosteroids in neurons. *Neurosci Res* 36:261-273.

Umansky SR (1982) The genetic program of cell death. Hypothesis and some applications: transformation, carcinogenesis, ageing. *J Theor Biol* 97:591-602.

Uren AG, Pakusch M, Hawkins CJ, Puls KL, Vaux DL (1996) Cloning and expression of apoptosis inhibitory protein homologs that function to inhibit apoptosis and/or bind tumor necrosis factor receptor-associated factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:4974-4978.

Vaccarino FM, Alho H, Santi MR, Guidotti A (1987) Coexistence of GABA receptors and GABA-modulin in primary cultures of rat cerebellar granule cells. *J Neurosci* 7:65-76.

Vallano ML, Lambolez B, Audinat E, Rossier J (1996) Neuronal activity differentially regulates NMDA receptor subunit expression in cerebellar granule cells. *J Neurosci* 16:631-639.

van Dam H, Wilhelm D, Herr I, Steffen A, Herrlich P, Angel P (1995) ATF-2 is preferentially activated by stress-activated protein kinases to mediate c-jun induction in response to genotoxic agents. *EMBO J* 14:1798-1811.

Van de CM, Van Loo G, Pype S, Van Crieckinge W, Van db, I, Molemans F, Fiers W, Declercq W, Vandenabeele P (1998) Identification of a new caspase homologue: caspase-14. *Cell Death Differ* 5:838-846.

Van Loo G, Saelens X, van Gurp M, MacFarlane M, Martin SJ, Vandenabeele P (2002a) The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death Differ* 9:1031-1042.

Van Loo G, Schotte P, van Gurp M, Demol H, Hoorelbeke B, Gevaert K, Rodriguez I, Ruiz-Carrillo A, Vandekerckhove J, Declercq W, Beyaert R, Vandenabeele P (2001) Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. *Cell Death Differ* 8:1136-1142.

Van Loo G, van Gurp M, Depuydt B, Srinivasula SM, Rodriguez I, Alnemri ES, Gevaert K, Vandekerckhove J, Declercq W, Vandenabeele P (2002b) The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differ* 9:20-26.

Vanhaesebroeck B, Leever SJ, Panayotou G, Waterfield MD (1997) Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem Sci* 22:267-272.

Vaudry D, Falluel-Morel A, Basille M, Pamantung TF, Fontaine M, Fournier A, Vaudry H, Gonzalez BJ (2003) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide prevents C2-ceramide-induced apoptosis of cerebellar granule cells. *J Neurosci Res* 72:303-316.

Vaux DL, Weissman IL, Kim SK (1992) Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2. *Science* 258:1955-1957.

## BIBLIOGRAFÍA

Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL (2000) Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102:43-53.

Villalba M, Bockaert J, Journot L (1997) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP-38) protects cerebellar granule neurons from apoptosis by activating the mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) pathway. *J Neurosci* 17:83-90.

Virdee K, Tolkovsky AM (1996) Inhibition of p42 and p44 mitogen-activated protein kinase activity by PD98059 does not suppress nerve growth factor-induced survival of sympathetic neurones. *J Neurochem* 67:1801-1805.

Vogt C. (1842) Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkroete (*Alytes obstetricans*). Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkroete (*Alytes obstetricans*).

Vojtek AB, Hollenberg SM, Cooper JA (1993) Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell* 74:205-214.

Wada R, Tiffit CJ, Proia RL (2000) Microglial activation precedes acute neurodegeneration in Sandhoff disease and is suppressed by bone marrow transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:10954-10959.

Wade CB, Dorsa DM (2003) Estrogen activation of cyclic adenosine 5'-monophosphate response element-mediated transcription requires the extracellularly regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway. *Endocrinology* 144:832-838.

Wagner KW, Engels IH, Deveraux QL (2004) Caspase-2 can function upstream of bid cleavage in the TRAIL apoptosis pathway. *J Biol Chem* 279:35047-35052.

Waltereit R, Weller M (2003) Signaling from cAMP/PKA to MAPK and synaptic plasticity. *Mol Neurobiol* 27:99-106.

Wang Q, Santizo R, Baughman VL, Pelligrino DA, Iadecola C (1999) Estrogen provides neuroprotection in transient forebrain ischemia through perfusion-independent mechanisms in rats. *Stroke* 30:630-637.

Wang XZ, Ron D (1996) Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase. *Science* 272:1347-1349.

Warne PH, Viciano PR, Downward J (1993) Direct interaction of Ras and the amino-terminal region of Raf-1 in vitro. *Nature* 364:352-355.

Waskiewicz AJ, Flynn A, Proud CG, Cooper JA (1997) Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *EMBO J* 16:1909-1920.

Watanabe H, Yamazaki M, Miyazaki H, Arikawa C, Itoh K, Sasaki T, Maehama T, Frohman MA, Kanaho Y (2004) Phospholipase D2 functions as a downstream signaling molecule of MAP kinase pathway in L1-stimulated neurite outgrowth of cerebellar granule neurons. *J Neurochem* 89:142-151.

Watson CS, Pappas TC, Gametchu B (1995) The other estrogen receptor in the plasma membrane: implications for the actions of environmental estrogens. *Environ Health Perspect* 103 Suppl 7:41-50.

Watters JJ, Campbell JS, Cunningham MJ, Krebs EG, Dorsa DM (1997) Rapid membrane effects of steroids in neuroblastoma cells: effects of estrogen on mitogen activated protein kinase signalling cascade and c-fos immediate early gene transcription. *Endocrinology* 138:4030-4033.

Weisblum B, Haenssler E (1974) Fluorometric properties of the bibenzimidazole derivative Hoechst 33258, a fluorescent probe specific for AT concentration in chromosomal DNA. *Chromosoma* 46:255-260.

Weisz A, Rosales R (1990) Identification of an estrogen response element upstream of the human c-fos gene that binds the estrogen receptor and the AP-1 transcription factor. *Nucleic Acids Res* 18:5097-5106.

Weng G, Bhalla US, Iyengar R (1999) Complexity in biological signaling systems. *Science* 284:92-96.

Whitmarsh AJ, Shore P, Sharrocks AD, Davis RJ (1995) Integration of MAP kinase signal transduction pathways at the serum response element. *Science* 269:403-407.

## BIBLIOGRAFÍA

Wigdal SS, Kirkland RA, Franklin JL, Haak-Frendscho M (2002) Cytochrome c release precedes mitochondrial membrane potential loss in cerebellar granule neuron apoptosis: lack of mitochondrial swelling. *J Neurochem* 82:1029-1038.

Willaime S, Vanhoutte P, Caboche J, Lemaigre-Dubreuil Y, Mariani J, Brugg B (2001) Ceramide-induced apoptosis in cortical neurons is mediated by an increase in p38 phosphorylation and not by the decrease in ERK phosphorylation. *Eur J Neurosci* 13:2037-2046.

Willaime-Morawek S, Brami-Cherrier K, Mariani J, Caboche J, Brugg B (2003a) C-Jun N-terminal kinases/c-Jun and p38 pathways cooperate in ceramide-induced neuronal apoptosis. *Neuroscience* 119:387-397.

Willaime-Morawek S, Brami-Cherrier K, Mariani J, Caboche J, Brugg B (2003b) C-Jun N-terminal kinases/c-Jun and p38 pathways cooperate in ceramide-induced neuronal apoptosis. *Neuroscience* 119:387-397.

Williams RW, Herrup K (1988) The control of neuron number. *Annu Rev Neurosci* 11:423-453.

Wise PM, Dubal DB, Wilson ME, Rau SW, Liu Y (2001) Estrogens: trophic and protective factors in the adult brain. *Front Neuroendocrinol* 22:33-66.

Wong JK, Le HH, Zsarnovszky A, Belcher SM (2003) Estrogens and ICI182,780 (Faslodex) modulate mitosis and cell death in immature cerebellar neurons via rapid activation of p44/p42 mitogen-activated protein kinase. *J Neurosci* 23:4984-4995.

Wood KA, Dipasquale B, Youle RJ (1993) In situ labeling of granule cells for apoptosis-associated DNA fragmentation reveals different mechanisms of cell loss in developing cerebellum. *Neuron* 11:621-632.

Wu TW, Wang JM, Chen S, Brinton RD (2005) 17Beta-estradiol induced Ca<sup>2+</sup> influx via L-type calcium channels activates the Src/ERK/cyclic-AMP response element binding protein signal pathway and BCL-2 expression in rat hippocampal neurons: a potential initiation mechanism for estrogen-induced neuroprotection. *Neuroscience* 135:59-72.

Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270:1326-1331.

Xifro X, Malagelada C, Minano A, Rodriguez-Alvarez J (2005) Brief exposure to NMDA produces long-term protection of cerebellar granule cells from apoptosis. *Eur J Neurosci* 21:827-840.

Xing J, Ginty DD, Greenberg ME (1996) Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science* 273:959-963.

Xue L, Murray JH, Tolkovsky AM (2000) The Ras/phosphatidylinositol 3-kinase and Ras/ERK pathways function as independent survival modules each of which inhibits a distinct apoptotic signaling pathway in sympathetic neurons. *J Biol Chem* 275:8817-8824.

Yaffe K, Sawaya G, Lieberburg I, Grady D (1998) Estrogen therapy in postmenopausal women: effects on cognitive function and dementia. *JAMA* 279:688-695.

Yamagishi S, Matsumoto T, Yokomaku D, Hatanaka H, Shimoke K, Yamada M, Ikeuchi T (2003) Comparison of inhibitory effects of brain-derived neurotrophic factor and insulin-like growth factor on low potassium-induced apoptosis and activation of p38 MAPK and c-Jun in cultured cerebellar granule neurons. *Brain Res Mol Brain Res* 119:184-191.

Yang DD, Kuan CY, Whitmarsh AJ, Rincon M, Zheng TS, Davis RJ, Rakic P, Flavell RA (1997) Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene. *Nature* 389:865-870.

Yang X, Chang HY, Baltimore D (1998) Essential role of CED-4 oligomerization in CED-3 activation and apoptosis. *Science* 281:1355-1357.

Yokomaku D, Numakawa T, Numakawa Y, Suzuki S, Matsumoto T, Adachi N, Nishio C, Taguchi T, Hatanaka H (2003) Estrogen enhances depolarization-induced glutamate release through activation of phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase in cultured hippocampal neurons. *Mol Endocrinol* 17:831-844.

Yoshida H, Kong YY, Yoshida R, Elia AJ, Hakem A, Hakem R, Penninger JM, Mak TW (1998) Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. *Cell* 94:739-750.

Yoshimura S, Banno Y, Nakashima S, Takenaka K, Sakai H, Nishimura Y, Sakai N, Shimizu S, Eguchi Y, Tsujimoto Y, Nozawa Y (1998) Ceramide formation leads to

## BIBLIOGRAFÍA

caspase-3 activation during hypoxic PC12 cell death. Inhibitory effects of Bcl-2 on ceramide formation and caspase-3 activation. *J Biol Chem* 273:6921-6927.

Yuan J, Horvitz HR (1992) The *Caenorhabditis elegans* cell death gene *ced-4* encodes a novel protein and is expressed during the period of extensive programmed cell death. *Development* 116:309-320.

Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR (1993) The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 75:641-652.

Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ (1996) Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 87:619-628.

Zhang L, Himi T, Morita I, Murota S (2000) Hepatocyte growth factor protects cultured rat cerebellar granule neurons from apoptosis via the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway. *J Neurosci Res* 59:489-496.

Zhang XF, Settleman J, Kyriakis JM, Takeuchi-Suzuki E, Elledge SJ, Marshall MS, Bruder JT, Rapp UR, Avruch J (1993) Normal and oncogenic p21ras proteins bind to the amino-terminal regulatory domain of c-Raf-1. *Nature* 364:308-313.

Zhang Y, Tounekti O, Akerman B, Goodyer CG, LeBlanc A (2001) 17-beta-estradiol induces an inhibitor of active caspases. *J Neurosci* 21:RC176.

Zhao L, Chen S, Ming WJ, Brinton RD (2005) 17beta-estradiol induces Ca<sup>2+</sup> influx, dendritic and nuclear Ca<sup>2+</sup> rise and subsequent cyclic AMP response element-binding protein activation in hippocampal neurons: a potential initiation mechanism for estrogen neurotrophism. *Neuroscience* 132:299-311.

Zheng CF, Guan KL (1993) Cloning and characterization of two distinct human extracellular signal-regulated kinase activator kinases, MEK1 and MEK2. *J Biol Chem* 268:11435-11439.

Zhou H, Summers SA, Birnbaum MJ, Pittman RN (1998) Inhibition of Akt kinase by cell-permeable ceramide and its implications for ceramide-induced apoptosis. *J Biol Chem* 273:16568-16575.



Zhou Y, Watters JJ, Dorsa DM (1996) Estrogen rapidly induces the phosphorylation of the cAMP response element binding protein in rat brain. *Endocrinology* 137:2163-2166.

Zhu W, Smart EJ (2003) Caveolae, estrogen and nitric oxide. *Trends Endocrinol Metab* 14:114-117.

Zwain IH, Yen SS (1999) Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinology* 140:3843-3852.