

---

UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA  
Facultad de Veterinaria  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética

---



**MECANISMOS IMPLICADOS EN LA PROTECCIÓN  
DE LA APOPTOSIS NEURONAL  
EN CÉLULAS GRANULARES DE CEREBELO  
POR LITIO Y VALPROATO**

**Alfonso Mora Corral**

Edita: Universidad de Extremadura

Servicio de Publicaciones

c/ Pizarro, 8

Cáceres 10071

Correo e.: [publicac@unex.es](mailto:publicac@unex.es)

<http://www.pcid.es/public.htm>

A Guadalupe



## AGRADECIMIENTOS

A Paco, a quien le debo toda mi formación científica. Sin el no sólo no hubiese sido posible esta tesis, si no que no me dedicaría a la investigación.

Quisiera agradecer a Germán el haber sido el director de mi beca durante estos cuatro años. Por su dedicación e interés, incluso cuando estuvo trabajando en Mérida.

A Guadalupe quisiera agradecerle toda su ayuda y todo su apoyo. Por haber estado a mi lado siempre que la he necesitado. Quiero agradecerle especialmente toda la paciencia que ha tenido conmigo.

A Juan Carlos le tengo que agradecer, no sólo su ayuda, indispensable para el funcionamiento diario del laboratorio, sino muy especialmente su amistad.

Quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio el haberme aguantado todo este tiempo: a Nuria, Tino, Ana, Diana, Inés. Especialmente a Belén y a Ara, por todas las horas que hemos pasado juntos en el laboratorio (y fuera de él) y por todas las charlas que hemos tenido (especialmente por las que no tenían nada que ver con los experimentos). Quiero incluir aquí a Susana y a Carlos, que empezaron siendo “los vecinos” y que ya son componentes esenciales del laboratorio de bio-Química.

A Enrique, por que fue el quien empezó con el litio y la ceramida y por que nos sugirió que utilizásemos el valproato.

A José Manuel, por insistirme tanto en que antes que investigadores somos personas. Por mostrarme que si no se es una buena persona es imposible ser un buen científico.

A Dario por recibirme siempre que lo necesité en su laboratorio, por enseñarme todo lo que necesité sobre las quinasas y por sus consejos. Quisiera, además, poder expresar todo mi aprecio a Ana, tanto en lo profesional como por conseguir que Dundee no fuera mas que un barrio de “Mangurria City”.

A toda la “mafia española” de Dundee por acogerme como a uno más: las dos Anas, Mercedes, Ricardito (et al.), Jose, Juanjo. Y como no, a Gareth, Matilde, Axel, Charli, Gopal, Morag, Sheelag, Maria, Pat, Ivonne, Simon por recibirme con los brazos abiertos y enseñarme a hablar escocés y mostrarme los distintos tipos de cervezas escocesas. Gracias a Jane por los anticuerpos y a Helen por los péptidos.

A mis padres y hermanos por todo el interés. Y porque toda su ayuda y su apoyo han sido fundamentales durante estos cuatro años.

A mis amigos, gracias por vuestro interés: Ángel, Cillán, Jose Mari, David, Santi, César, Jorge, Elena, Raúl, Bueso, Francisco, Juanmi. Vuestra amistad ha sido más importante de lo que pensáis para los resultados de esta tesis.

Quiero agradecer a Isabel Fabregat el protocolo para la medida de la actividad caspasa 3.

A Luis y a Tapia por ayudarme con la densitometría.

A Pedro Centeno, por haber sido nuestro traductor jurado particular en ciertas ocasiones.

Al Departamento de Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria quisiera agradecerles el haberme dejado usar el lector de placas ELISA para medir los resultados de las actividades fosfatasa.

Al Vicerrectorado de Investigación de la Universidad de Extremadura, por haber tardado sólo diez meses en entregarme las ayudas para mis estancias en el extranjero.

A la Federación de Jóvenes Investigadores/Precarios ([www.precarios.org](http://www.precarios.org)) por intentar convencer al gobierno de que durante estos cuatro años, en los que he disfrutado de una beca de Formación del Profesorado Universitario del Ministerio de Educación y Cultura, he estado trabajando.

Económicamente, los experimentos han sido subvencionados por los siguientes proyectos: PB95-1227 y PB98-0992 de la D.G.I.C.Y.T., IPR98A003 e IPR00C009 de la Junta de Extremadura y 00/05 de la Consejería de Sanidad.

**a todos ellos, GRACIAS por haber dejado vuestra huella en cada una de las páginas de esta tesis.**

# ÍNDICE

<b>ÍNDICE</b> .....	<b>i</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>iii</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	<b>v</b>
<b>ABREVIATURAS EMPLEADAS</b> .....	<b>vi</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
El fenómeno de la Apoptosis .....	3
Señalización apoptótica en cultivos de células granulares de cerebelo .....	7
Implicación de la Ceramida en las señales proapoptóticas.....	10
Señalización celular a través de las proteína quinasas .....	13
Papel de las proteína fosfatasa en la señalización .....	21
Litio y Valproato como fármacos para el estudio de la Apoptosis.....	25
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>29</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>33</b>
<b>MATERIALES</b> .....	<b>35</b>
Aparatos.....	35
Reactivos .....	35
Cultivo primario de células granulares de cerebelo de rata.....	36
Lisados de células granulares de cerebelo de rata .....	38
Electroforesis y Western Blot.....	39
Medida de la actividad proteína fosfatasa .....	40
<b>MÉTODOS</b> .....	<b>41</b>
Cultivo primario de células granulares de cerebelo de rata.....	41
Medida de la viabilidad celular por reducción del MTT .....	43
Extracción del ADN citoplasmático.....	44
Medida de la acumulación de [ <sup>3</sup> H]CDP-diacilglicerol .....	45
Lisados de células granulares de cerebelo de rata .....	46
Electroforesis y Western Blot.....	46
Medida de la actividad de las proteína quinasas.....	49
Medida de actividad serina/treonina fosfatasa.....	52
Medida de la actividad caspasa 3 .....	53

Preparación de liposomas y medida de la anisotropía de fluorescencia.....	54
Métodos estadísticos.....	55
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>57</b>
Caracterización de las vías de señalización implicadas en la apoptosis neuronal inducida por el medio con baja concentración de potasio .....	59
Protección por el Litio de la apoptosis neuronal inducida por el medio con baja concentración de potasio .....	73
Protección por el Litio de la apoptosis neuronal inducida por la ceramida.....	95
Protección por el Valproato de la apoptosis neuronal inducida por el medio con baja concentración de potasio .....	109
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>125</b>
Apoptosis en los cultivos primarios de células granulares de cerebelo.....	127
Efecto neuroprotector del valproato .....	130
Nueva hipótesis para el efecto neuroprotector del litio .....	132
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>137</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>141</b>



# LISTA DE FIGURAS

Nº		pág.
<b>Introducción</b>		
1.	Esquema general de la apoptosis.....	5
2.	Esquema del papel del metabolismo de los esfingolípidos en la apoptosis.....	11
3.	Esquema de la vía de señalización PI3K/PKB.....	14
4.	Señalización por la familia de las MAPKs.....	16
5.	Esquema de la vía ERK.....	17
6.	Esquema de la vía de JNK.....	19
7.	Esquema de la vía de la p38.....	20
<b>Caracterización de las vías de señalización implicadas en la apoptosis neuronal inducida por el medio con baja concentración de potasio</b>		
8.	Detección de las proteínas efectoras de la apoptosis inducidas por el medio -KCl.....	62
9.	Inducción de la apoptosis en CGC inducida por el medio -KCl.....	63
10.	Implicación de la vía ERK en la apoptosis inducida por el medio -KCl.....	64
11.	Efecto del LY294001 en la viabilidad de las CGC en presencia de 5 µg/ml de insulina.....	65
12.	Efecto de la insulina sobre la apoptosis inducida por el medio -KCl.....	65
13.	Desfosforilación de PKB y GSK3 inducida por el medio -KCl.....	66
14.	Implicación de la vía JNK en la apoptosis inducida por el medio -KCl.....	67
15.	Implicación de la vía p38 en la apoptosis inducida por el medio -KCl.....	68
16.	Fosforilación del factor de transcripción CREB.....	69
<b>Protección por el Litio de la apoptosis neuronal inducida por el medio con baja concentración de potasio</b>		
17.	Protección del litio frente a la apoptosis inducida por el medio -KCl.....	78
18.	Efecto del litio en la actividad caspasa 3.....	79
19.	Bloqueo por el litio de la activación proteolítica de la caspasa 3.....	80
20.	Efecto del inositol en la protección del litio frente a la apoptosis inducida por el medio -KCl.....	81
21.	Efecto del MK801 en la acción del litio.....	81
22.	Efecto de la insulina sobre la acción del Li <sup>+</sup> .....	82
23.	Acción del LY294002 sobre la neuroprotección del litio en medio -KCl con 5 µg/ml de insulina.....	83
24.	Análisis del efecto del litio sobre la actividad PKB.....	83

25. Análisis por western blot del efecto del litio en el grado de fosforilación de la PKB y la GSK3.....	85
26. Efecto del litio sobre las vías de JNK y p38.....	86
27. Efecto del litio sobre las actividades serina/treonina fosfatasa inducidas por el medio -KCl.....	87
28. Efecto de diversos inhibidores de fosfatasas sobre la GSK3.....	88
29. Modelo propuesto para el mecanismo neuroprotector del litio.....	93
<b>Protección por el Litio de la apoptosis neuronal inducida por la ceramida</b>	
30. Efecto de la concentración de C <sub>2</sub> -ceramida en la viabilidad celular.....	99
31. Protección por litio de la muerte inducida por C <sub>2</sub> -ceramida.....	100
32. El Litio evita la fragmentación internucleosomal del ADN causada por la C <sub>2</sub> -ceramida.....	101
33. La protección del litio frente a la C <sub>2</sub> -ceramida no está relacionada con el metabolismo de inositol fosfatos.....	102
34. La inducción de la apoptosis por la C <sub>2</sub> -ceramida no está relacionada con la activación del receptor de NMDA.....	102
35. El litio bloquea la desfosforilación de la PKB inducida por la C <sub>2</sub> -ceramida.....	103
36. El litio bloquea la inhibición de la actividad PKB inducida por la C <sub>2</sub> -ceramida.....	104
37. El litio bloquea la desfosforilación de la GSK3 inducida por la C <sub>2</sub> -ceramida....	105
38. El litio bloquea la activación de la PP2A inducida por la C <sub>2</sub> -ceramida.....	106
<b>Protección por el Valproato de la apoptosis neuronal inducida por el medio con baja concentración de potasio</b>	
39. Protección del valproato frente a la apoptosis inducida por el medio -KCl.....	113
40. Efecto del MK801 en la acción del valproato.....	114
41. Efecto de la insulina sobre la acción del Valproato.....	115
42. Acción del LY294002 sobre la neuroprotección del valproato en medio -KCl con 5 µg/ml de insulina.....	115
43. Efecto del LY294002 en la protección frente a la apoptosis debida a 2 mM de valproato.....	116
44. Efecto del VPA en la anisotropía de fluorescencia de liposomas de lecitina.....	117
45. Efecto del litio y del valproato sobre la apoptosis inducida por ceramida.....	117
46. Análisis del efecto del valproato en la actividad PKB.....	118
47. Acción del VPA sobre la activación proteolítica de la procaspasa 3.....	118
48. Protección del VPA frente a la muerte causada por el EDTA.....	119
49. Efecto de la depleción de los reservorios intracelulares de Ca <sup>2+</sup> sobre la protección por VPA.....	120
<b>Discusión</b>	
50. Hipótesis general de la acción neuroprotectora del Li <sup>+</sup> .....	135

# LISTA DE TABLAS

Nº		pág.
	<b>Introducción</b>	
1.	Clasificación bioquímica de las serina/treonina fosfatasas.....	22
	<b>Materiales y métodos</b>	
2.	Protocolo para la preparación de los geles de poliacrilamida.....	47
3.	Condiciones de los anticuerpos utilizados.....	48
	<b>Caracterización de las vías de señalización implicadas en la apoptosis neuronal inducida por el medio con baja concentración de potasio</b>	
4.	Actividad de RSK.....	64
	<b>Protección por el Litio de la apoptosis neuronal inducida por el medio con baja concentración de potasio</b>	
5.	$V_0$ de la actividad caspasa 3 en la apoptosis inducida por $-KCl$ .....	78
6.	Efecto de diversos inhibidores sobre la neuroprotección del litio.....	82
7.	Efecto <i>in vitro</i> del litio sobre la actividad de la PKB.....	84

## ABREVIATURAS UTILIZADAS

**Ac-DEVD-AMC:** ácido N<sub>2</sub>-acetil-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-metilcumarina.

**ADN:** ácido desoxirribonucleico.

**AMC:** 7-amino-4-metilcumarina.

**APS:** persulfato amónico.

**Ara-C:** arabinósido de citosina.

**ARN:** ácido ribonucleico.

**ARNm:** ácido ribonucleico mensajero.

**ATF-2:** factor de transcripción activador 2.

**ATP:** adenina trifosfato.

**BSA:** albúmina de suero bovino.

**CaM:** calmodulina.

**CAPS:** ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propanosulfónico.

**CDP:** citidina difosfato.

**CDP-DAG:** CDP-diacilglicerol.

**CE<sub>50</sub>:** 50% de la constante efectiva máxima.

**CGC:** células granulares de cerebelo.

**CI<sub>50</sub>:** 50% de la concentración de inhibición máxima.

**c.p.m.:** cuentas por minuto.

**CsA:** ciclosporina A.

**CTP:** citidina trifosfato.

**Da:** daltons.

**DFF:** factor de fragmentación del ADN.

**DIV:** día *in vivo*.

**DME:** medio de Eagle modificado por Dulbecco.

**DMSO:** dimetilsulfóxido.

**DPH:** 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno.

**DTT:** ditioneitol.

**EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético.

**EGTA:** ácido etilenglicol-bis(β-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacético.

**ERK:** quinasa regulada por señales extracelulares.

**FK506BP:** proteínas de unión al FK506.

**GSK3:** glucógenosintasa quinasa 3.

**GST:** glutatión-S-transferasa.

**IGF:** factor de crecimiento similar a la insulina.

**IMPasa:** mio-inositol monofosfatasa.

**JNK:** quinasa del extremo amino-terminal de c-Jun.

**KSR:** quinasa supresora de Ras.

**LY294002:** 2-(4-morfolinil)-8-fenil-4*H*-1-benzopir-4-ona.

**MAPK:** proteína quinasa activada por mitógenos.

**MAPKAPK:** proteína quinasa activada por MAPK.

**MAPKK:** MAPK quinasa.

**MAPKKK:** MAPKK quinasa.

**MEK:** ERK quinasa.

**MOPS:** ácido 4-morfonilpropano-sulfónico.

**MTT:** bromuro de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio.

**NF-κB:** factor nuclear κB.

**NMDA:** N-metil-D-aspartato.

**PABA:** ácido para-aminobenzoico.

**PARP:** poli(ADP-ribosa) polimerasa.

**PC12:** línea celular derivada de un feocromocitoma.

**PDK1:** quinasa dependiente de fosfatidilinositol 1.

**PI3K:** fosfatidilinositol 3-quinasa.

**PIP<sub>3</sub>:** fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato.

**PKA:** proteína quinasa A.

**PKB:** proteína quinasa B.

**PKC:** proteína quinasa C.

**PMSF:** fluoruro de sulfonilfenilmetano.

**p-NPP:** *para*-nitrofenolfosfato.

**PP1:** proteína fosfatasa tipo 1.

**PP2A:** proteína fosfatasa tipo 2A.

**PP2B:** proteína fosfatasa tipo 2B/ calcineurina.

**PP2C:** proteína fosfatasa 2C.

**RSK:** Kinasas de la proteína ribosomal S6.

**SDS:** dodecilsulfato sódico.

**SNC:** sistema nervioso central.

**TEMED:** N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina.

**TNF:** factor de necrosis tumoral.

**VGCC:** canales de calcio regulados por voltaje.

**VPA:** ácido valproico/valproato.

# **INTRODUCCIÓN**

La muerte es una vida vivida. La vida es una muerte que viene.

Jorge Luis Borges.



## El fenómeno de la Apoptosis

La muerte de células individuales dentro de un tejido fue observada por primera vez en vertebrados hace ya más de 40 años en estudios sobre el desarrollo (Glucksman, 1951; Saunders, 1966). A principios de los años 70, Kerr, Wyllie y Curie encontraron que en las células se podían observar dos tipos diferentes de muerte: la bien caracterizada necrosis, y una nueva forma, morfológicamente distinta, a la que llamaron **apoptosis** (Kerr y cols., 1972; Wyllie y cols., 1981). La muerte por necrosis es violenta y se caracteriza por la tumefacción del citoplasma, la ruptura de las membranas celulares y la desintegración de los componentes subcelulares y nucleares. Por otro lado, la apoptosis viene definida por una serie ordenada de eventos que tienen lugar en un mayor periodo de tiempo. Sin embargo, no lo podemos conocer *a priori*, ya que el tiempo requerido para que una célula entre en apoptosis va a venir definido generalmente tanto por el estímulo apoptótico como por el tipo celular (Kidd, 1998).

Durante el proceso de apoptosis, la célula se va a volver más compacta y van a aparecer gran cantidad de invaginaciones en la membrana citoplasmática. Estas invaginaciones finalmente acabarán dando lugar a los cuerpos apoptóticos en los cuales acabarán quedando recludos tanto restos del citoplasma como restos de los distintos de los orgánulos celulares. Por su parte, la cromatina se empieza a condensar y finalmente el ADN se acaba fragmentando. La apoptosis es un proceso activo que conlleva, por parte de la célula, la síntesis de nuevo ARNm, así como de nuevas proteínas que participan en este proceso. Típicamente, la célula se observa heteropicnótica, es decir, condensada y con un núcleo fragmentado y de pequeño tamaño. Finalmente la célula se convertirá en una miríada de fragmentos, cada uno de ellos envuelto por la propia membrana citoplasmática, llamados cuerpos apoptóticos. Esto, finalmente, serán fagocitados por las células que los rodean, evitando así cualquier tipo de respuesta inflamatoria por parte del organismo.

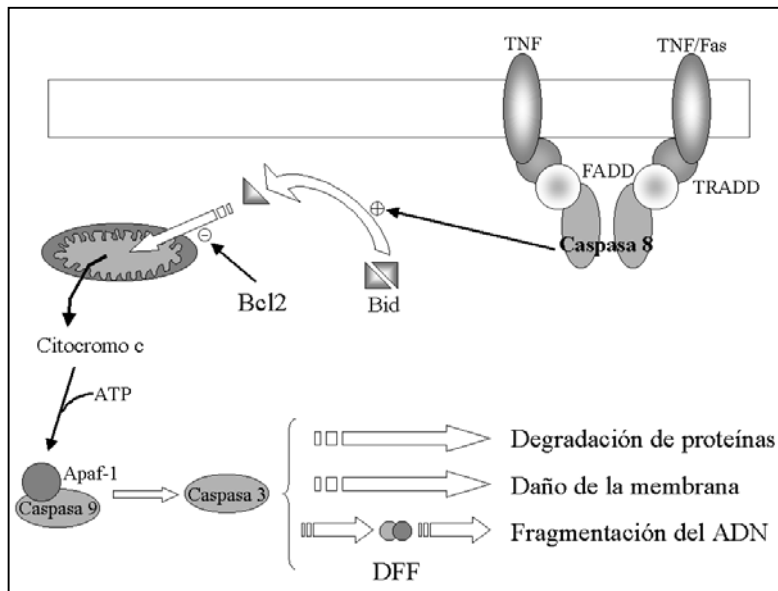
La apoptosis es una cascada ordenada de eventos enzimáticos que va a culminar con la muerte de la célula y con la fragmentación del ADN en los característicos fragmentos internucleosomales. En el caso del sistema nervioso, y en particular de las neuronas, la apoptosis es un tipo de muerte celular programada responsable de la eliminación fisiológica de poblaciones celulares que durante el desarrollo embrionario no han establecido las conexiones adecuadas o bien no disponen de los



suficientes factores tróficos para poder llevar a cabo sus funciones (Wyllie, 1988). Este proceso determina el tamaño y la forma del sistema nervioso de los vertebrados (Kuan y cols., 2000). Se estima que más de la mitad de las neuronas del sistema nervioso central (SNC) de los vertebrados mueren durante el desarrollo embrionario, o bien, en la temprana maduración postnatal vía muerte celular programada (ver revisión de Oppenheim, 1991; Raff y cols., 1993). Durante la vida del adulto, juega un papel fundamental en diversos procesos fisiológicos como son la remodelación de los tejidos, y la ejecución y regulación de la respuesta inmunitaria. Las consecuencias de una incorrecta respuesta apoptótica son graves: la incapacidad de las células de iniciar la apoptosis en respuesta al daño sufrido por el ADN está implicada en el desarrollo y en la progresión del cáncer, mientras que la inapropiada activación del fenómeno apoptótico se ha visto que contribuye al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Barinaga, 1993), el Parkinson o la esclerosis múltiple. Por tanto, no es de extrañar que el proceso apoptótico esté controlado muy rigurosamente las distintas vías de señalización. Además existen una serie de factores que interconectan entre sí las diferentes rutas de señalización, permitiendo una rápida respuesta a los estímulos tanto intra como extracelulares (Pawlowski y Kraft, 2000).

La apoptosis puede inducirse por multitud de efectores: ausencia de factores de crecimiento, hormonas peptídicas específicas (factor de necrosis tumoral  $\alpha$ , ligando de Fas, etc.), cambios en la concentración de calcio, fármacos (estaurosporina, ésteres de forbol, etc.) o daños tanto en el ADN como en la mitocondria. Aunque cada uno de ellos va a actuar en un punto específico de las vías de transducción apoptóticas, todos ellos implican un daño celular que podemos considerar “irreparable”, y al que la célula responde con el inicio del proceso apoptótico.

La principal vía de inducción de apoptosis en mamíferos se descubrió estudiando las propiedades del receptor Fas y su ligando (Itoh y cols., 1991; Watanabe-Fukunaga y cols., 1992). Como se muestra en la figura 1, la vía clásica de la apoptosis se inicia con la interacción específica de un ligando con su receptor (Fas, receptor del TNF) y la subsiguiente activación de una proteasa. Esta proteasa induce la liberación desde la mitocondria del citocromo c, el cual activará a su vez a una serie de proteasas cuya acción acabará destruyendo todas las estructuras celulares.



**Figura 1. Esquema general de la apoptosis.**

Este esquema está dibujado a partir de las descripciones del modelo apoptótico del TNF y del ligando de Fas descritas por Itoh y cols. (1991) y Watanabe-Fukunaga y cols. (1992).

Cuando se estimulan estos receptores, las proteínas que se encuentran asociadas a ellos acaban produciendo la activación de la caspasa 8, la cual tiene actividad proteasa y es la responsable del inicio de la cascada apoptótica típica.

Las **caspasas** son una familia de cisteína proteasas que actúan sobre secuencias específicas que contienen residuos de aspártico (cisteína-aspártico proteasas). Las caspasas participan en una cascada de eventos proteolíticos que producen la alteración de la homeostasis celular y afectan al mecanismo de reparación de enzimas, produciendo los cambios morfológicos característicos de la apoptosis (Marks y Berg, 1999). Existen alrededor de 8 tipos de caspasas, las cuales se dividen en dos grupos: las iniciadoras y las efectoras o ejecutoras. Las caspasas iniciadoras, entre las que se encuentran la 8, 9, 10 y 12, se encuentran estrechamente relacionadas con los componentes iniciales de las cascadas proapoptóticas. Una vez activadas, estas caspasas activan por proteólisis a las llamadas caspasas efectoras, entre las que encontramos a la 3, 6 y 7. Estas, a su vez, proteolizarán a diversas proteínas nucleares y del citoesqueleto, induciendo así el fenómeno de la apoptosis (Budihardjo y cols., 1999).

El mecanismo por el que se activan las caspasas es, además de por proteólisis, por oligomerización. De hecho, la caspasa 8 parece ser que se activa por su asociación con el receptor. La caspasa 3, por ejemplo, se activa al proteolizarse su precursor (el zimógeno procaspasa 3) en dos fragmentos de 17 y 12 kDa que se van a unir y formarán el heterodímero activo. De modo similar, la caspasa 7 se considera también una caspasa efectora, ya que en lugar de activar otras caspasas, proteoliza enzimas importantes para el mantenimiento de la viabilidad y estructura celulares

(MacFarlane y cols., 1997). La caspasa 7 inactiva es proteolizada formando así un heterotetrámero activo compuesto por dos subunidades grandes (20 kDa) y dos pequeñas. Puede ser proteolizada por varias caspasas como la 3, 6, 8 y la 9 (Lippke y cols., 1996; Cohen, 1997; Núñez y cols., 1998). Una vez activada, proteolizará muchos de los sustratos sobre los que actúa la caspasa 3, entre ellos la poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP) (Fernández-Alnemri y cols., 1995; Lippke y cols., 1996).

Igual que ocurre en otros tipos de muerte celular, durante la apoptosis van a producirse una serie de cambios en la mitocondria. Éstos se traducen típicamente en cambios en la permeabilidad de su membrana. A la vez que suceden estos cambios, se produce una salida del citocromo c desde el interior de la mitocondria hasta el citoplasma donde actuará como cofactor necesario para la activación de la caspasa 9.

El hecho de este cambio en la señalización, del citoplasma a la mitocondria, es debido a la proteólisis de Bid por la caspasa 8. Al liberarse el extremo carboxilo de Bid se transloca a la membrana mitocondrial causando la salida del citocromo c de la misma. El citocromo c induce la interacción de la proteína citoplasmática Apaf-1 con la caspasa 9. Cuando esto ocurre, agrupación que se ha dado en llamar apoptosoma, se induce la autoproteólisis y activación de la caspasa 9 (Li y cols., 1997). Esta, a su vez, va a proteolizar a la procaspasa 3, generándose la caspasa 3 activa.

La liberación del citocromo c es un punto crucial en esta ruta. Bid es un miembro de la familia de proteínas de Bcl2 cuyos miembros participan tanto en la inducción de la apoptosis como en su inhibición (Yim, 2000). Bcl2, la proteína que da nombre a esta familia, es un inhibidor de la apoptosis. En su extremo carboxilo contiene una secuencia de anclaje a membranas que se ha visto que se une a las membranas externa mitocondrial, nuclear y de retículo endoplasmático. Impide la liberación del citocromo c, lo que sugiere que puede interaccionar de alguna forma con Bid (Korsmeyer y cols., 2000).

La expresión de Bcl2 impide la apoptosis producida por una gran variedad de estímulos por lo que se piensa que esta proteína está actuando en una de las últimas fases de un mecanismo común de apoptosis (Reed y Paternostro, 1999; Ruvolo y cols., 2001). Sin embargo, en algunos sistemas no funciona como proteína antiapoptótica, por lo que la vía sobre la que actúa, aunque es compartida, no debe ser la única que interviene en el fenómeno de apoptosis (Rossé y cols., 1998; Zhivotovsky y cols., 1998).

La caspasa 3 interviene en lo que se ha dado en llamar fase efectora de la apoptosis. Esta va a producir la proteólisis de diversos sustratos, de los cuales los más relevantes son la PARP y el factor de fragmentación del ADN (DFF). La PARP se ha descrito que está implicada en la reparación del ADN, principalmente en respuesta a estímulos estresantes ambientales (Satoh y Lindahl, 1992). Esta proteína puede ser proteolizada *in vitro* por diversas caspasas (Lazebnik y cols., 1994; Cohen, 1997), siendo además uno de los sustratos *in vivo* de la caspasa 3 (Nicholson y cols., 1995; Tewari y cols., 1995). Su proteólisis se produce a nivel del aspático 214 lo cual separa el extremo amino terminal con capacidad de unión al ADN (24 kDa) del extremo catalítico (89 kDa en rata) (Lazebnik y cols., 1994; Nicholson y cols., 1995). La PARP es muy importante para mantener la viabilidad de la célula, de hecho, su proteólisis facilita la disrupción de la célula, por lo que se emplea como marcador del proceso apoptótico (Oliver y cols., 1998). En cuanto a DFF, es un dímero en el que uno de los monómeros está inhibiendo la actividad ADNasa del otro (Enari y cols., 1998). Al proteolizar la caspasa 3 al dímero de DFF, se libera esta última subunidad que, activa, producirá la degradación del ADN (Liu y cols., 1997).

### **Señalización apoptótica en cultivos de células granulares de cerebelo**

Las neuronas granulares del cerebelo, las principales interneuronas del cerebelo, se encuentran entre los fenotipos neuronales más abundantes del SNC de mamíferos (Ito, 1984a). Estas neuronas emplean el glutamato como su principal neurotransmisor, expresando receptores de glutamato tanto del tipo NMDA como de las otras clases existentes (Garthwaite y cols., 1986; Burgoyne y Cambray-Deakin, 1998). Durante el desarrollo del cerebelo, las neuronas granulares se generan postnatalmente en la capa germinal externa donde se diferencian, migran en unos 3 días a la capa granular y finalmente son inervadas por los axones de las fibras musgosas aferentes (Altman, 1972), las cuales emplean la acetilcolina como principal neurotransmisor (Ito, 1984a y b). A su vez, las neuronas granulares van a inervar a las células de Purkinje, existiendo una estequiometría específica entre ellas y las granulares (Ito, 1984a).

Las neuronas granulares postmitóticas pueden cultivarse *in vitro* plenamente diferenciadas durante varias semanas si son despolarizadas con altas concentraciones

de potasio (25 mM) (Gallo y cols., 1987), o bien si se exponen a aminoácidos excitatorios, que para el caso de los cultivos de células granulares de cerebelo (CGC) serían el glutamato o el NMDA (Balázs y cols., 1988). Por otra parte, si el cultivo se encuentra en condiciones no despolarizantes ( $[K^+] = 5$  mM) las neuronas mueren mediante apoptosis (D'Mello y cols., 1993; Yan y cols., 1994). Dada la relativa homogeneidad de estos cultivos y que la apoptosis se induce de manera sencilla y altamente reproducible, los cultivos primarios de células granulares de cerebelo, y en especial la inducción de la apoptosis mediante la bajada de las concentraciones de  $K^+$ , es uno de los modelos *in vitro* más empleados para el estudio de la apoptosis (Yan y Paul, 1997). Sin embargo, las vías de señalización que regulan la muerte neuronal no se conocen aún con exactitud. Un mejor conocimiento de las señales de transducción que regulan la apoptosis, podría ser de gran utilidad a la hora de descubrir y diseñar nuevas dianas de fármacos para aquellas enfermedades neurológicas en las que se ha descrito la intervención del fenómeno apoptótico.

Se ha visto que la despolarización crónica de la membrana plasmática previene la muerte celular en diferentes tipos de cultivos de neuronas. Este efecto está mediado por el aumento de la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ), el cual entra en el citoplasma a través de una serie de canales de calcio regulados por voltaje (VGCC) (Collins y Lile, 1989; Collins y cols., 1991; Larmer y cols., 1992; Franklin y cols., 1995). Un posible mecanismo por el que esta despolarización de la membrana promovería la supervivencia en los cultivos neuronales, sería la activación de alguna cascada de transducción de un modo similar a las activadas por los factores neurotróficos. De entre estas, las vías MAPK y PI3K/PKB parecen ser uno de los mejores candidatos (Segal y Greenberg, 1996; Kaplan y Miller, 1997).

Miller y cols. (1997) encontraron en células granulares que la despolarización de la membrana plasmática producía una activación de la PI3K y de las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK). En su estudio, la inhibición de la PI3K, aunque no la inhibición de las ERK, provocaba la apoptosis de las células granulares de cerebelo. Estos datos parecen sugerir que la PI3K es el principal mediador de la señal de supervivencia en las neuronas despolarizadas. Sin embargo, en otros estudios con este mismo tipo celular (D'Mello y cols., 1997; Dudek y cols., 1997; Mora y cols., 1999) ésta dependencia de la PI3K no se ha visto tan claramente. Estos resultados contradictorios parecen repetirse con cierta frecuencia en la bibliografía que hemos consultado. Por un lado, la transfección y expresión de mutantes de la de

la proteína quinasa B (PKB), principal enzima de la ruta de la insulina/PI3K, que actúan como formas dominantes negativas no permite la supervivencia promovida por la insulina en cultivos de CGC. Sin embargo, el efecto de la expresión de estos dominantes negativos, como inhibidores de la vía PI3K/PKB, es mucho menos efectivo cuando se trata de bloquear los efectos neuroprotectores en células despolarizadas en presencia de insulina en el medio (Dudeck y cols., 1997).

En otros tipos neuronales se ha visto que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por las concentraciones despolarizantes de  $\text{K}^+$ , activa la vía de las ERK a través de la activación de la calmodulina (CaM) (Egea y cols., 1998; Egea y cols., 1999). Sin embargo, no podemos descartar la vía de la PI3K en nuestros cultivos, ya que la CaM también se ha visto que activa la PI3K (Joyal y cols., 1997; Fisher y cols., 1998) y a la PKB (Yano y cols., 1998), llegándose a correlacionar este efecto activador con la inducción de la supervivencia celular por las concentraciones despolarizantes de potasio (Crowder y Freeman, 1999).

En cultivos de neuronas granulares, la apoptosis inducida por bajada de la concentración de  $\text{K}^+$  (cambio a un medio  $-\text{KCl}$ ) produce, por este orden: síntesis de ARNm y proteínas, activación de las caspasas y generación de especies reactivas de oxígeno (Schulz y cols., 1996). Además, se produce la síntesis y posterior fosforilación de c-Jun (Watson y cols., 1998) y una inactivación de la PI3K y, por tanto, de la proteína quinasa B (PKB) (D'Mello y cols., 1997; Dudek y cols., 1997; Miller y cols., 1997; Shimoke y cols., 1997; Skaper y cols., 1998). De ahí que sea lógico suponer que la fosforilación y activación de la vía PI3K/PKB inhibiera este tipo de apoptosis (Datta y cols., 1997; Dudek y cols., 1997).

Respecto a las especies reactivas de oxígeno, recientes trabajos en otros modelos celulares (Herrera y cols., 2001) están mostrando que su generación parece ser previa al daño mitocondrial y por tanto a la activación de las caspasas efectoras. Sin embargo, este aspecto no ha sido aún demostrado en cultivos de CGC.

En las células granulares de ratón, la activación de las caspasas comienza a las 4 h del cambio al medio con baja concentración de potasio ( $-\text{KCl}$ ) alcanzando los niveles máximos de actividad a la 6 h (Armstrong y cols., 1997), tiempo en el que se puede detectar ya el citocromo c en el citosol (Gleichmann y cols., 2000). En estas primeras 4 h, tanto los inhibidores de la síntesis de proteínas y de ARN, como el potasio usado a concentraciones despolarizantes, previenen la muerte del cultivo así como la fragmentación internucleosomal del ADN (D'Mello y cols., 1993; Galli y

cols., 1995; Nardi y cols., 1997; Watson y cols., 1998). Sin embargo, la apoptosis es ya irreversible en un 50% de las células del cultivo tras 6 h de exposición al medio con baja concentración de potasio ( $-KCl$ ) (Nardi y cols., 1997).

Se ha visto que en CGC de ratón el factor de transcripción E2F-1, el cual juega un papel fundamental en la transición de ciclo  $G_1/S$  (Nevins, 1992; Wu y cols., 1996), modula la apoptosis inducida por la bajada en la concentración de  $K^+$  (O'Hare y cols., 2000). La participación de diversas cascadas de transducción de señales, diferentes a las relacionadas con el ciclo celular, está ya bien establecido para este paradigma apoptótico. Por ejemplo, la activación de la JNK (Watson y cols., 1998) y del ligando de Fas (Green y Red., 1998) se han descrito en CGC sometidas al cambio de medio con bajas concentraciones de  $K^+$ . Por otro lado, las señales que activan a la PI3K (Miller y cols., 1997) o a las MAPK (Bonni y cols., 1999) se ha demostrado que tienen un efecto neuroprotector en este tipo neuronal. La intervención de tantos factores sugiere que en las neuronas se activan simultáneamente diversas cascadas que, aunque sean bioquímicamente diferentes, regulan de una manera complementaria la respuesta a la muerte celular inducida por la bajada en la concentración de  $K^+$ . Por tanto, será de gran importancia comprender como se relacionan todas estas señales para aumentar nuestro conocimiento del modo en el que se regula y controla la muerte neuronal.

### **Implicación de la Ceramida en las señales proapoptóticas**

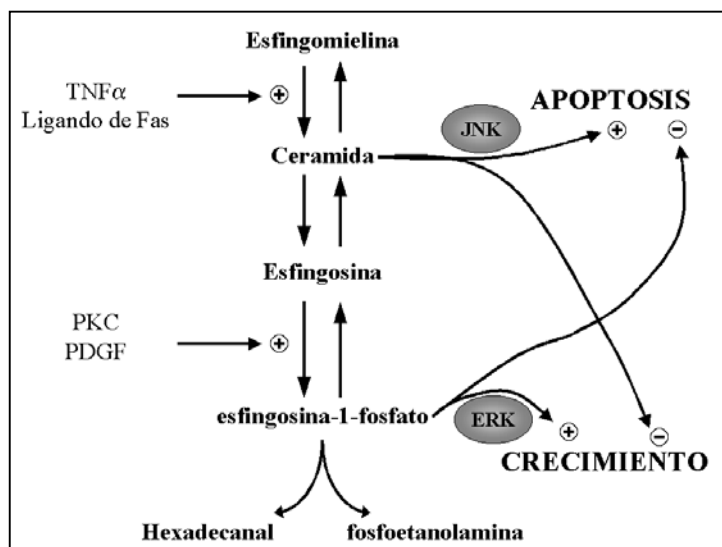
Aunque los mecanismos moleculares exactos implicados en la apoptosis aún no se conocen totalmente, estudios recientes están mostrando evidencias bastante claras de que la activación de las esfingomielinasas neutras y ácidas del lisosoma, con la consiguiente generación de **ceramida**, juega un papel importante en la regulación de la apoptosis en multitud de sistemas (Obeid y cols., 1993; Hannun, 1996; Testi, 1996).

La ceramida es un lípido que actúa a modo de segundo mensajero, siendo un importante componente de las vías activadas por señales de estrés y de las reguladoras de la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis. Se piensa que los efectos de la ceramida en los numerosos procesos celulares en los que participa están mediados a través de su acción sobre diferentes elementos de diversas vías de

transducción, como pueden ser: el NF- $\kappa$ B, la JNK, la proteína quinasa activada por ceramida y la proteína fosfatasa activada por ceramida (Ip y Davis, 1998; Hannun, 1996; Haimovitz-Friedman y cols., 1997; Verheij y cols., 1996; Dbaiibo y cols., 1997). Además del TNF, existen una gran variedad de estímulos y agentes extracelulares que activan la esfingomielinasas y, por tanto, aumentan los niveles de ceramida intracelular: drogas quimioterapéuticas, choque térmico, estrés oxidativo, radiaciones ultravioletas e ionizantes, así como hormonas, algunas citoquinas y la carencia de factores de crecimiento (Ip y Davis, 1998; Hannun, 1996; Haimovitz-Friedman y cols., 1997; Merrill y cols., 1997). De hecho, existe una fuerte correlación entre la producción de ceramida y la inducción de muerte celular (Verheij y cols., 1996; Bose y cols., 1995).

Los niveles de ceramida intracelulares están regulados por el equilibrio existente entre su anabolismo y su catabolismo, en el que intervienen multitud de enzimas, entre ellas: las esfingomielinasas, la ceramidasintasa, las ceramidasa, la ceramida quinasa, la esfingomielinasintasa y la glucosilceramidasa (Verheij y cols., 1996). Los efectos de la generación de ceramida dentro de las células dependerán de la especificidad con la que se activa alguna de las esfingomielinasas, de la magnitud y de la duración de la señal, así como de la existencia de otras vías de transducción que regulen la respuesta celular frente al estrés (Figura 2).

Se sabe además, que los análogos permeables de la ceramida, al igual que los agentes que estimulan su producción, inducen la apoptosis en gran variedad de tipos celulares, entre otros: células endoteliales, fibroblastos, células de feocromocitoma (PC12) y oligodendrocitos (Obeid y cols., 1993; Verheij y cols., 1996; Casaccia-



**Figura 2. Esquema del papel del metabolismo de los esfingolípidos en la apoptosis.** Los efectores que estimulan (•) la producción de ceramida inducen la apoptosis a través de la vía JNK. Por otro lado la estimulación de la esfingosina quinasa activa la vía ERK con lo que se evita la apoptosis. Basado en el esquema descrito por Verheij y cols., (1996).



Bonnefil y cols., 1996; Suzuki y cols., 1997; Hartfield y cols. 1997). Estas observaciones pueden corresponderse con la existencia de un sistema de señalización ubicuo en el que la ceramida actuaría como segundo mensajero de los receptores de la membrana plasmática y de las señales de estrés celular que llevarían a la estimulación del fenómeno apoptótico.

Como la supervivencia y la muerte celulares se encuentran probablemente en un delicado equilibrio de señalizaciones, se considera que la acción apoptótica de la ceramida puede deberse a la estimulación de las señales proapoptóticas, a la inhibición de las vías antiapoptóticas, o bien a ambos procesos a la vez (Zhou y cols., 1998). De hecho, se ha descrito para la ceramida un efecto activador tanto para proteína quinasas (Zhang y cols., 1997) como para proteína fosfatasa similares a la 2A (Dobrowsky y Hannun, 1992; Dobrowsky y cols., 1993; Law y Rossie, 1995; Chalfant y cols., 1999). También se ha visto que la ceramida inactiva a determinados miembros de la familia de la PKC (como la  $\alpha$ ) (Jones y Murray, 1995; Lee y cols., 1996) mientras que activa a otros (como la  $\zeta$ ) (Lozano y cols., 1994; Sawai y cols., 1997). Además, uno de los mecanismos por los que la ceramida impide la proliferación celular sería a través de la proteína fosfatasa activada por ceramida que comparte ciertas características con la serina/treonina fosfatasa 2A (Dbalbo y cols., 1995).

Recientes trabajos están mostrando las vías proapoptóticas que se activan por la ceramida. Se ha descrito que, tanto la esfingomielinasa exógena como la adición de C<sub>2</sub>-ceramida, inducen una rápida estimulación de la vía JNK (Westwick y cols., 1995). Además promueve la desfosforilación de la proteína antiapoptótica Bcl-2, lo cual bloquea sus efecto inductor de supervivencia (Ruvolo y cols., 1999), así como de la proteína proapoptótica Bad, con lo que impide su degradación (Basu y cols., 1998; Zundel y Giaccia, 1998). Se ha propuesto que la acción de la ceramida sobre Bcl-2 sería mediada por la citada proteína fosfatasa activada por ceramida, mientras que la desfosforilación de Bad lo sería por la activación de la quinasa supresora de Ras (KSR) con la subsiguiente activación de MEK1 y de la MAPK, lo cual disminuiría la activación de la PKB (Basu y cols., 1998).

Esta acción sobre la PKB se enmarcaría entre los efectos de la ceramida como inhibidora de señales proapoptóticas. En esta línea se encuentran los resultados que presentan a la ceramida como un regulador negativo de la PI3K. Aunque en principio se vio que la ceramida inhibía de forma específica a la PI3K, lo que provocaba que

no se activara sus sustratos, entre ellos la PKB (Zundel y Giaccia, 1998), otros grupos han descrito un efecto inhibitor de la actividad de la PKB sin que la PI3K se vea afectada (Basu y cols., 1998; Zhou y cols., 1998; Summers y cols., 1998).

### Señalización celular a través de las proteína quinasas

A finales de los años cincuenta, Edwin Krebs y Edmond Fischer describieron la primera secuencia de fosforilaciones proteicas reversibles en una cascada de transducción de señales, en su caso la señalización glucogenolítica inducida por la adrenalina (Fischer y Krebs, 1966). A partir de ese momento se ha visto como la fosforilación proteica, por activación de una o más proteína quinasas, controla los mecanismos de señalización celular, habiéndose descrito ya más de 100 proteína quinasas diferentes en las células de vertebrados (Mathews y van Holde, 1998).

Muchas hormonas proteicas, llamadas factores de crecimiento, estimulan la proliferación y la diferenciación de sus células diana al unirse a receptores de membrana con actividad tirosina quinasa. Esta activación iniciará una cascada de señalización celular compuesta fundamentalmente por proteína quinasas que acabará en la modulación de la expresión de determinados genes. Además de activar señales mitogénicas, los factores de crecimiento estimulan señales antiapoptóticas o de supervivencia celular. Así, van a regular el equilibrio existente entre proliferación y muerte celular. Aunque ya se han descrito muchos de los mecanismos involucrados en la proliferación celular, todavía queda bastante por conocerse sobre las rutas de señalización que conducen a la supervivencia celular (Ushio-Fukai y cols., 1999).

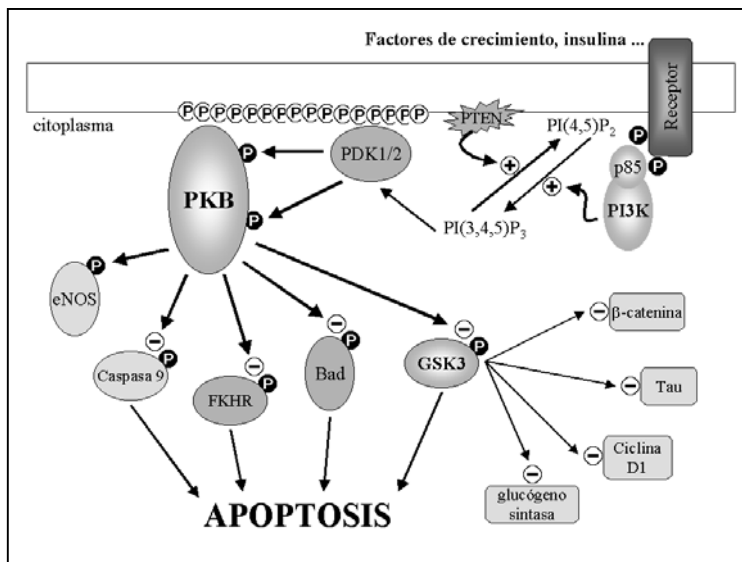
#### LA VÍA PI3K/PKB:

Tanto en neuronas como en otros tipos celulares, se ha comprobado la gran relevancia de la fosfatidilinositol 3-quinasa (**PI3K**) en la regulación de la supervivencia inducida por esos factores de crecimiento. La PI3K parece ser una de las enzimas claves a la hora de la regulación de diversos procesos celulares, entre ellos la supervivencia y la proliferación de multitud de sistemas celulares. De hecho, los inhibidores de la PI3K bloquean la supervivencia inducida por el IGF-1 en las

neuronas granulares de cerebelo (D'Mello y cols., 1997; Dudek y cols., 1997; Miller y cols., 1997).

La vía de señalización de la PI3K media gran cantidad de respuestas celulares tras su activación por factores de crecimiento peptídicos o por hormonas. La desregulación de esta vía está relacionada con enfermedades como el cáncer o la diabetes en humanos, y su importancia en la biología de la célula se pone de manifiesto por el hecho de intervenir en la muerte y en la supervivencia celular, así como en otras funciones celulares fundamentales como son: el crecimiento, la motilidad, la diferenciación o las acciones de la insulina (Marte y Downward, 1997). Su amplio abanico de acciones se debe a que activa múltiples vías de transducción secundarias. Uno de los grupos de enzimas que parecen más importantes es la superfamilia AGC de serina/treonina quinasas (llamadas así al incluir a las proteína quinasas A, G y C), conocidas desde hace tiempo por formar parte importante de la maquinaria celular de transducción de señales (Alessi, 2001). Las quinasas de esta superfamilia poseen alrededor de un 40% de homología en su dominio catalítico. Para ser activadas necesitan fosforilarse en un residuo altamente conservado en todas ellas que se sitúa en el extremo carboxilo en una región que se ha denominada lazo T ("T-loop") (Vanhaesebroeck y Alessi, 2000).

Como viene indicado en la figura 3, la siguiente enzima participante en la vía de la PI3K es la quinasa dependiente de fosfatidilinositol (**PDK1**). Esta quinasa posee un dominio PH que es el causante de que se encuentre en la membrana plasmática unida al fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato ( $PIP_3$ ) generado por la actividad de la PI3K. Así, tras la activación de esta vía, se produce la translocación de la PKB a la



**Figura 3. Esquema de la vía de señalización PI3K/PKB.** Tras la estimulación de un receptor tirosina quinasa la estimulación de la PI3K induce la translocación de la PKB a la membrana y su posterior activación (•) por fosforilación.

membrana a la que se une por su dominio PH al igual que lo hace la PDK1. Esta última, al localizarse en la membrana junto a la PKB va a fosforilarla en el residuo de treonina 308 induciendo así su activación (Alessi, 2001). La enzima responsable de la fosforilación de la PKB en el residuo de serina 473, se ha denominado PDK2, pero no ha sido todavía identificada ni clonada.

Una de las enzimas activadas por la producción de PIP<sub>3</sub> por parte de la PI3K, es la **PKB**, la cual es la intermediaria en las señales de supervivencia inducidas por la PI3K (ver revisión de Marte y Downward, 1997). La activación de la PKB por la PI3K (Figura 3) y la subsiguiente inducción de la degradación por fosforilación de la proteína proapoptótica Bad es el mecanismo propuesto para la acción antiapoptótica de la vía PI3K/PKB (Datta y cols., 1997; del Peso y cols., 1997). Sin embargo, también se ha visto (Scheid y Duronio, 1998) que la señal de supervivencia de la PI3K puede ser independiente de la fosforilación de Bad, de ahí que se sugiera que la PI3K pueda actuar sobre diversos componentes de la cascada apoptótica. De hecho, además de a Bad, la PKB fosforila e inactiva a diversos componentes celulares que estarían implicados en la apoptosis: los factores de transcripción Forkhead (FKHR) (Brunet y cols., 1999; Kos y cols., 1999), la GSK3 (Cross y cols., 1995) y la caspasa 9 (Rommel y cols., 1999).

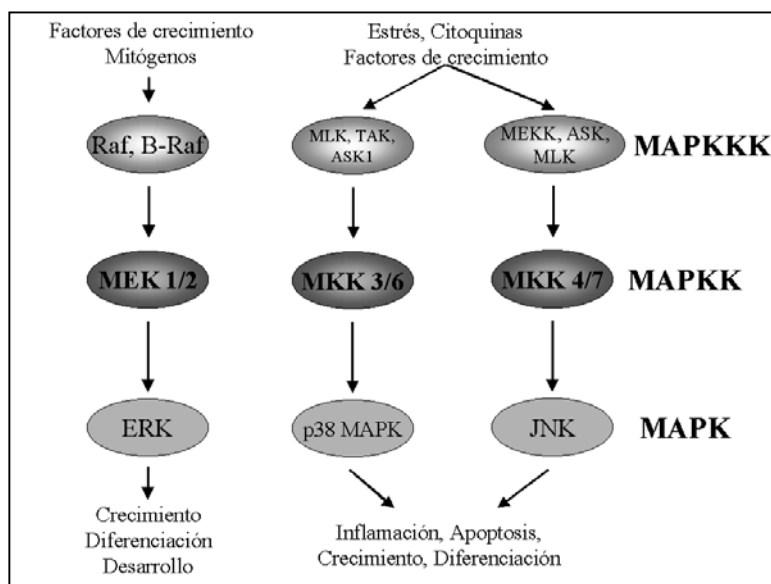
La glucógeno sintasa quinasa 3 (**GSK3**) fue inicialmente identificada como la enzima responsable de la regulación por la insulina de la síntesis de glucógeno (Welsh y cols., 1996). Esta proteína quinasa se expresa ubicuamente e inhibe por fosforilación a la glucógeno sintasa. La GSK3, que es un elemento fundamental de la vía de supervivencia PI3K/PKB, es inhibida por la PKB, la cual la fosforila en la serina 21 en la GSK3 $\alpha$  y en la serina 9 en la GSK3 $\beta$ , siendo las fosforilaciones de estos residuos el principal sitio de regulación por inhibición de esta proteína (Cross y cols., 1995; Srivastava y cols., 1999). La GSK3 se encuentra implicada tanto en la regulación del ciclo celular de *Dictyostelium*, como en el desarrollo de *Drosophila* y *Xenopus* (Nusse y cols., 1997). Además, regula la proteólisis y la localización subcelular de la ciclina D1 (Diehl y cols., 1998). Respecto a su papel en la apoptosis, se ha descrito que la sobreexpresión de formas constitutivamente activas de la GSK3  $\beta$  facilitan el proceso apoptótico en distintos sistemas neuronales (Bijur y cols., 2000). De su importancia en la apoptosis neuronal también da cuenta el hecho de que la empresa farmacéutica Glaxo-SmithKlein ha desarrollado inhibidores específicos

de la GSK3 que protegen frente a la apoptosis inducida por el cambio al medio con bajas concentraciones de potasio en CGC (Cross y cols., 2001).

### LA VÍA DE ERK:

Las proteína quinasas activadas por mitógenos (**MAPK**) son una familia de serina/treonina proteína quinasas ampliamente conservadas, que son activadas en la respuesta celular frente a una gran variedad de estímulos extracelulares (Su y Karin, 1996; Garrington y Johnson, 1999) (Figura 4). Se activan por la doble fosforilación en los residuos de treonina y de tirosina. Esta fosforilación está catalizada por una MAPK quinasa (MAPKK) que, a su vez, es fosforilada y activada por una serina/treonina quinasa llamada MAPKK quinasa (MAPKKK) (Nishida y Gotoh, 1993; Davis, 1994; Cobb y Goldsmith, 1995; Kyriakis y Avruch, 1996). Estas MAPKKK se activan al interactuar con proteínas de la familia de las pequeñas GTPasas y/o con otras proteína quinasas, conectando así el bloque de MAPK con el receptor de membrana o con estímulo externo. Las MAPK se agrupan en tres grandes grupos: ERK, JNK y p38 MAPK.

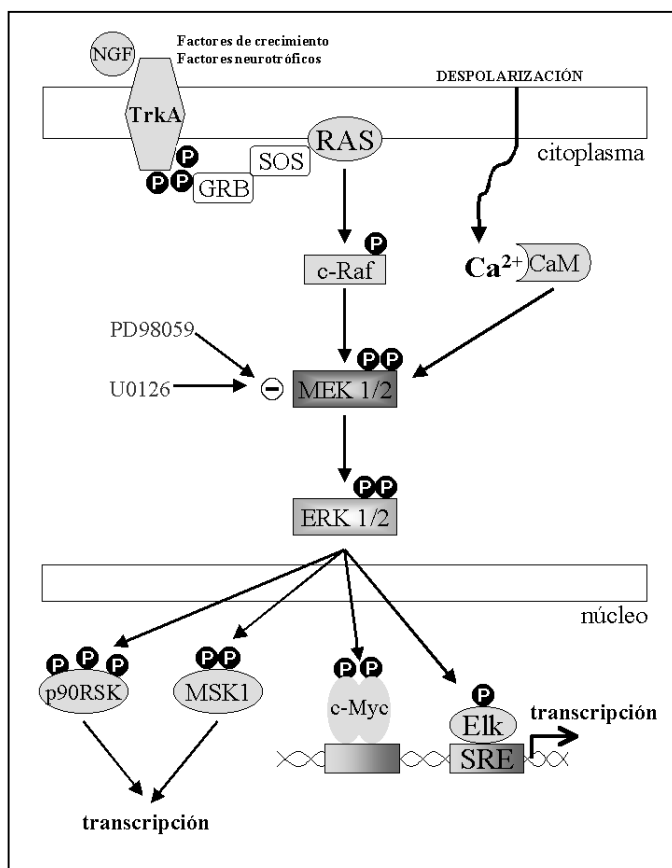
Las rutas de las quinasas **ERK** se suelen activar principalmente por diversos factores de crecimiento e intervienen en la progresión del ciclo celular y en el crecimiento celular en una gran variedad de paradigmas celulares (Nishida y Gotoh, 1993; Davis, 1994; Cobb y Goldsmith, 1995; Kyriakis y Avruch, 1996). Se activan mediante una cascada conocida de transducción en la cual participan las proteínas Shc, Grb2, Ras, Raf y las MEK (Garrington y Johnson, 1999; Vojtek y Der, 1998).



**Figura 4. Señalización por la familia de las MAPKs.** Los diferentes componentes de estas rutas se van activando por fosforilación. Los estímulos externos activan a las MAPKKK las cuales, a su vez, fosforilan a las MAPKK que activarán a las MAPK.

Esta cascada de transducción (Figura 5) se inicia generalmente por la interacción de un factor trófico con su correspondiente receptor con actividad tirosina quinasa, produciéndose la autofosforilación del receptor. La fosforilación de los receptores activa Ras por un mecanismo en el que es preciso que se fosforile en tirosina Shc (ver revisión de Segal y Greenberg, 1996). La capacidad de Shc de activar Ras está mediada por su asociación con las proteínas Grb2 y Sos. En la vía de señalización de Ras, la fosforilación de c-Raf 1 activa la ERK1 o 2 a través de la activación de MEK1 o MEK2, respectivamente. Esto lleva a la posterior translocación de las ERK al núcleo. Allí, van a fosforilar a una serie de factores de transcripción, entre los que se encuentran Elk-1, Stat3 y ATF-2. Además, una vez en el núcleo también pueden activar la transcripción mediante la fosforilación de otras quinasas como p90RSK y MSK (Figura 5).

Está claramente demostrado que los factores que promueven la supervivencia de células granulares de cerebelo maduras (despolarización, IGF) activan las ERK. Sin embargo, su inhibición con PD98059 no afecta a la supervivencia de los cultivos, mientras que si lo hacen los inhibidores de la PI3K, por lo que parece que la vía realmente significativa a la hora de promover viabilidad no sería de la del ERK sino la de la PI3K/PKB (Miller y cols., 1997). De hecho, la despolarización de la



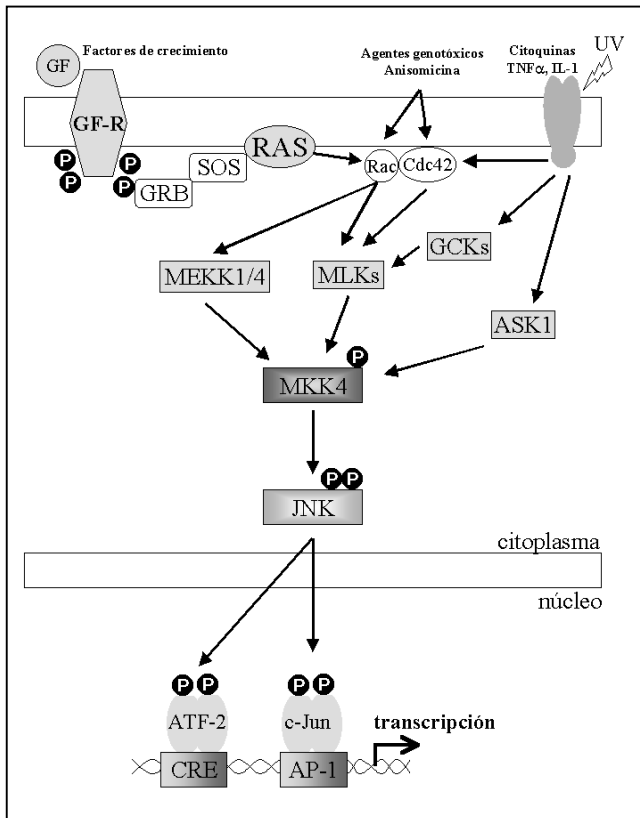
**Figura 5. Esquema de la vía ERK.** Las diferentes quinasas se activan por fosforilación. Se muestra el lugar de inhibición (•) de los fármacos PD98059 y U0126.

membrana, induce a través de la CaM la activación tanto de las ERK1 y 2 (Egea y cols., 1998; Egea y cols., 1999) como de la PI3K (Joyal y cols., 1997).

Aunque el efecto de las MAPK en las células nerviosas pudiera parecer, en principio, una activación paralela a la de la PI3K/PKB y sin una verdadera acción sobre la viabilidad celular, existen datos que nos indican que debemos tener en cuenta esta vía aunque sea con una implicación distinta en la señalización celular. Los datos a los que nos referimos muestran que durante la diferenciación a neuronas de determinadas líneas celulares, el IGF (típico activador de la vía PI3K) estaría modulando el desarrollo de los axones y dendritas a través de la vía de las ERK (Kim y cols., 1997). Esto hace pensar que esta vía de transducción estaría principalmente implicada en la maduración de las neuronas y que la PI3K tendría un papel fundamental en la posterior viabilidad de las neuronas ya maduras. A este respecto, se ha visto en cultivos de CGC de ratón, que la expresión de los receptores GABAérgicos, que se produce durante la maduración de este tipo celular, está modulado por la vía de la ERK (Bulleit y Hsieh, 2000).

#### LA VÍA DE JNK:

Tanto las citoquinas inflamatorias como diversos tipos de estrés ambiental (choque osmótico, radiación ultravioleta, etc.), son capaces de estimular las actividades de la familia de proteína quinasas activadas por estrés o **JNK** así como las de un grupo de quinasas descrito más recientemente: el de la **p38** (Han y cols., 1994). Ambos grupos parecen estar implicados en la detención del ciclo celular y en la apoptosis (Davis, 1994; Cobb y Goldsmith, 1995; Kyriakis y Avruch, 1996). La JNK es fosforilada y activada por las MKK 4 y 7, y la p38 por las MKK 3, 4 y 6. La activación de la JNK induce la fosforilación de diversos factores de transcripción que regulan genes de expresión temprana: c-Jun, Elk-1 y ATF-2 (Gupta y cols., 1996; Woodgett y cols., 1995). La radiación ultravioleta, las citoquinas y diversos tipos de estrés ambiental se encuentran entre los potenciales inductores de la vía de JNK (Kyriakis y cols., 1994; Derijard y cols., 1994; Lee y cols., 1994) (Figura 6). Como ocurre con las otras proteína quinasas, existe un grupo de MAPKKK: en este caso las MEKK1 a 4, o bien algún miembro de una familia de quinasas llamadas MLK. Las señales de estrés activarán a pequeñas GTPasas o a alguna proteína de la familia Rho (Rac, Rho, Cdc42). Tanto la Rac1 como la Cdc42 estimulan a las MEKKs y a las



**Figura 6. Esquema de la vía de JNK.** Las diferentes quinasas se van activando al ser fosforiladas por las anteriores. Los diversos tipos de estrés, así como las citoquinas inflamatorias, van a acabar induciendo la expresión de genes determinados.

MLKs. Además MKK4 y 7 pueden ser activadas, independientemente de las GTPasas, por alguna de las GCK quinasas (Rao, 2001).

Además de a los anteriores factores de transcripción descritos, la familia de las JNK fosforila a una gran variedad de sustratos citoplasmáticos como puedan ser proteínas del citoesqueleto, la p53, Bcl-2 y al receptor de glucocorticoides. Alguno de estos sustratos tiene una importante función fisiológica y están implicados en los fenómenos de apoptosis en el SNC (Mielke y Herdegen, 2000).

Las JNK pueden incrementar la fosforilación de la proteína asociada a los microtúbulos tau, lo cual parece ser uno de los fenómenos típicos de las enfermedades neurodegenerativas, como pueda ser la enfermedad de Alzheimer (Reynolds y cols., 1997). Además fosforila las cadenas pesadas de los neurofilamentos con el consiguiente incremento de la vulnerabilidad al estrés de las neuronas (Giasson y Mushynski, 1997). En el sistema que vamos a emplear en esta tesis, cultivos de CGC, se ha descrito que la inhibición de las actividades de la PI3K y de la PKB aumenta la actividad de las JNK e induce apoptosis (Shimoke y cols., 1999).

Por otro lado se ha descrito que JNK tiene un efecto opuesto a la protección causada por la proteína Bcl-2 (Park y cols., 1997), posiblemente por la fosforilación de la misma (Maudrell y col., 1997). Además, JNK estabiliza y activa al supresor

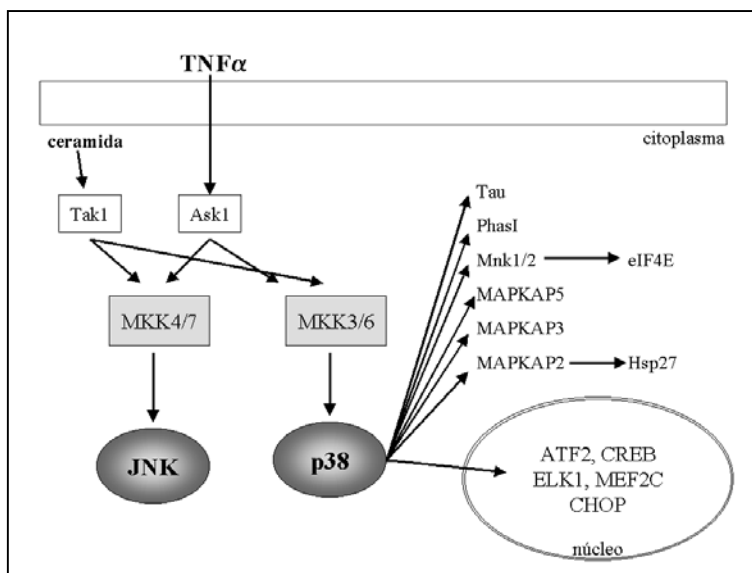


tumoral p53 (Fuchs y cols., 1998), un factor de transcripción proapoptótico que impide la inducción del gen *bcl-2* a la vez que incrementa la del gen *bax* (Miyashita y cols., 1994). En sistema nervioso, la proteína p53 actúa con posterioridad a la activación de JNK en la regulación del proceso de muerte celular de neuronas del sistema simpático (Aloyz y cols., 1998). Sin embargo, en fibroblastos, c-Jun regula negativamente la transcripción de p53 (Schreiber y cols., 1999), por lo que no está todavía muy claro si la acción represora se debe a que no se produce la fosforilación del extremo amino terminal de c-Jun o si, por el contrario, la activación de p53 mediada por JNK se debe a c-Jun.

### LA VÍA DE p38:

Aunque muchas MAPKK quinasas, incluyendo MEKK 1, 2, 3 y 4, MAPKKK 5 y 6, inducen una activación de las cascadas de la JNK y/o de la p38 (Figura 7), la conexión entre las MAPKKK con las MAPKK es más compleja de lo que en principio es la conexión entre las MAPKK y las MAPK. La **p38** sólo se ve activada por MKK3 y MKK6, mientras que tanto MKK3 como MKK4 pueden activar *in vitro* a la JNK (Davis, 1994; Derijard y cols., 1995). Sin embargo, todavía no está claro si la interconexión entre las vías JNK y p38 a través de la MKK4 tiene alguna significación *in vivo*.

Al igual que la JNK, la p38 se activa por estreses ambientales (Raingeaud y cols., 1995), en particular por el choque osmótico (Matsuda y cols., 1995; Galcheva-Gargova y cols., 1994; Brewster y cols., 1993), y regula a diversos factores de



**Figura 7. Esquema de la vía de la p38.** Se muestra además la interconexión existente con la vía JNK. Como se representa en el esquema, la p38 puede actuar directamente al fosforilar sus substratos o por su acción sobre determinados factores de transcripción.

transcripción: ATF-2, Elk-1 y CHOP (Whitmarsh y cols., 1997; McCormick, 1996). Además, la p38 puede activar a las siguientes proteína quinasas: MAPKAP quinasas 2 y 3, y a la proteína quinasa activada/regulada por p38 (Rouse y cols., 1994; New y cols., 1998; McLaughlin y cols., 1996).

### **Papel de las proteína fosfatasas en la señalización**

Como hemos visto, la fosforilación de proteínas juega un papel muy importante en la regulación de gran cantidad de procesos celulares: diferenciación, división celular, metabolismo, contracción muscular, fecundación y en la memoria. Todas estas señales están muy bien reguladas por el equilibrio existente entre las actividades de proteína quinasas y proteína fosfatasas. De ahí que las proteína fosfatasas tengan tanta importancia como las proteína quinasas a la hora de regular las vías de transducción de señales.

Una de las primeras aproximaciones al estudio funcional de este tipo de enzimas es su división en dos grandes grupos funcionales. Según el residuo sobre el que actúen podemos dividir a las proteína fosfatasas en tirosina fosfatasas o en serina/treonina fosfatasas. La mayor importancia de las **tirosina fosfatasas** radica en que regulan el grado de fosforilación de los receptores con actividad tirosina quinasa, la mayoría de los que hemos visto que inician las cascadas de señalización. Este tipo de receptores son los principales implicados en la señalización de las comunicaciones intercelulares tanto durante el desarrollo como en organismos ya adultos, e incluso en algunos procesos patológicos (Östman y Böhmer, 2001). Sin embargo, como hemos visto en el apartado anterior nuestro principal foco de atención van a ser las rutas en las que se encuentran principalmente implicadas las serina/treonina quinasas, y por tanto nuestro mayor interés radicará en la regulación que llevan a cabo sobre estas vías las serina/treonina fosfatasas.

En la tabla 1 se muestran los distintos tipos de **serina/treonina fosfatasas**, basándonos en la clasificación bioquímica inicial realizada por Philip Cohen (1994), incluyendo, además, otras fosfatasas que han sido clonadas y secuenciadas recientemente.

Tabla 1. Clasificación bioquímica de las serina/treonina fosfatasas.

	SUSTRATOS <i>in vitro</i>	INHIBIDORES	ACTIVADORES	CATIONES DIVALENTES	ESTRUCTURA CUATERNARIA
<b>PP1</b>	Subunidad $\beta$ de la fosforilasa quinasa Glucógeno ssintasa p-NPP Histona	Inhibidores 1 y 2 Tautomicina, Nodularina DARPP32, Microcistina Okadaico, Caliculina Quinasas dependientes de ciclo Cantaridina	BDM		Multimérica
<b>PP2A</b>	Subunidad $\alpha$ de la fosforilasa quinasa Cadenas ligeras de miosina Histona	Caliculina, Okadaico, Cantaridina Tautomicina, Nodularina Microcistina, Apomorfina	BDM Ceramide Araquidónico		Multimérica
<b>PP2B</b>	Subunidad $\alpha$ de la fosforilasa quinasa Inhibidor 1 DARPP32 p-NPP	Okadaico, Microcistina Ciclosporina A, FK506 Nodularina	Ca <sup>2+</sup> - calmodulina	Ca <sup>2+</sup>	Multimérica
<b>PP2C</b>	Subunidad $\alpha$ de la fosforilasa quinasa	Okadaico, Microcistina		Mg <sup>2+</sup>	Monomérica
<b>PP4</b>		Microcistina			Monomérica
<b>PP5</b>		Microcistina	Ácidos grasos poliinsaturados Araquidónico		Monomérica
<b>PP6</b>					Monomérica
<b>PP7</b>	Histona fosforilada		Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Monomérica

Dentro de las serina/treonina proteína fosfatasas, encontramos a la proteína fosfatasa 1 (PP1), así como a la 2A (PP2A), la 2B (PP2B) y la 2C (PP2C). Estas fosfatasas son esenciales en organismos eucariotas en un gran número de cascadas de transducción de señales (Cohen y Cohen, 1989; Shenolikar y Nairn, 1991).

Parece claro que la **PP1** se encuentra implicada en funciones celulares tan diversas como el metabolismo del glucógeno, el transporte de calcio, la contracción muscular, la síntesis de proteínas y el transporte intracelular (ver revisiones de Cohen, 1989; Shenolikar y Nairn, 1991; Bollen y Stalmans, 1992). En algunos de estos procesos celulares se han descrito los sustratos de la fosfatasa (glucógeno sintasa, glucógeno fosforilasa, cadenas ligeras de miosina, etc.), aunque en otros muchos todavía no se ha descrito la acción directa de la PP1 sobre la fosfoproteína en cuestión (principalmente para los factores de transcripción) (ver revisiones de Cohen, 1989; Shenolikar y Nairn, 1991; Bollen y Stalmans, 1992; DePaoli-Roach y cols., 1994).

Con el uso del ácido okadaico y de otros inhibidores parece posible la inhibición específica de la actividad de la **PP2A** en extractos libres de células. Aunque no se puede descartar la implicación de otras proteína fosfatasas similares, con esta aproximación se ha vinculado la actividad de la PP2A con procesos tan diversos como el metabolismo, la contracción muscular, la transmisión sináptica, la transducción de señales, el procesamiento del ARNm, así como con la progresión del ciclo celular (ver revisiones de Cohen, 1989; Mumby y Walter, 1993a y b; DePaoli-Roach y cols., 1994).

Aunque clásicamente se ha pensado en las proteína fosfatasas como meros “desfosforiladores” de los sustratos de las proteína quinasas, se ha ido poniendo en evidencia en los últimos diez años que, además, actúan sobre las propias quinasas regulando su actividad. De hecho, existen ya una gran cantidad de proteína quinasas relacionadas con el fenómeno de la apoptosis que son sustratos de la PP2A: PKB, GSK3, p38, PKC, JNK o MEK (ver revisión de Millward y cols., 1999). Es más, parece demostrado que parte de la acción proapoptótica de la ceramida se debe a la activación de la PP2A, la cual se ha descrito tanto *in vitro* (Dobrowsky y Hannun, 1992) como *in vivo* (Ruvolo y cols., 1999).

La **PP2B**, también llamada calcineurina, está formada por dos subunidades: una catalítica (calcineurina A) de 50 kDa, y otra reguladora de 19 kDa. La actividad de esta serina-treonina proteína fosfatasa se regula por  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina ( $\text{Ca}^{2+}$ -CaM). En un principio se vio que era la diana de una serie de fármacos inmunosupresores como son la ciclosporina A (CsA) y el FK506 (Liu y cols., 1991; Schreiber y

Crabtree, 1992). Estos fármacos se unen a proteínas intracelulares llamadas inmunofilinas: la ciclosporina A a la ciclofilina y el FK506 a las FK506BP. Es el complejo inmunosupresor-inmunoflina el que se une a la calcineurina e inhibe su actividad.

Debido al empleo de estos inmunosupresores, el papel de la PP2B en la apoptosis de células del sistema inmunitario está bastante definido. En linfocitos T, por ejemplo, la apoptosis depende de la síntesis *de novo* tanto de Fas como de su ligando, síntesis que es inhibida por la ciclosporina A (Shi y cols., 1989). Sin embargo, existen evidencias en otros tejidos celulares (entre ellos neuronas), que muestran la inducción de la apoptosis de forma dependiente de la PP2B, pero sin necesidad de síntesis *de novo* de proteínas (Shibasaki y McKeon, 1995; Wang y cols., 1999).

La PP2B, o calcineurina, se expresa abundantemente en amplias regiones del cerebro, incluyendo el córtex cerebral, el hipocampo o el cerebelo (Molkentin y cols., 1998). Sin embargo, la función fisiológica por la que se produce una expresión de tan alto nivel en el sistema nervioso aún se desconoce. A este respecto se ha descrito, utilizando cultivos primarios de neuronas corticales, que la sobreexpresión de PP2B predispone a las neuronas a entrar en apoptosis, de una forma dependiente de citocromo c y caspasa 3, en condiciones que normalmente no serían letales para esos cultivos (Asai y cols., 1999).

La **PP2C** fue inicialmente descrita como una proteína fosfatasa monomérica cuya actividad dependía de la presencia de  $Mg^{2+}$  en el medio. Se ha sugerido que las isoformas que se expresan en el sistema nervioso jugarían un papel importante en las señales de transducción moduladas por  $Ca^{2+}$ . De hecho, la PP2C podría ser la enzima que desfosforilara, en células granulares de cerebelo, a la proteína quinasa II dependiente de  $Ca^{2+}$ -CaM (Fukunaga y cols., 1993). Además, en estudios con levaduras se ha visto que regula negativamente la cascada de transducción de las MAPK, aunque sus mecanismos exactos de acción son todavía desconocidos (Wera y Hemmings, 1995).

## Litio y Valproato como fármacos para el estudio de la Apoptosis

El hecho de que en las rutas de transducción intervengan una gran cantidad de enzimas, unido a que la relación existente entre las diversas vías se esté empezando a comprender en estos momentos, hace que su estudio resulte en ciertos aspectos complicado. Si, además, el fenómeno fisiológico que se quiere estudiar se caracteriza por una gran diversidad de marcadores bioquímicos, de muchos de los cuales no se conoce su verdadera relevancia, el conocimiento exacto del proceso va a venir marcado por la disponibilidad de herramientas farmacológicas y bioquímicas que nos ayuden a su disección para poder estudiar cada uno de los componentes del fenómeno por separado.

Para el caso de la apoptosis en células del sistema nervioso, el conocimiento de los efectores que inducen la muerte de las neuronas es bastante amplio. Sin embargo, las vías que impiden el progreso de la apoptosis todavía no se conocen con exactitud. El conocimiento de las mismas, así como el de los fármacos que activen estas vías serán de vital importancia en los próximos años para el desarrollo de nuevas estrategias a la hora de tratar las enfermedades neurodegenerativas en las que interviene el proceso de la apoptosis.

El **litio** aparece en la moderna farmacoterapia en 1949 (Cade, 1949). Aunque se utiliza para el tratamiento de diversas enfermedades (neutropenia, jaquecas, Parkinson), el litio se emplea fundamentalmente para el tratamiento y la prevención de recaídas de los trastornos bipolares o maníaco-depresivos (Schou, 1991), los cuales tienen una prevalencia mundial de un 1'2 a un 2%. Nuestro interés en él radica, sin embargo, en su capacidad para prevenir en cultivos de CGC la apoptosis inducida por el cambio al medio  $-KCl$  (D'Mello y cols., 1994) mediante un mecanismo aún desconocido.

Aunque se desconocen con exactitud sus mecanismos bioquímicos de acción, su papel neuroprotector será de gran importancia para poder dilucidar las vías implicadas tanto en los fenómenos proapoptóticos como antiapoptóticos. Además vamos a emplear otro fármaco igual de efectivo en el tratamiento de los trastornos bipolares: el ácido valproico o **valproato** (ácido 2-propilpentanoico). A pesar de su estructura química totalmente distinta, es un ácido graso ramificado, el valproato (VPA) es igual de efectivo a la hora de estabilizar los estados maníaco-depresivos de pacientes con trastornos bipolares (Bowden y cols., 1994).

Aunque las bases moleculares de la acción estabilizante del litio y el valproato no se han clarificado, se piensa que ambos fármacos causan cambios a largo plazo en los patrones de señalización neuronal, pudiendo ser estos cambios los causantes de sus efectos profilácticos (Lenox y Hahn, 2000).

Probablemente, ambos fármacos ejerzan sus acciones similares por diferentes mecanismos, pero dentro de la cadena de reacciones inducidas pudiera existir un punto en común. El descubrimiento del mecanismo exacto de acción podría ser de gran ayuda para el diseño de nuevos fármacos que carezcan de los efectos secundarios y de la toxicidad del litio.

Se ha sugerido que los fármacos empleados en los trastornos bipolares restauran el balance entre diferentes vías de transducción al actuar sobre diversos sistemas de neurotransmisión. A este respecto, en preparaciones de córtex de rata, se ha observado que tanto el litio como el valproato aumentan la liberación de glutamato (Dixon y Hokin, 1997). Como se cree que los antidepresivos ejercerían su efecto por una desregulación selectiva y gradual de determinados receptores, esta mayor liberación de glutamato, que estimularía sus receptores, podría tener relevancia terapéutica (Dixon y Hokin, 1997).

Su acción terapéutica requiere un tiempo de espera, por lo que desde el principio se pensó que podrían inducir alteraciones a nivel de la expresión de determinados genes (Manji y cols., 1995). Por otro lado, actualmente se cree que los cambios a largo plazo en los patrones de señalización neuronal podrían ser causados por la acción de ambos fármacos sobre los mecanismos de transducción de señales. En este aspecto, se ha visto que tratamientos crónicos con litio o con valproato aumentan la expresión del gen antiapoptótico *Bcl-2* (Chen y Chuang, 1999) y regulan la expresión de genes mediada por AP-1 (Ozaki y Chuang, 1997; Chen y cols., 1999a). Como AP-1 es un efector de la vía de transducción PI3K/PKB (Marte y Downward, 1997), y la inhibición de uno de los sustratos de la PKB, la GSK3 $\beta$ , una acción común del litio (Klein y Melton, 1996) y del valproato (Chen y cols. 1999b), se ha pensado que podrían alterar el grado de fosforilación de las proteínas del citoesqueleto que se ven afectadas por la actividad de la GSK3. Esto produciría cambios en la plasticidad neuronal que estarían asociados a la estabilización del humor.

En este trabajo vamos a intentar aclarar las vías de transducción implicadas en la apoptosis de CGC. Para ello no vamos a estudiar únicamente las proteína quinasas

más importantes de dichas vías, si no que utilizaremos el litio y el valproato como posibles fármacos activadores de vías antiapoptóticas. Con ello trataremos de esclarecer sobre qué vía proapoptótica están ejerciendo su acción, para así dilucidar la importancia real de las vías sobre las que actúan y hacernos una idea del papel fisiológico o terapéutico que pudieran llegar a tener.





## **OBJETIVOS**



Como hemos tratado de centrar con la introducción general, los objetivos que nos marcamos para la realización de esta tesis doctoral fueron los siguientes:

1. Estudiar las vías de transducción de señales implicadas en la apoptosis en células granulares de cerebelo (CGC) de rata inducida por el cambio a un medio con bajas concentraciones de potasio (-KCl).
2. Determinar el mecanismo por el que el Litio ejerce su efecto neuroprotector en el anterior paradigma apoptótico, prestando especial atención a las vías que se pudieran haber visto afectadas por la inducción de la apoptosis.
3. Estudiar los posibles efectos neuroprotectores que el valproato pudiera tener en los cultivos de CGC de rata y, en su caso, intentar determinar su mecanismo de acción.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**



## MATERIALES

### APARATOS

Espectrofotómetro Varian modelo Cary 300 Bio.

Fuente de alimentación para electroforesis Bio-Rad modelo Powerpac 300.

Centrífuga refrigerada MR1822 de Jouan y centrífuga Beckman modelo GS-6R.

Incubador de CO<sub>2</sub> Heraeus modelo Hera Cell.

Campana de flujo laminar Telstar modelo AV-100.

Microscopio óptico Leica modelo DMIL.

### REACTIVOS

[<sup>3</sup>H]Citidina (23.2 Ci/mmol) de NEN (Itisa, Madrid).

MK 801 de RBI (Imatra SA, Barcelona).

El cocktail de inhibidores de proteasas de Roche. Para su uso se disuelve una pastilla en 2 ml de agua de calidad mili-Q y se almacena congelado a -20°C.

Los productos para los cultivos celulares, el ácido valproico, la insulina y el arabinósido de citosina (Ara-C) de Sigma. Al igual que la C<sub>2</sub>-ceramida, la wortmanina y el fosfatidato (C18:1).

La proteína G-Sefarosa de Amersham Pharmacia Biotech.

La expresión de GST-c-Jun y su posterior purificación unida la Sefarosa fue realizada por A. Cuenda en el MRC Protein Phosphorylation Unit de la Universidad de Dundee (Dundee, Escocia).

El PKI, péptido inhibidor de la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico (TTYADFIASGRTGRRNAIHD), y los otros péptidos utilizados fueron sintetizados por F. B. Caudwell en el MRC Protein Phosphorylation Unit de la Universidad de Dundee (Dundee, Escocia).

El Ac-DEVD-AMC, para la medida de la actividad caspasa 3 de PharMingen International.

Los inhibidores LY294002, PD98059 y rapamicina de Calbiochem. Al igual que la calmodulina y la ciclosporina A.

El ácido ocadaico de Tocris.



## CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS GRANULARES DE CEREBELO DE RATA

- **Tampón Krebs-Ringer 10x:**

El pH de este tampón es de 7.4. Se prepara según la siguiente fórmula:

	<b>100 ml</b>
NaCl	7.07 g
KCl	0.36 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.166 g
NaHCO <sub>3</sub>	2.14 g
Glucosa	2.57 g

Los esterilizamos por filtración y se guarda a 4°C. No es necesario utilizarlo en condiciones estériles, pero es conveniente guardar distintas fracciones en botellas estériles, ya que al contener glucosa se contamina con cierta facilidad.

- **Solución 1:**

50 ml del Tampón Krebs-Ringer 1x + 0.15 g de albúmina de suero bovino (BSA) + 0.4 ml de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 3.8%.

- **Solución 2:**

10 ml de la Solución 1 + 100 µl de tripsina 2.5 mg/ml.

- **Solución 3:**

10 ml de la Solución 1 + 0.8 mg de ADNasa + 5.2 mg de inhibidor de tripsina de soja + 0.1 ml de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 3.8%.

- **Solución 4:**

8.4 ml de la Solución 1 + 1.6 ml de la Solución 3.

- **Solución 5:**

5 ml de la Solución 1 + 40 µl de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 3.8% + 6 µl de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O.

- **Medio DME modificado:**

Como base para su preparación empleamos el medio DME (D5671 de Sigma<sup>®</sup>) al que añadimos para un volumen final de 1l:

100 ml de suero fetal bovino inactivado por calor,  
4'503 ml de glucosa al 20%,  
9'816 ml de KCl 2M,  
370 µl de insulina 10 µg/ml,  
1 ml de PABA 7 mM,  
1 ml de piruvato 100 mg/ml,  
10 ml de glutamina 200 mM y  
5 ml de una mezcla de penicilina 10.000 U/ml y estreptomicina 10 mg/ml.

Se almacena en la nevera y hay que mantener siempre su esterilidad. Si se va a almacenar durante un tiempo prolongado (más de un mes) es conveniente añadir la insulina y la glutamina en el momento de su uso, para evitar que se estropeen y que afecten negativamente al desarrollo de la preparación de células.

- **Medio +KCl:**

Para prepararlo completamos el medio DME para que tenga unas concentraciones finales de:

50 U/ml de penicilina,  
50 µg/ml de estreptomicina,  
20 nM de progesterona,  
0'11 mg/ml de piruvato,  
2 mM de glutamina,  
25 mM de KCl y  
5 µg/ml de insulina.

Ésta última no siempre se añade. En estos casos se indicará su ausencia o su uso a diferentes concentraciones.

- **Medio -KCl:**

Tiene la misma composición que el medio +KCl, salvo que no lleva más que el KCl que tiene el propio medio DME. La concentración de este medio en KCl es de 5 mM.

## LISADOS DE CÉLULAS GRANULARES DE CEREBELO DE RATA

Para lisar las células de los cultivos de células granulares, empleamos varios tipos de soluciones tampón dependiendo de la finalidad última del lisado:

- **Tampón PBS:**

Para preparar 1 l añadimos 80 ml de  $K_2HPO_4$  1 M, 20 ml de  $KH_2PO_4$  1 M y 20 ml de NaCl 5 M.

- **Tampón quinasa:**

50 mM Tris HCl pH 7,5, 0,1% de Triton X-100, 2 mM de EDTA, 2 mM de EGTA, 50 mM de fluoruro sódico, 10 mM de  $\beta$ -glicerofosfato sódico, 5 mM de pirofosfato sódico y 1 mM de ortovanadato sódico. Para añadir el ortovanadato sódico se tiene una solución 100 mM a pH 10,0 que se preparó de la siguiente manera: tras ajustarle el pH se pone de un color naranja debido a la formación de polímeros del ortovanadato. Para deshacerlos se lleva a ebullición en un horno microondas y se deja enfriar a temperatura ambiente. Se debe poner entonces de un color ámbar y se tiene que volver a ajustar el pH.

El tampón de lisis “quinasa” se guarda en la nevera y se utiliza siempre frío. En el momento de su uso se añade 1  $\mu$ l/ml de microcistina 1 mg/ml, 1  $\mu$ l/ml de  $\beta$ -mercaptoetanol y los inhibidores de proteasas: bien 1 pastilla/50 ml del cocktail de Roche o bien 10  $\mu$ g/ml de aprotinina, 10  $\mu$ g/ml de leupeptina y 174,2  $\mu$ g/ml de PMSF.

- **Tampón fosfatasa:**

Tris 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EGTA 1 mM y 0,25% de Nonidet P-40. Al igual que con el tampón anterior en el momento de su uso se añade en fresco 10  $\mu$ g/ml de aprotinina, 10  $\mu$ g/ml de leupeptina y 174,2  $\mu$ g/ml de PMSF.

Como los lisados se van a emplear para medir la cantidad de fosfato liberado es importante que se haga con agua de calidad miliQ, para que se encuentre el nivel basal de fosfato libre lo más bajo posible.

- **Tampón caspasa:**

Tris-HCl 10 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  10 mM pH 7.5, NaCl 130 mM, 1% de Triton X-100 y pirofosfato sódico 10 mM.

## ELECTROFORESIS Y WESTERN BLOT

- **Laemmli 10x:**

Tris 250 mM pH 8.3, glicina 1.92 M y SDS al 1%. Se almacena a esta concentración, pero su uso es a 1x.

- **Tampón de muestra 5x:**

Tris 250 mM pH 6.8, SDS al 10%, glicerol al 50% y azul de bromofenol al 0.025%. Se almacena así, pero en el momento de su uso deberemos añadirle  $\beta$ -mercaptoetanol a un 5%.

- **Solución 2:**

Es la empleada para el gel inferior (separador) en las electroforesis de poliacrilamida: Tris 1.5 M pH 8.8 y SDS al 0.4%.

- **Solución 3:**

Para el gel superior (concentrador) utilizamos el tampón Tris 0.5 M pH 6.8 y SDS al 0.4%.

- **Tampones de transferencia:**

1.- CAPS 10 mM pH 11 y metanol al 10%.

2.- 30 g de Tris y 142 g de glicina. Enrasamos hasta 1 l con agua bidestilada y tendremos una concentración 10x. Para su uso lo diluiremos 10 veces y se le añade metanol para obtener una concentración final de un 20%.

- **Rojo Ponceau:**

50 mg de Ponceau S, 22'5 ml de metanol, 5 ml de ácido acético y 22'5 ml de agua bidestilada.

## **MEDIDA DE LA ACTIVIDAD PROTEÍNA FOSFATASA**

Como se ha comentado para el tampón de lisis “fosfatasa”, es importante que todos estos tampones se hagan en agua de calidad miliQ para evitar interferencias con la determinación del fosfato liberado.

- **Tampón Sephadex<sup>®</sup> G-25:**

Tris 10 mM a pH 7'5, EDTA 1mM y 0'02% de azida de sodio.

En este tampón almacenamos las columnas que empleamos para eliminar el fosfato de nuestros lisados.

- **Patrón de Fosfato:**

1 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

- **Tampón PP2A 5X:**

Imidazol 250 mM a pH 7'2, EGTA 1 mM, 0'1% de  $\beta$ -mercaptoetanol y 0'5 mg/ml de BSA.

- **Tampón PP2B 5X:**

Imidazol 250 mM a pH 7'2, EGTA 1 mM,  $\text{MgCl}_2$  50 mM,  $\text{NiCl}_2$  5 mM, 250  $\mu\text{g/ml}$  de calmodulina y 0'1% de  $\beta$ -mercaptoetanol.

- **Tampón PP2C 5X:**

Imidazol 250 mM a pH 7'2, EGTA 1 mM,  $\text{MgCl}_2$  50 mM, 0'1% de  $\beta$ -mercaptoetanol y 0'5 mg/ml de BSA.

## MÉTODOS

### CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS GRANULARES DE CEREBELO DE RATA

Para la obtención de las células granulares de cerebelo (CGC) se emplearon ratas Wistar de ambos sexos del Servicio de Animalario de la Universidad de Extremadura, de siete u ocho días de vida. Las progenitoras se mantienen en condiciones controladas de humedad y temperatura disponiendo de alimento y agua *ad libitum*. Todas las manipulaciones se realizaron dentro de una campana de flujo laminar en las máximas condiciones posibles de esterilidad.

Todas las ratas disponibles para ese día se dividen en diferentes grupos de siete a doce cerebelos. A cada tanda se le realiza el mismo proceso, pero por separado, para favorecer un mayor rendimiento de células al final de la preparación. Antes de comenzar con cada preparación de los cultivos primarios, ese mismo día se prepararon para cada lote 50 ml de la Solución 1, 10 ml de las Soluciones 3, 4 y 5 y, finalmente, 5 ml de la Solución 5. Todas las soluciones se esterilizan por filtración antes de utilizarlas y en la medida de lo posible las mantenemos a 37°C evitando así que las células del cerebelo sufran cambios bruscos de temperatura.

El sacrificio se realizó por dislocación cervical en una campana de flujo distinta a la que se empleó para llevar a cabo el resto de la preparación. A continuación seccionamos el cuello y levantamos la bóveda craneana para extraer el cerebelo con unas pinzas. Así, se irán colocando los distintos cerebelos en una placa de Petri con 5 ml del tampón Krebs-Ringer 1x.

Una vez pasado el lote a la otra campana pasamos los cerebelos a otra placa de Petri con Krebs-Ringer y eliminamos las meninges con unas pinzas de relojero. Este paso es muy importante para que no haya células endoteliales, fibroblastos u otros tipos celulares no deseados. Después, agrupamos cada tanda de cerebelos en la tapa de una placa de Petri esta vez sin ningún tampón. Con un bisturí cortamos en direcciones perpendiculares los cerebelos. Una vez troceados, con un poco de la Solución 1 y con una pipeta Pasteur, lo pasamos a un tubo cónico de 50 ml que contenga la Solución 1. Agitamos un poco y se da un pulso de centrifugación a 500 g a temperatura ambiente.

El sobrenadante se eliminó por aspiración y al precipitado de células se le añadió la Solución 2 que contiene la tripsina (0'25 mg/ml). A partir de ese momento se mantuvieron las células a 37°C durante 10 minutos y con agitación ocasional. Para poder detener la acción enzimática de la tripsina, se añadió la Solución 4. Se agitó hasta ver la disgregación de las células. Si esto no sucede se puede añadir 1 ml más de la Solución 3.

Tras otro pulso de centrifugación, se eliminó el sobrenadante y se añadieron al precipitado de células 3 ml de la Solución 3. Para disgregar bien la suspensión de células empleamos una pipeta Pasteur de plástico de punta fina. Hacemos pasar la suspensión hasta un máximo de 10 veces por la punta de la pipeta ya que un número mayor de pases puede dañar a las neuronas. Posteriormente la filtramos con una malla de nylon de 0'4 mm de luz. Obtenemos así una suspensión lechosa que se mezcló con la Solución 5. Tras mezclarla, se centrifugó a 500 g a temperatura ambiente durante 5 minutos. Aunque en el sobrenadante quedaron algunas células en suspensión, se eliminó junto con ellas y las células se resuspendieron en 50 ml de medio DME modificado. En éste momento se juntaron todos los lotes que pudiéramos haber hecho.

A continuación contamos el número de células que tenemos con una Cámara de Neubauer. Típicamente, añadimos la cantidad de medio necesario para obtener cultivos primarios con una densidad de  $1 \cdot 10^6$  células/ml. Las neuronas se sembraron en placas de cultivo previamente incubadas con 10 mg/l de polilisina durante dos a cuatro horas. Hemos utilizado tres tipos de placas de cultivo: placas de 10 cm de diámetro que sembramos con 10 ml de la suspensión de células, las de 6 pocillos las sembramos con 2 ml de la suspensión en cada pocillo, y las de 24 pocillos con 0'5 ml.

Los cultivos celulares se mantienen a 37°C, en un incubador en una atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub> y una elevada humedad relativa.

A las 20-24 h, en el que consideramos primer día *in vitro* (1<sup>er</sup> DIV), añadimos el antimetabólico arabinósido de citosina (Ara-C) a una concentración final de 10 µM, para evitar el crecimiento de las células que se dividen (no neuronales), típicamente los astrocitos y la microglía. La administración del Ara-C a estas dosis no tiene efectos tóxicos en las CGC (Centeno y cols., 1998).

En el 7º DIV las células granulares se encuentran perfectamente diferenciadas y ya han madurado. Fue en éste momento en el que comenzamos a realizar nuestros

experimentos. Antes de realizarlos, siempre observamos que la morfología de las células y su densidad fueran las correctas.

### MEDIDA DE LA VIABILIDAD CELULAR POR REDUCCIÓN DEL MTT

Para medir la viabilidad de los cultivos primarios utilizamos una adaptación del método descrito por Mosmann (1983). El método se basa en la reducción por la succinato deshidrogenasa mitocondrial del bromuro de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), dando lugar al formazán que, en lugar de ser amarillo como el MTT es de color azul. Midiendo por espectrofotometría la cantidad de formazán producida ( $\lambda = 500 \text{ nm}$ ), equiparamos la actividad deshidrogenasa mitocondrial con la viabilidad de nuestro cultivo. Como sólo en las células vivas se puede producir esta reacción, la cantidad de formazán producido es directamente proporcional al número de células viables presentes en el ensayo (Manthorpe y cols., 1986).

La viabilidad la medimos en las placas de cultivo de 24 pocillos. Primero eliminamos con cuidado el medio por aspiración y añadimos 500  $\mu\text{l}$  de una solución atemperada de MTT 150  $\mu\text{g/ml}$  en Locke 25 (NaCl 134 mM, KCl 25 mM,  $\text{NaHCO}_3$  4mM, HEPES-Na pH = 7.4 10 mM,  $\text{CaCl}_2$  2.3 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM y Glucosa 5 mM).

Se incubó durante 15 minutos a 37°C y a continuación se vuelve a eliminar el medio. Los cristales de formazán se disolvieron en 500  $\mu\text{l}$  de dimetilsulfóxido (DMSO) y lo pasamos a una cubeta para medir su densidad óptica a 500 nm.

Hemos empleado dos formas de expresar la viabilidad. Con el **porcentaje de viabilidad** hacemos referencia a la viabilidad de las diferentes condiciones experimentales expresada respecto al control que consideramos el 100%: el cultivo en medio +KCl con insulina.

Para calcular el **porcentaje de recuperación** empleamos la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de recuperación} = \frac{\text{DO}_{\text{tratado}} - \text{DO}_{5 \text{ mM K}^+}}{\text{DO}_{25 \text{ mM K}^+} - \text{DO}_{5 \text{ mM K}^+}} \times 100 \quad [1]$$



de donde  $DO_{\text{tratado}}$  es la absorbancia en las diferentes condiciones experimentales a 500 nm en medio  $-KCl$ , y  $DO_{25 \text{ mM } K^+}$  y  $DO_{5 \text{ mM } K^+}$  se corresponden con las absorbancias de los cultivos en los medios  $+KCl$  y  $-KCl$  respectivamente.

## EXTRACCIÓN DEL ADN CITOPLASMÁTICO

Para poder observar la fragmentación internucleosomal típica del proceso de apoptosis, sometimos a una electroforesis en gel de agarosa al ADN citoplasmático extraído de los cultivos celulares sembrados en las placas de 6 pocillos.

Primero eliminamos el medio de cultivo por aspiración y añadimos a cada pocillo 250  $\mu\text{l}$  del tampón Tris-HCl pH 7.4 5 mM/EDTA 20 mM. Tras despegar las neuronas con el émbolo de una jeringa, tomamos el volumen resultante y lo añadimos a un tubo estéril tipo eppendorf manteniéndolo a 4°C. A continuación le añadimos 1  $\mu\text{l}$  de Tritón X-100 al 10% para cada 100  $\mu\text{l}$  de lisado obtenido, y se incubó durante 1 hora a 4°C en continua agitación.

Transcurrido ese tiempo, para eliminar los núcleos se centrifugaron las muestras durante 15 minutos a 15.000 g a 4°C. Tomamos el sobrenadante con el ADN citosólico y desechamos el precipitado. A cada 250  $\mu\text{l}$  del sobrenadante le añadimos 5  $\mu\text{l}$  de proteinasa K 10 mg/ml y 25  $\mu\text{l}$  de SDS 10%. Así, se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente con agitación constante.

Una vez desnaturalizadas las proteínas y solubilizados los lípidos, realizamos dos extracciones sucesivas con 500  $\mu\text{l}$  de fenol/cloroformo. Tomamos después la fase acuosa, y le añadimos 15  $\mu\text{l}$  de ARNasa 1 mg/ml para incubarlo a 37°C durante 1 hora para eliminar el ARN.

A continuación, realizamos otras dos extracciones con 500  $\mu\text{l}$  de fenol/cloroformo. Para precipitar el ADN añadimos 50  $\mu\text{l}$  de acetato sódico 2.5 M pH 5.2 y 1.5 ml de etanol absoluto frío. Las muestras las guardamos a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche.

Al día siguiente centrifugamos las muestras a 10.000 g durante 10 minutos a 4°C y el precipitado se lavó con etanol frío al 70%. Finalmente secamos el precipitado con una bomba de vacío y lo resuspendimos en Tris-HCl pH 8.0 10 mM/ EDTA 1 mM.

En todas las calles de las electroforesis se añadió siempre la misma cantidad de ADN. Para cuantificar el ADN obtenido, tuvimos en cuenta la relación de que 1 unidad de absorbancia a 260 nm se corresponde con 50 µg/ml de ADN.

### **MEDIDA DE LA ACUMULACIÓN DE [<sup>3</sup>H]CDP-DIACILGLICEROL**

Para medir la acumulación de [<sup>3</sup>H]CDP-diacilglicerol ([<sup>3</sup>H]CDP-DAG) se empleó el método descrito por Claro y cols. (1993) con algunas adaptaciones para nuestros cultivos celulares (Centeno y cols., 1998). Utilizamos las placas de cultivo de 6 pocillos.

Preincubamos durante 24 h con [<sup>3</sup>H]citidina (2 µCi/ml) con lo que la CTP del cultivo quedará marcada radiactivamente con la citidina tritiada. Para inducir la acumulación de [<sup>3</sup>H]CDP-DAG por la adición de litio, previamente incubamos durante 2h con inositol (3 mM). Tras una incubación de 30 minutos a 37 °C, eliminamos el medio de cultivo. Añadimos a los pocillos 800 µl de metanol frío y rascamos bien el fondo de la placa con el émbolo de una jeringa para pasar el contenido a tubos de ensayo con 900 µl de cloroformo.

Añadimos 750 µl de HCl 0'25 M y tapamos los tubos para poder agitar vigorosamente durante 1 minuto. Para separar las dos fases centrifugamos durante 5 minutos a 2.000 g. Eliminamos por aspiración la fase acuosa (la superior), y para lavar la fase orgánica (cloroformo) añadimos 1'5 ml de una mezcla 1:1 (v/v) de metanol/HCl 0'25 M.

Repetimos la centrifugación y volvemos a eliminar la fase acuosa. Repartimos la fase orgánica en viales de centelleo añadiendo 500 µl a cada uno. Los dejamos toda la noche a temperatura ambiente para que se evapore el cloroformo. La radiactividad de la citidina tritiada la medimos en un contador de centelleo Beckman LS 3801 con una eficiencia del 50%.

## LISADOS DE CÉLULAS GRANULARES DE CEREBELO DE RATA

Para obtener lisados de los cultivos, empleamos las placas de 6 pocillos o bien las de 10 cm de diámetro. Colocamos la placa en una bandeja con hielo, se aspira el medio y, generalmente, se hace un lavado con PBS. En el caso de que los lisados sean para la medida de la actividad fosfatasa, evitamos utilizar el PBS para que no interfiera con la posterior medida del fosfato liberado, ya que este tampón contiene gran cantidad de fosfato. En su lugar lavamos con un tampón isoosmótico compuesto de Tris 20 mM, pH 7.4 y NaCl 134 mM.

A continuación, añadimos 200  $\mu$ l (placas de 6 pocillos) o 1 ml (placas de 10 cm) del tampón de lisis correspondiente. Nos aseguramos que se reparte bien por toda la superficie de la placa y rascamos las células con el émbolo de una jeringuilla. Sin olvidarnos de los bordes de la placa, rascamos toda la superficie en una dirección y luego en sentido perpendicular. Es importante que durante todo el proceso las células y los lisados estén a 4°C por lo que lo mantenemos todo en hielo.

Una vez que tenemos las células en nuestro tampón las pasamos a tubos tipo eppendorf de 1.5 ml. En ellos las centrifugamos durante 5 min a 20.000 g a 4°C. Nos interesa conservar el sobrenadante que guardaremos congelado a -80°C. Si fuera posible, como conviene congelar los lisados lo más rápidamente posible, sumergimos los tubos tipo eppendorf en nitrógeno líquido.

La determinación de la concentración de proteínas de nuestros lisados la realizamos siguiendo el método de Bradford (1976) usando BSA como proteína patrón.

## ELECTROFORESIS Y WESTERN BLOT

Para realizar las electroforesis empleamos los lisados obtenidos con el tampón “quinasa” como viene explicado en la sección anterior. En este caso, y tras la determinación de la concentración de proteínas, añadimos el volumen necesario de tampón “quinasa” para igualar las concentraciones de las diferentes muestras. Así durante el posterior manejo de las mismas emplearemos el mismo volumen con lo que será más sencillo la realización de la electroforesis. El hecho de emplear como tampón de lisis el “quinasa” en lugar de otro más sencillo a base simplemente de

Tris, EDTA y algún detergente, viene dado por la necesidad de que las proteínas conserven el grado inicial de fosforilación y no se vea afectado por la actividad de fosfatasas que pudieran estar todavía activas durante el procesamiento de las muestras.

Una vez igualadas las concentraciones, añadimos el volumen correspondiente de tampón de muestra 5x, que deberá quedar al final a una concentración 1x. Entonces calentamos a 100°C durante 5 minutos las muestras, las cuales estarán ya listas para su empleo en la electroforesis. Las muestras se guardarán a -80°C.

La electroforesis en poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes se realizó en un sistema discontinuo siguiendo el método de Laemmli (1970). El gel concentrador (superior) tiene una concentración de acrilamida de un 4%. Sin embargo la concentración de acrilamida del gel inferior (separador) dependerá del peso molecular de la proteína que nos interese detectar posteriormente con los anticuerpos. En la tabla 2 se presenta el protocolo seguido en la preparación de los diferentes geles de electroforesis. Por norma general, y siempre que fue posible, en cada calle se añadieron 20 µg de proteínas totales.

Una vez realizada la electroforesis, transferimos las proteínas a nitrocelulosa por el método descrito por Matsudaira (1987) con ligeras modificaciones (Centeno y cols., 1994). A la hora de la transferencia la solución tampón que empleamos dependerá de la disponibilidad de tiempo. Con el tampón CAPS realizamos la transferencia durante 90 minutos a voltaje constante (unos 80 V). Debemos cuidar de que nunca se superen los 300 mA. Para evitar el calentamiento excesivo incluimos una cubeta con hielo y el tampón estará en continua agitación. Con el tampón Tris/glicina, el protocolo es ligeramente diferente. En este caso dejamos la transferencia durante toda la noche. Para el calcular el voltaje dividimos 350 entre el

**Tabla 2. Protocolo para la preparación de los geles de poliacrilamida.**

GEL INFERIOR						GEL SUPERIOR
% de acrilamida	7'5%	10'4%	12'5%	13'5%	15'5%	4%
<b>Acrilamida/bisacrialmida (29:1) al 40%</b>	0'75 ml	1'04 ml	1'25 ml	1'35 ml	1'5 ml	0'3 ml
<b>Solución 2 ó 3</b>	1'014 ml	1'014 ml	1'014 ml	1'014 ml	1'014 ml	0'525 ml
<b>Agua</b>	2'236 ml	1'94 ml	1'736 ml	1'636 ml	1'486 ml	1'175 ml
<b>TEMED</b>	2'07 µl	2'07 µl	2'07 µl	2'07 µl	2'07 µl	1'2 µl
<b>APS 10%</b>	16'83 µl	16'83 µl	16'83 µl	16'83 µl	16'83 µl	16'83 µl

número de horas que va a estar. En este caso no es necesaria la agitación continua del tampón, y el hecho de que transcurra durante toda la noche hace inútil la inclusión de la cubeta con hielo.

Una vez concluida la transferencia, teñimos el papel de nitrocelulosa con el rojo Ponceau. Así comprobamos si se he transferido bien y de forma homogénea. Tras la comprobación se lava con agua bidestilada eliminando así la tinción.

Tras el lavado incubamos durante 30 minutos en PBS/Tween 20 al 0'2% con un 10% de leche en polvo desnatada. Así bloqueamos en la nitrocelulosa todas aquellas zonas en las que no se encuentre unida ninguna proteína. A continuación incubamos con el anticuerpo primario, lavamos con el PBS, incubamos con el anticuerpo secundario diluido a 1/5.000 y volvemos a lavar. Como se puede ver en la tabla 3, las condiciones de concentración y tiempo de incubación de los anticuerpos varían para cada caso. Por norma general, todos los anticuerpos los empleamos diluidos en PBS-

**Tabla 3. Condiciones de los anticuerpos utilizados.** ©, representa que el anticuerpo reconoce los residuos fosforilados de la proteína. El número indica cual es el residuo fosforilado.

ANTICUERPO	DILUCIÓN	TIEMPO	SECUNDARIO
CASPASA 3 proteolizada	1/1.000	Toda la noche a 4°C	conejo
CASPASA 7 proteolizada	1/1.000	Toda la noche a 4°C	conejo
CREB	1/1.000	1h	conejo
©-CREB	1/1.000	Toda la noche a 4°C	conejo
ERK	1/1.000	1h	oveja
©-ERK	1/1.000	Toda la noche a 4°C	ratón
GSK3	0'5 µg/ml	1 h	oveja
GSK3 (©21)	1 µg/ml	1 h	oveja
JNK	1 µg/ml	1 h	oveja
©-JNK	1/500	Toda la noche a 4°C	conejo
PARP proteolizada	1/1.000	Toda la noche a 4°C	conejo
PKB	0'5 µg/ml	1 h	oveja
PKB (©473)	1/1.000	Toda la noche a 4°C	conejo

Tween 20 al 0'2% y con un 5% de leche en polvo desnatada. Con el uso de la leche conseguimos, en cierta medida evitar posibles uniones inespecíficas del anticuerpo a proteínas que se encuentren en la nitrocelulosa. Además, para el caso de los anticuerpos contra la PKB y la GSK3 fosforiladas, durante la incubación con el anticuerpo incluimos 10 µg/ml del correspondiente defosfopéptido (KHFPQFSYSAS para el anticuerpo PKB (©473) y RARTSSFAEPG para el GSK3 (©21), así evitamos la unión en la nitrocelulosa del anticuerpo a dichas proteínas en su estado no fosforilado.

### **MEDIDA DE LA ACTIVIDAD DE LAS PROTEÍNA QUINASAS**

Para la medida de la actividad de la proteína quinasa B (**PKB**) utilizamos los lisados obtenidos con el tampón de lisis “quinasa” de cultivos procedentes de placas de 6 pocillos o de 10 cm. El método seguido es el descrito por Cross y cols. (1995) con ligeras adaptaciones a nuestro sistema.

Primero tenemos que tener preparadas en tubos tipo eppendorf de 1'5 ml fracciones de 10 µl de proteína G-Sefarosa unida al anticuerpo con el que haremos la inmunoprecipitación: en este caso un anticuerpo contra el dominio PH de la PKB. Para ello lavamos con el tampón de lisis “quinasa” unas 5 ó 6 veces 500 µl de proteína G-Sefarosa con centrifugaciones de 1 minuto a 13.000 r.p.m. Estos 500 µl suponen unos 250 µl de bolitas de Sefarosa por lo que les añadimos 100 µg del anticuerpo y se incuban durante 30 minutos a 4°C en agitación constante para mantener las bolitas de Sefarosa permanentemente en suspensión. Una vez unido el anticuerpo a la proteína G, lavamos 5 ó 6 veces con el mismo tampón de lisis para eliminar los anticuerpos que no se hubieran unido al complejo de la proteína G-Sefarosa. Se hacen fracciones de 10 µl que se pueden guardar hasta 1 mes a 4°C. Como las bolitas de sefarosa precipitan rápidamente, antes de su uso siempre se agitan bien con un vórtex para asegurarnos que la suspensión es lo más homogénea posible.

A la hora de medir la actividad PKB de los lisados incubamos 300 µg de proteínas con una de las fracciones de 10 µl durante 1 h a 4°C en continua agitación (vórtex). A continuación lavamos el inmunoprecipitado dos veces con el tampón de

lisis “quinasa” con 0’5 M de NaCl y un 0’1% de  $\beta$ -mercaptoetanol seguido de otros dos lavados con tampón 50 mM Tris, pH 7’5, 0’1 mM de EGTA y 0’1% de  $\beta$ -mercaptoetanol.

El ensayo *in vitro* de la actividad PKB se lleva a cabo incubando unos 20  $\mu$ l del inmunoprecipitado con 30  $\mu$ l del tampón de reacción: 50 mM de Tris-HCl, pH 7’5, 0’1% de  $\beta$ -mercaptoetanol, 0’1 mM de EGTA, 10  $\mu$ M del péptido PKI, 100  $\mu$ M de ATP ( $10^6$  c.p.m./nmol), 1  $\mu$ M de microcistina LR, 10 mM de acetato magnésico y 50  $\mu$ M del péptido sustrato, en este caso su secuencia de aminoácidos es: GRPRTSSFAEG. El ATP se consigue diluyendo ATP frío (sin radiactividad) con  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (10  $\mu$ Ci/ml), generalmente en una proporción 1:1 pero se puede variar si queremos obtener unos resultados con un mayor número de c.p.m.

La incubación se lleva a cabo durante 20 minutos a 30°C en continua agitación (vórtex) dentro de una campana de metacrilato para evitar la exposición al fósforo radiactivo. Además, para la manipulación de material radiactivo se emplearon pantallas protectoras de metacrilato, así como ropa y guantes protectores.

Tras la incubación, se recogen 40  $\mu$ l de cada ensayo y se depositan en unos trozos de 2 x 2 cm de papel de fosfo celulosa (Whatman® P81 Chromatography paper) numerados con lápiz para reconocer cada una de las distintas condiciones. Se lavan 5 veces con unos 300 ml de una solución de ácido fosfórico al 0’5% y finalmente una vez con acetona. Se secan con un secador de mano y los papeles se introducen en tubos tipo eppendorf para contar el  $^{32}\text{P}$  incorporado mediante un contador de centelleo líquido. El tiempo en el que se midió la radiactividad (en c.p.m.) de cada una de las muestras, fue de 30 segundos.

Sin embargo, no ha sido la PKB la única proteína quinasa de la que hemos medido su actividad. Para la medida de la actividad de **RSK** y de la **MAPKAPK2**, el protocolo fue idéntico al que acabamos de describir, con la salvedad de los anticuerpos utilizados para realizar la inmunoprecipitación, el péptido empleado como sustrato (KKLNRTLVA para la MAPKAPK2 y GRPRTSSFAEG para la RSK) y la cantidad de proteína utilizada en el ensayo (en ambos casos fueron suficientes 100  $\mu$ g del lisado) (Cuenda, 2000).

Para el caso de la medida de la actividad de **JNK**, el protocolo seguido fue diferente al de las anteriores proteínas quinasas (Cuenda, 2000). En este caso, la particularidad radica en que la inmunoprecipitación se realiza con el propio sustrato: GST-c-Jun unido a la glutation-S-Sefarosa. Primero incubamos 43 µg de la expresión de una quimera de c-Jun unida a GST con 100 µg de nuestros lisados. Esta incubación se llevará a cabo durante 3 h a 4°C en continua agitación. Al igual que hemos descrito anteriormente, lavamos dos veces con tampón de lisis quinasa completado con NaCl (en este caso 0'15 M) y añadimos 40 µl del mismo tampón de reacción que describimos para el caso de la PKB. En este caso no añadimos sustrato, ya que es la propia proteína c-Jun con la que hemos hecho la inmunoprecipitación. La reacción dejaremos que transcurra durante 30 minutos a 30°C y detendremos la reacción añadiendo directamente 12'5 µl del tampón de muestra 5x descrito en el apartado de Electroforesis y Western Blot.

A continuación calentamos las muestras a 100°C durante 5 minutos y las sometemos a electroforesis en poliacrilamida al 10%. Debemos tener especial cuidado ya que las muestras tienen ATP radiactivo. El fosfato radiactivo del mismo es el que se ha incorporado a la proteína c-Jun. Así, una vez realizada la electroforesis, utilizaremos el gel directamente para el revelado. Expondremos la película durante toda la noche a -80°C. Al realizar la exposición a bajas temperaturas conseguiremos una buena definición en las bandas obtenidas en el revelado. Esto es importante ya que al ser tan larga la exposición, a temperatura ambiente la radiactividad difundiría y podríamos obtener una película totalmente velada.

De este modo obtendremos en la película una imagen en la que se observarán las bandas correspondientes al peso molecular de GST-c-Jun. Así, la mayor o menor intensidad de las mismas se corresponderá con la mayor o menor actividad de JNK en las diferentes condiciones que se incluyeron en cada calle de la electroforesis. Para poder cuantificar esta intensidad, primero secamos los geles utilizando el sistema de secado por aire de Biorad®. Primero colocamos el gel entre dos papeles de celofán humedecidos en agua. Una vez secados, y utilizando como molde el resultado obtenido del revelado de la película, cortamos la zona en la que se encuentra GST-c-Jun y contaremos la radiactividad en el contador de centelleo, al igual que hemos descrito en los anteriores ensayos de las proteína quinasas.



## MEDIDA DE ACTIVIDAD SERINA/TREONINA FOSFATASA

Para medir las actividades fosfatasa en nuestros lisados hemos utilizado como sustrato péptidos de diferente secuencia:

-uno genérico para todas las serina/treonina fosfatasa de tipo 2, cuya secuencia es: RR-ⓈTVA

-otro con la secuencia de la PKB adyacente a la serina 473: KHFPQF-ⓈSYSAS

indicando Ⓢ que el residuo junto al que se encuentra es el que está fosforilado.

Hay que hacer notar que el péptido general para la medida de la actividad serina/treonina fosfatasa es un sustrato muy malo para la proteína fosfatasa 1, la cual tiene unos requerimientos estructurales bastante específicos. Por ello se emplea para la medida de la actividad de las proteína fosfatasa 2A, 2B y 2C (Donella Deana y cols., 1990).

En todo caso, partimos de los lisados obtenidos con el tampón de lisis “fosfatasa” de placas de 6 pocillos o bien de 10 cm. Primero tenemos que eliminar el fosfato libre existente en el medio en el que se encuentran los lisados. Para ello empleamos una columna de Sephadex<sup>®</sup> G-25. Esta, la hemos montado en el émbolo de una jeringa de 10 ml de volumen. Guardamos a 4°C 10 ml de columna en el tampón Sephadex<sup>®</sup> G-25. Antes de su uso la equilibramos con, al menos, 25 ml del tampón de lisis “fosfatasa”, el mismo tampón en el que se encuentran las muestras. A continuación dejamos que pase todo el tampón y eliminamos el que quede en la columna mediante un pulso de centrifugación a 2.000 g a 4°C. Las centrifugaciones se hacen ajustando con un anillo de plástico la jeringa a un tubo cónico de 50 ml. Durante toda la manipulación de la columna y de las muestras procuraremos mantenerlo todo a 4°C.

Una vez que tenemos la columna lista, añadimos 250 µl del lisado y recogemos el eluido tras someter las muestras a un pulso de centrifugación a 2.000 g a 4°C. Para ello se colocó previamente, dentro del tubo cónico y bajo la salida de la jeringa, un tubo cónico tipo eppendorf de 1,5 ml. Una vez que tenemos las muestras libres de fosfato, determinamos la concentración de proteínas mediante el método de Bradford (1976).

Una vez conocida la concentración, vamos a realizar el ensayo de la actividad fosfatasa en placas de 96 pocillos con fondo plano. Emplearemos 5 µg de proteínas por ensayo y la reacción se llevará a cabo en un volumen final de 50 µl. Además del lisado añadimos 10 µl del tampón 5x correspondiente al tipo de actividad fosfatasa que vayamos a medir y 5 µg del péptido sustrato fosforilado. El resto del volumen será de agua de calidad mili-Q y de los inhibidores o efectores que queramos ensayar.

La reacción transcurre durante 15 minutos a 30°C. Debido al pequeño volumen es conveniente que todo lo que añadimos esté previamente atemperado a dicha temperatura de reacción. Detenemos la reacción añadiendo 50 µl de la mezcla molibdato/aditivo y dejamos que aparezca el color durante otros 15 minutos evitando que le de la luz. Finalmente, y con un lector ELISA, cuantificaremos la cantidad de fosfato liberado por espectrofotometría a 630 nm.

### **MEDIDA DE LA ACTIVIDAD CASPASA 3**

Para medir la actividad de la caspasa 3 utilizamos lisados obtenidos con el tampón de lisis “caspasa”. Para ello vamos a utilizar el sustrato sintético Ac-DEVD-AMC (ácido N-acetil-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-metilcumarina). Este tetrapéptido es ampliamente utilizado para detectar y cuantificar la actividad caspasa 3 en lisados de células apoptóticas (Nicholson y cols., 1995). Los lisados en los que se encuentre activada la caspasa 3 van a proteolizar el sustrato entre el aspártico y la molécula de metilcumarina (AMC), liberándose esta última la cual, al ser una molécula fluorescente, podremos detectar con un espectrofotómetro (Kontron SFM 25) excitando a 380 nm y cuantificando la emisión a 440 nm (Namura y cols., 1998). Sin embargo, tenemos que ser cuidadosos a la hora de interpretar los resultados obtenidos, ya que este péptido también puede ser proteolizado por las caspasas 6, 7 u 8.

Cada ensayo se llevó a cabo en un volumen final de 1 ml en un tampón HEPES 20 mM pH 7.5, 10% de glicerol y en fresco añadimos DTT para una concentración final de 2 mM (Mashima y cols., 1995). Añadimos 90 µg de proteínas y el sustrato

de la caspasa 3 a una concentración de 20  $\mu\text{M}$ . La reacción se incubó a 37°C y a cada tiempo medimos la fluorescencia a 440 nm.

La fluorescencia generada en cada ensayo se cuantificó utilizando diferentes concentraciones de AMC en el mismo tampón y construyendo una recta de calibración. Así para cada uno de los tiempos y condiciones del ensayo podemos representar los nmoles de AMC producidos frente al tiempo y ajustar estos datos a una curva polinomial. Haciendo la derivada de estas curvas, su valor en los tiempos cercanos a cero se corresponde con la  $V_0$  de cada una de nuestras condiciones experimentales.

### PREPARACIÓN DE LIPOSOMAS Y MEDIDA DE LA ANISOTROPÍA DE FLUORESCENCIA

Los liposomas de lecitina de soja los preparamos como describieron Centeno y Gutiérrez-Merino (1992). La lecitina se disuelve previamente en etanol y se seca con nitrógeno. A continuación se resuspendió a una concentración de 30 mg/ml en Tris-HCl pH 7.5 y la sonicamos durante 5 minutos. La sonda fluorescente 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) la añadimos a 1 mg de liposomas de fosfatidilcolina en proporción molar lípido/DPH de 500:1. Para permitir que el DPH se incorpore a los liposomas, lo incubamos durante 2 h a 25°C en oscuridad.

Todas las medidas de fluorescencia se realizaron en un espectrofotómetro Hitachi-Perkin-Elmer 650-40 empleando el modo “ratio” y con las siguientes longitudes de onda: 360 nm para la excitación y 430 para la emisión. La polarización de la fluorescencia se calculó mediante la siguiente ecuación (Weber, 1966):

$$P(\lambda) = \frac{I(\parallel) - G(\lambda) \cdot I(\perp)}{I(\parallel) + G(\lambda) \cdot I(\perp)} \quad [2]$$

siendo  $I(\parallel)$  e  $I(\perp)$  las intensidades de fluorescencia medidas con los polarizadores en dirección paralela o perpendicular, respectivamente, y  $G(\lambda)$  el factor de corrección para la polarización característica de la emisión del monocromador del fluorímetro. Para los pares de longitudes de onda 360/430 ( $\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}}$  medidas en nm), obtuvimos

un valor de  $1'037 \pm 0'004$  con 10 medidas independientes. La anisotropía de fluorescencia ( $r_s$ ) la calculamos a partir de los valores de polarización empleando la ecuación siguiente (Weber, 1966):

$$r_s = 2P/(3 - P) \quad [3]$$

## MÉTODOS ESTADÍSTICOS

En las gráficas que se encuentran en esta tesis doctoral, los puntos representan la media  $\pm$  SEM de, al menos, tres experimentos independientes, cada uno de ellos por triplicado. La significación estadística de los datos se evaluó mediante el cálculo del valor de  $p$  mediante un test  $t$  de dos colas no pareado. Para ello utilizamos en programa GraphPad Prism 2.01 (GraphPad Software, Inc.). Consideramos significativamente distintos del control aquellos resultados con una  $p < 0'05$ .



## **RESULTADOS**



**CARACTERIZACIÓN DE LAS VÍAS DE  
SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN LA APOPTOSIS  
NEURONAL INDUCIDA POR EL MEDIO  
CON BAJA CONCENTRACIÓN DE POTASIO**





## INTRODUCCIÓN

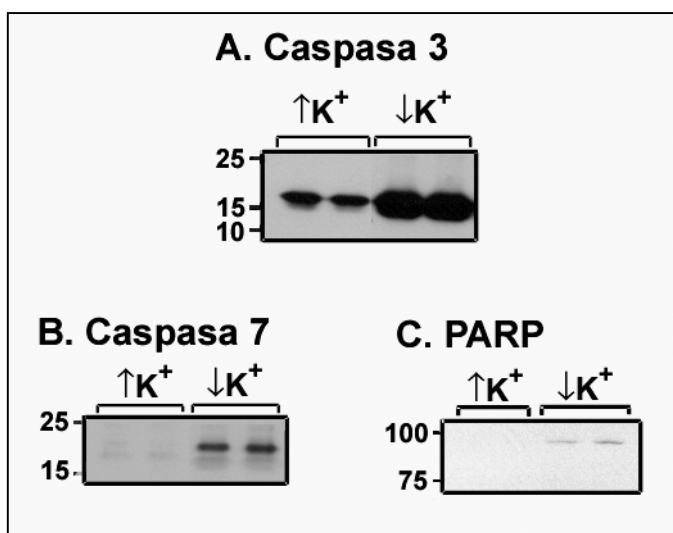
Como acabamos de ver en la Introducción general, durante el desarrollo del sistema nervioso de los vertebrados cerca de la mitad de las neuronas generadas mueren mediante el proceso de la apoptosis (ver revisiones de Oppenheim, 1991; y de Johnson y Deckworth, 1993). La muerte de poblaciones específicas de neuronas puede ser inhibida tanto *in vivo* como *in vitro* si se administran los factores de crecimiento apropiados, que en condiciones normales son producidos por las células a las que inervan estas neuronas (Pilar y Landmesser, 1976; Martin y cols., 1988; Sendter y cols., 1992). Esta dependencia de la disponibilidad de factores de supervivencia extracelulares también se ha observado en otros tipos celulares no neuronales (Krypaniou e Isaacs, 1988; Araki y cols., 1990; Koury y Bondurant, 1990; Cohen, 1991; Barres y cols., 1992). Estos hechos han llevado a pensar que la supervivencia de una célula determinada está regulada por las señales que continuamente les suministran las otras células (Oppenheim, 1991; Altman, 1992; Raff, 1992). En ausencia de estos factores externos, la célula entraría en apoptosis.

Las células granulares de cerebelo (CGC) son la población más abundante de neuronas del cerebro de mamíferos y suponen un sistema muy útil para estudiar los mecanismos de la muerte celular programada en el sistema nervioso central (Ito, 1984a). Cuando se obtienen a partir de ratas de 7 u 8 días de vida, las CGC se diferencian *in vitro* y adquieren las características morfológicas, bioquímicas y electrofisiológicas de las neuronas maduras (Levi y cols., 1984; Balázs y cols., 1987; Hockberger y cols., 1987; Cull-Candy y cols., 1988). En los cultivos primarios de estas células, la supervivencia de las neuronas maduras, aunque no para las inmaduras, depende de la presencia en el medio extracelular de elevadas concentraciones de  $K^+$  (+KCl) (Lasher y Zaigon, 1972; Gallo y cols., 1987). Se ha visto además, que si un cultivo mantenido en un medio +KCl (25 mM de  $K^+$ ) se cambia a un medio con concentraciones más fisiológicas de este catión (5 mM) inducimos la muerte del mismo por apoptosis (D'Mello y cols., 1993). La apoptosis causada por este medio (-KCl) se previene tanto por el IGF-1 como por el AMPc, pero no por otros factores de crecimiento (D'Mello y cols., 1993). De hecho, existen evidencias que sugieren que el IGF-1 podría ser el factor neurotrófico fisiológico de estas neuronas (Calissano y cols., 1993).

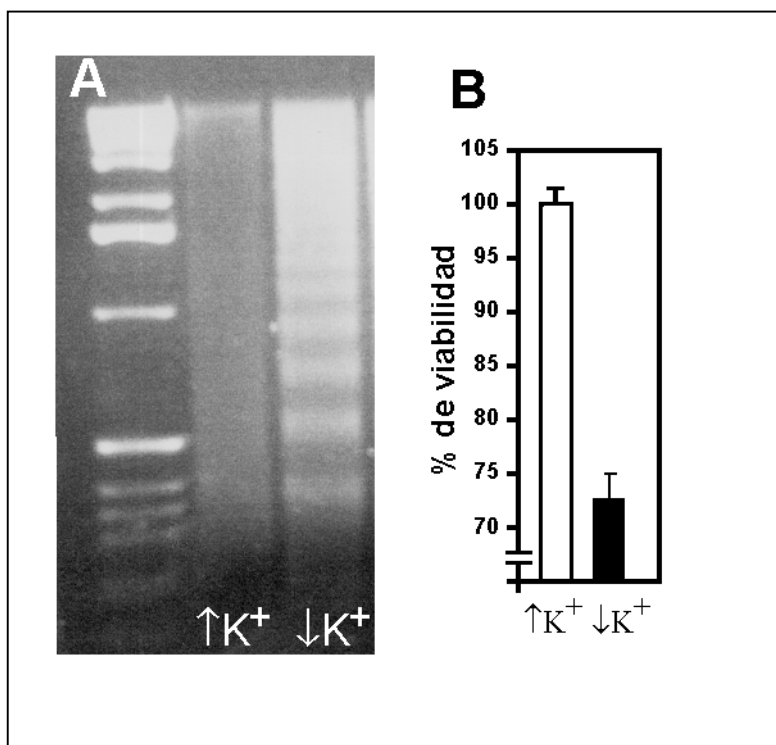
En este primer capítulo vamos a estudiar las características de la apoptosis producida en los cultivos de CGC por el cambio a un medio  $-KCl$ . Además emplearemos las medidas de viabilidad de los cultivos en presencia de inhibidores de diferentes proteína quinasas para intentar dilucidar que vías de transducción de señales están implicadas tanto en la supervivencia de los cultivos como en la inducción de la apoptosis por el cambio al medio  $-KCl$ .

## RESULTADOS

En cultivos de CGC mantenidos en medio  $+KCl$  ( $K^+ = 25$  mM), se ha descrito que se puede inducir la muerte por apoptosis de los mismos al cambiar a un medio con concentraciones fisiológicas de  $K^+$  (5 mM) (D'Mello y cols., 1993). Por ello, lo primero que hicimos fue intentar caracterizar las condiciones apoptóticas en las que teníamos nuestros cultivos. Como podemos ver en la figura 8 a las 24 h del cambio al medio proapoptótico ( $-KCl$ ) observamos la aparición de las formas proteolizadas y activas de tres de las enzimas típicas de la apoptosis: las caspasas 3 y 7 y la PARP. Esto nos indica que estamos induciendo apoptosis y que la muerte del cultivo de CGC no se está produciendo por necrosis. Además, como se puede ver en la figura 9A, se produce la típica fragmentación del ADN y la salida al citoplasma de estos fragmentos internucleosomales. Midiendo la viabilidad de los cultivos en estas condiciones por el método de la reducción del MTT (Mosmann, 1983) corroboramos los datos que acabamos de mostrar, disminuyendo la viabilidad del cultivo de CGC en medio  $-KCl$  a un 70-75% (Figura 9B).



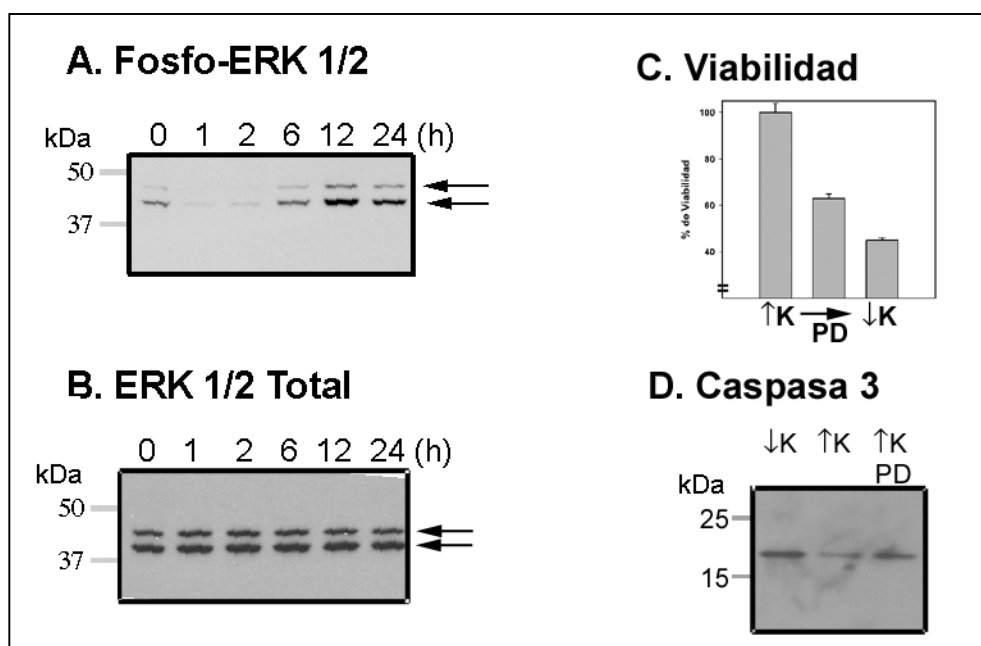
**Figura 8. Detección de las proteínas efectoras de la apoptosis inducidas por el medio  $-KCl$ .** A las 24 h del cambio al medio  $-KCl$  se obtuvieron los lisados para la detección por anticuerpos de la caspasa 3 (A), la caspasa 7 (B) y la PARP (C) en sus formas proteolizadas (activas).



**Figura 9. Inducción de la apoptosis en CGC inducida por el medio -KCl. (A)** La fragmentación del ADN se estudió a las 24 h del cambio al medio -KCl mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1'4%. **(B)** Además, a las 24 h, se midió la viabilidad de los cultivos a los que se cambió a medio +KCl (barra blanca) o -KCl (barra negra).

En líneas celulares de tipo neuronal, se ha visto que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , inducida por las concentraciones despolarizantes de  $\text{K}^+$ , activa la vía de las ERK a través de la activación de la calmodulina (CaM) (Egea y cols., 1998; Egea y cols., 1999). De ahí que decidiéramos comprobar en nuestros cultivos, que se encuentran en un medio con concentraciones despolarizantes de  $\text{K}^+$  (25 mM), la dependencia de la vía ERK (ver Figura 5 en la Introducción general de la tesis). Como se puede ver en la figura 10A, tras el cambio al medio -KCl se produce una desfosforilación de las quinasas ERK1 y 2. Este cambio no parece deberse a una variación en la cantidad de proteínas ya que el nivel total de ERK 1 y 2 permanece constante (Figura 10B). Como la fosforilación de estas quinasas está mediada por las quinasas MEK 1 y 2 (Sturgill y cols., 1988; Payne y cols., 1991) decidimos estudiar su participación en la supervivencia de los cultivos en medio +KCl. Para ello añadimos el inhibidor de dichas proteína quinasas, PD18342, a una concentración de 2  $\mu\text{M}$ . Tras 24 h de incubación medimos la viabilidad (Figura 10C) y comprobamos como se redujo hasta valores similares a los de los cultivos cambiados al medio -KCl. Además, parece haber también una cierta activación de la caspasa 3 por lo que el fenómeno se asemeja bastante a la apoptosis inducida por el cambio al medio -KCl (Figura 10D).

Uno de los sustratos de las quinasas ERK 1 y 2 es la Kinasa de la proteína ribosomal S6 (RSK). Se suele activar, por fosforilación, a través de la vía ERK en respuesta a diversos factores de crecimiento y neurotransmisores (Lazar y cols.,



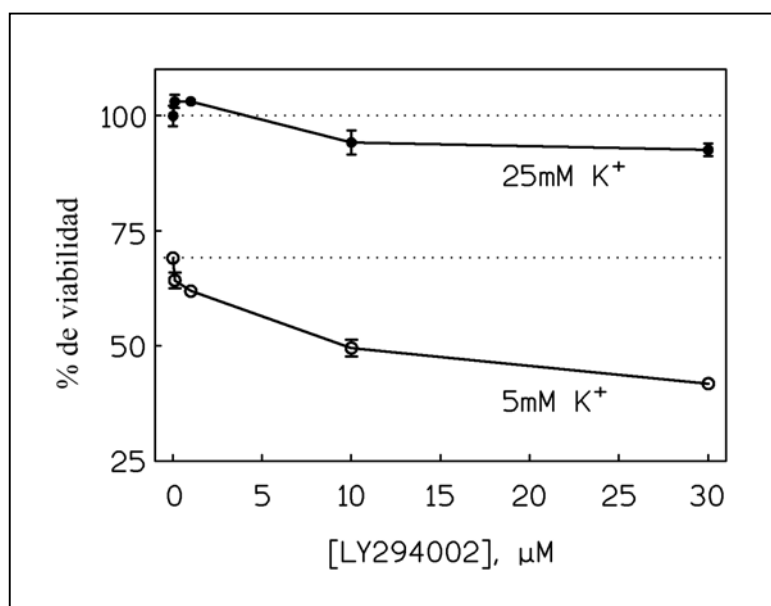
**Figura 10. Implicación de la vía ERK en la apoptosis inducida por el medio -KCl.** Tras el cambio al medio -KCl obtuvimos los lisados a distintos tiempos para detectar el grado de fosforilación (A) y la cantidad total (B) de las quinasas ERK 1 y 2. A las 24 h tras el cambio de medio se midió la viabilidad de los cultivos (C) y se obtuvieron lisados para detectar la caspasa 3 proteolizada (D) tanto en el medio -KCl como en +KCl tanto en presencia como en ausencia del inhibidor de las MEK1 y 2, PD18342 a una concentración 2  $\mu$ M final.

1995; Frodin y cols., 1999). En la tabla 4 podemos ver que la desfosforilación observada en ERK se corresponde bien con la disminución de la actividad de la RSK. El hecho de que la actividad de la RSK en el medio -KCl se pueda activar por el TPA nos indica que lo que se está produciendo no es una pérdida de proteína, sino una verdadera inactivación.

Como existen datos que muestran el papel fundamental de la vía de la PI3K en la supervivencia de los cultivos de CGC (Miller y cols., 1997), decidimos estudiar el efecto de los inhibidores sobre la viabilidad de los mismos. Así comprobamos que los inhibidores de la PI3K (wartmanina y LY294002) tenían sólo un ligero efecto sobre la viabilidad de los cultivos mantenidos en medio +KCl. Como se puede ver para el caso del LY294002, en la figura 11, la viabilidad se reduce en un 5-10%, por lo que, en principio, no lo podemos considerar significativo. Sin embargo, en -KCl dicho inhibidor disminuye los valores de viabilidad a concentraciones que inhiben la

Condiciones	Actividad RSK (c.p.m.)
↑ K <sup>+</sup>	3075 ± 538
↓ K <sup>+</sup>	1412 ± 317
↓ K <sup>+</sup> + TPA 10 min	11397 ± 1012

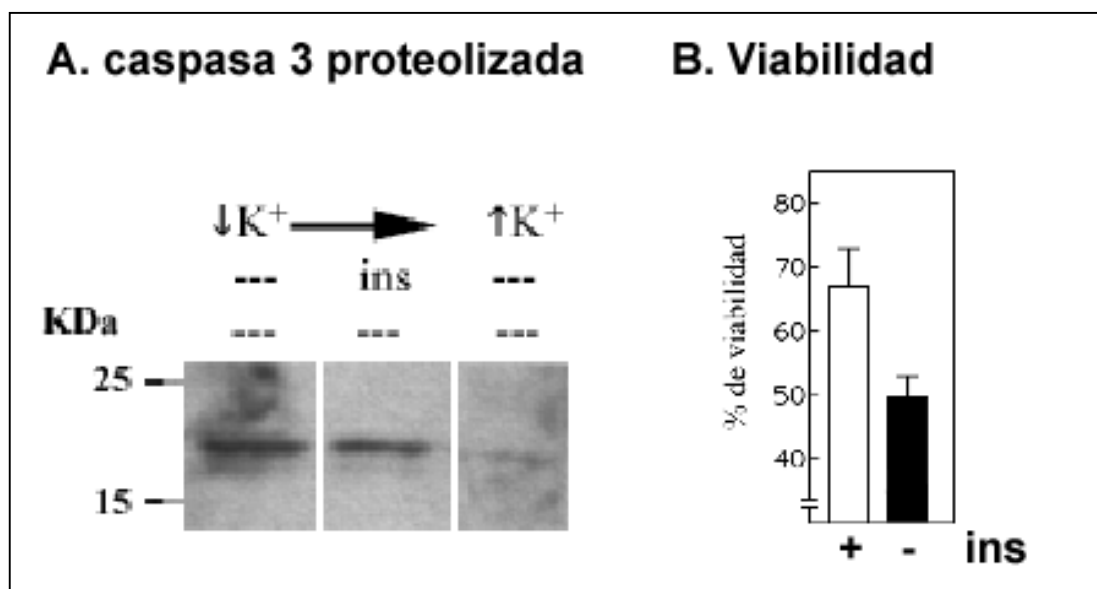
**Tabla 4. Actividad de RSK.** Los lisados se obtuvieron a las 24 h tras el cambio de medio. Además a las 24 h se estimuló durante 10 min el cultivo en -KCl con TPA.



**Figura 11. Efecto del LY294001 en la viabilidad de las CGC en presencia de 5  $\mu\text{g/ml}$  de insulina.** Los círculos negros se corresponden con el medio +KCl y los blancos con el -KCl. La viabilidad se midió a las 24 h de la adición del LY294002.

actividad de la PI3K. Estos resultados nos sugieren que la PI3K es necesaria para la viabilidad de los cultivos en -KCl, pero no es esencial para los mantenidos en +KCl. En este punto es importante destacar que tanto en el medio +KCl como en el medio proapoptótico -KCl hay presente insulina a una concentración de 5  $\mu\text{g/ml}$ , cuyo efecto sobre la viabilidad debería ser bloqueado por la presencia del inhibidor LY294002.

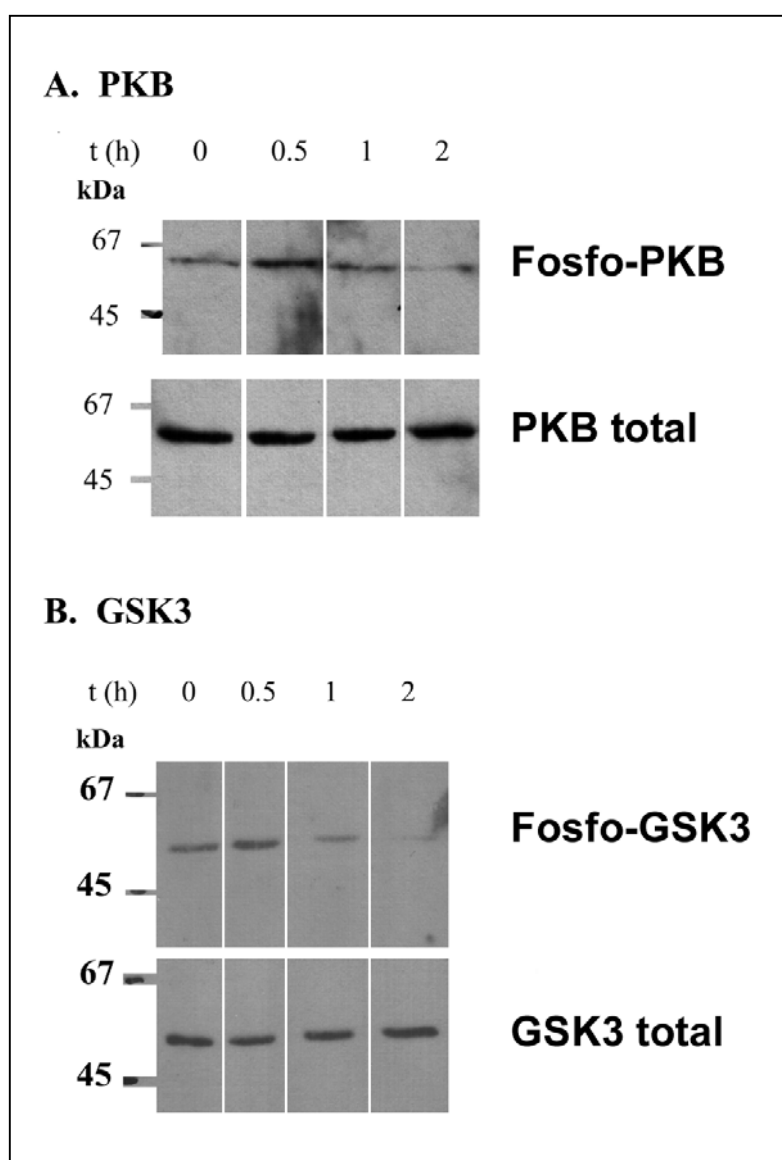
A este respecto, hay que hacer notar que tras 24 h de incubación en el medio



**Figura 12. Efecto de la insulina sobre la apoptosis inducida por el medio -KCl.** Consideramos el 100% de viabilidad a los cultivos en +KCl con 5  $\mu\text{g/ml}$  de insulina. Sin insulina la viabilidad disminuye un 5-10%. **(B)** La barra blanca representa el medio -KCl con insulina y la barra negra sin insulina. **(A)** Los lisados para la detección de la caspasa 3 proteolizada se obtuvieron a las 24 h tras el cambio de medio

proapoptótico  $-KCl$ , la viabilidad del cultivo en ausencia de insulina es alrededor del 45%, mientras que en su presencia (5  $\mu g/ml$ ) aumenta hasta un 70%, mostrando el efecto neuroprotector de la insulina (Figura 12B). Empleando diferentes concentraciones de la misma calculamos una  $CE_{50}$  aparente para la neuroprotección de la insulina de  $75 \pm 4$  nM. Además, en la figura 12A, podemos comprobar que la protección de la insulina en los cultivos mantenidos en el medio  $-KCl$  no se debe al bloqueo de la activación de la caspasa 3, ya que ésta se proteoliza, al igual que en ausencia de insulina.

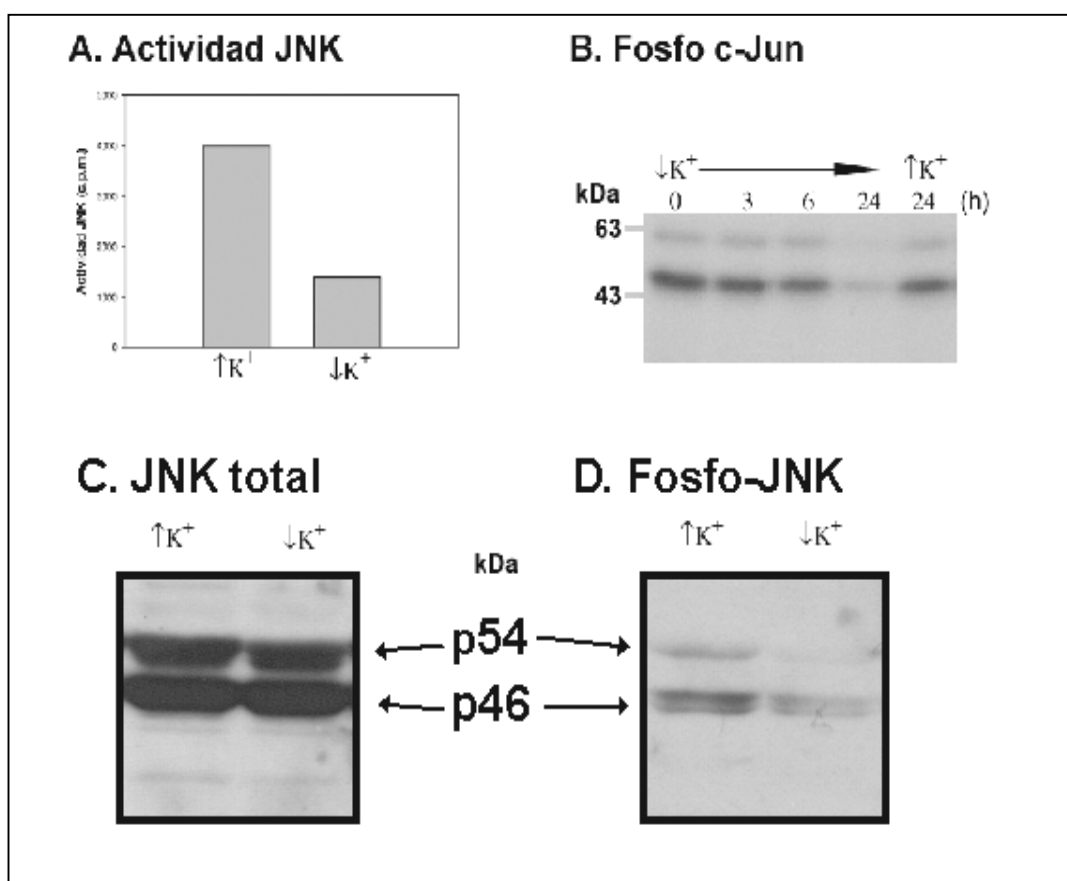
A pesar de que los resultados obtenidos con los inhibidores de la PI3K no eran demasiado prometedores decidimos estudiar el efecto que tenía el cambio al medio con baja concentración de potasio ( $-KCl$ ) sobre la vía PI3K, al igual que acabábamos de hacer con la vía de ERK. Para ello estudiamos el grado de fosforilación de la PKB



**Figura 13. Desfosforilación de PKB y GSK3 inducida por el medio  $-KCl$ .** Tras 7 DIV, el cultivo de CGC fue cambiado al medio  $-KCl$  con y los lisado fueron obtenidos en los tiempos indicados. El western blot se reveló empleando anticuerpos específicos frente a la PKB total y fosforilada (A) o frente a la GSK3 $\alpha$  total o fosforilada (B).

y de su sustrato la GSK3 (ver figura 3 en la Introducción general de esta tesis). Como se puede observar en la figura 13, al igual que pasaba con ERK, el cambio al medio proapoptótico  $-KCl$ , aún en presencia de insulina, induce la desfosforilación de ambas proteína quinasas, lo que se traduciría en la inhibición de la actividad de la PKB y la activación correspondiente de la GSK3. Esto lleva a pensar que el cambio de medio provoca la desaparición de los efectos antiapoptóticos de la PKB e induce los efectos proapoptóticos de la GSK3.

Sin embargo, como ya hemos visto en la Introducción general de esta tesis, el fenómeno apoptótico se caracteriza por el desbalance de señales de transducción tanto proapoptóticas como antiapoptóticas. Como ya se ha descrito el papel de la vía JNK (ver Figura 6 en la Introducción) en la apoptosis inducida por el cambio al medio  $-KCl$  (Watson y cols., 1998), decidimos comprobarlo en nuestras condiciones. En la figura 14A observamos que la actividad de JNK se reduce a la mitad a las 24 h

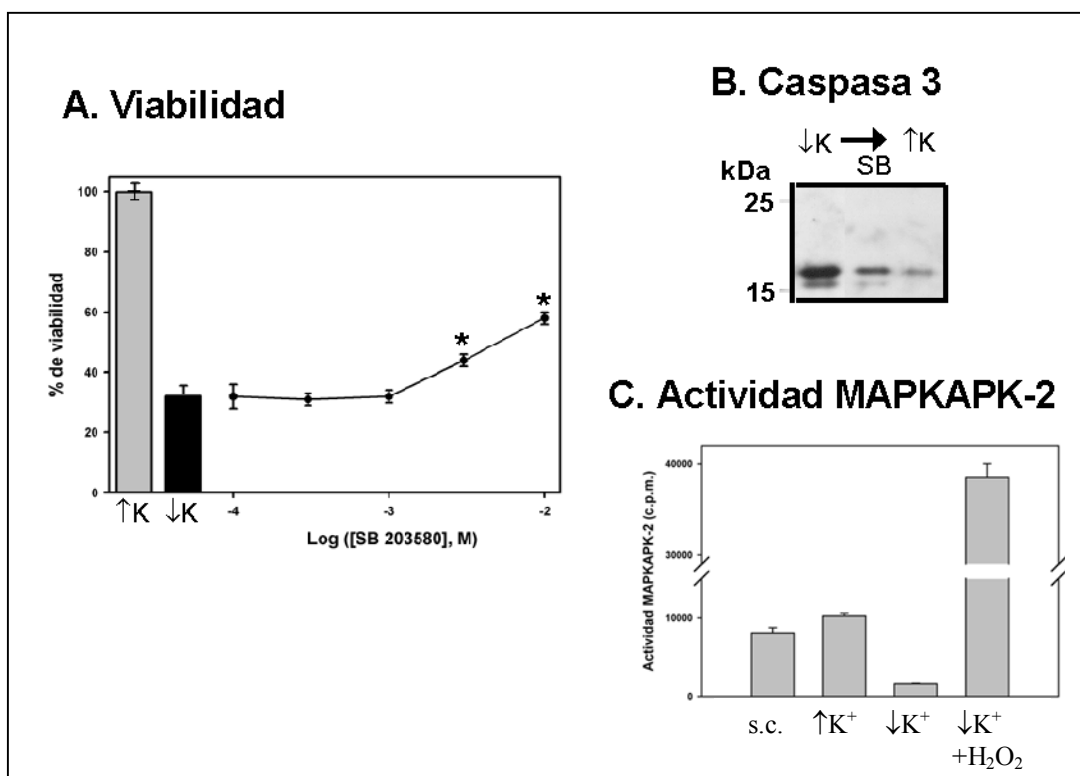


**Figura 14. Implicación de la vía JNK en la apoptosis inducida por el medio  $-KCl$ .** Tras el cambio de medio se obtuvieron lisados a diferentes tiempos. **(A)** Actividad de JNK a las 24 h del cambio al medio  $+KCl$  o  $-KCl$ . **(B)** Detección del grado de fosforilación de c-Jun, utilizado como sustrato el mismo del ensayo *in vitro*, pero revelando su estado de fosforilación mediante western blot. Los lisados obtenidos a las 24 tras el cambio de medio se emplearon también para detectar mediante western blot JNK total **(C)** o fosforilado **(D)**.

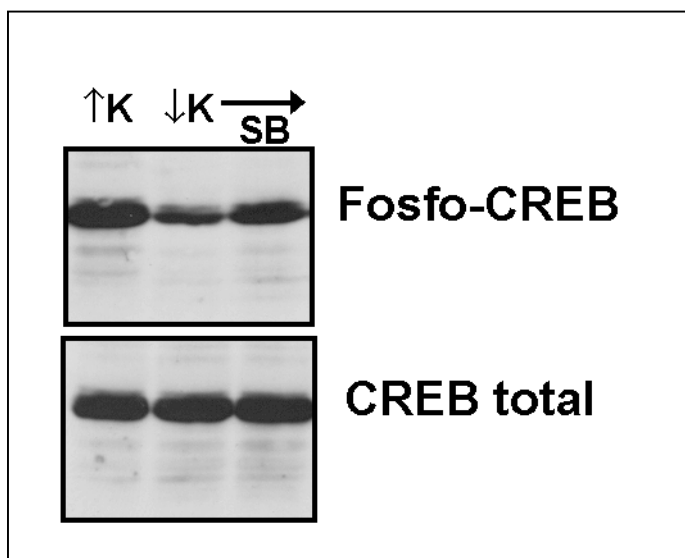


del cambio al medio proapoptótico  $-KCl$ , lo cual se ve reflejado, cuando medimos su actividad *in vitro*, en el grado de fosforilación de las dos formas de su sustrato c-Jun (Figura 14B). Como sabemos que JNK se activa por fosforilación (Whitmarsh y Davis, 1998), estudiamos si esta disminución de la actividad de JNK se correspondía con una disminución en su grado de fosforilación. Como podemos ver en la figura 14C y D, aunque la cantidad total de JNK no parece cambiar, a las 24 tras el cambio al medio  $-KCl$ , se produce una disminución de su grado de fosforilación que se correspondería bien con la actividad reflejada en la figura 14A y B.

Por otro lado, con el inhibidor de la p38, SB 203580 (Cuenda y cols., 1995), se obtuvieron unos resultados significativos. Como se puede ver en la figura 15, la adición de SB 203580 a  $10 \mu M$  aumenta significativamente la viabilidad de los cultivos cambiados al medio  $-KCl$ , disminuyendo en cierta medida la aparición de la caspasa 3 proteolizada (Figura 15B). Para ver la especificidad de la inhibición por el SB 203580, realizamos una titulación de dicho inhibidor (Figura 15A). En ella



**Figura 15. Implicación de la vía p38 en la apoptosis inducida por el medio  $-KCl$ .** (A) A la vez que se realizó el cambio al medio  $-KCl$  (barra negra) se añadieron distintas concentraciones de SB 203580 ( $0.1$  a  $10 \mu M$ ) (círculos negros). La viabilidad se midió a las 24 h, al igual que se obtuvieron los lisados para la detección de la caspasa 3 proteolizada (B). (C) La actividad MAPKAPK 2 se midió a las 24 h tras el cambio de medio y la estimulación con  $H_2O_2$  se realizó durante 10 min en cultivos que se encontraban en  $-KCl$ . \*: significativamente ( $p < 0.05$ ) distinto de  $-KCl$ .



**Figura 16. Fosforilación del factor de transcripción CREB.** Los lisados se obtuvieron 24 h tras el cambio de medio. El SB 203580 se utilizó a 10  $\mu$ M añadiéndose en el momento del cambio de medio.

podemos ver que sólo son significativas las diferencias usando las concentraciones de 3 y 10  $\mu$ M. Al ser la  $CI_{50}$  de 600 nM (Cuenda y cols., 1995), estos resultados parecen indicar que el efecto pudiera deberse a la inhibición de alguna otra enzima sensible a la acción del SB203580. De hecho, midiendo la actividad del sustrato de la p38, la MAPKAPK 2, se ve una inhibición de esta ruta de transducción, en lugar de la esperada activación, tras el cambio al medio -KCl (Figura 15C).

Como uno de los sustratos de la vía p38 implicados en la viabilidad de los cultivos de CGC es el factor de transcripción CREB (Xing y cols., 1996; Tan y cols., 1996), decidimos estudiar su grado de fosforilación en nuestras condiciones. En la Figura 16 observamos que el cambio al medio -KCl induce la desfosforilación de CREB, evitándose en presencia de SB 203580 10  $\mu$ M. Aunque la disminución de la fosforilación de CREB se corresponda bien con la bajada observada en la actividad de la vía de la p38 (Figura 15), el hecho de que el inhibidor de la misma SB 203580 active la fosforilación de CREB, apunta de nuevo a la inhibición inespecífica de alguna otra enzima de las vías que fosforilan también al factor de transcripción estudiado: ERK vía RSK, PI3K/PKB, calmodulina quinasa II o PKA (González y Montminy, 1989; Sheng y cols., 1991; Deak y cols., 1998).

## DISCUSIÓN

Los cultivos primarios de CGC son un modelo ampliamente empleado para el estudio de la apoptosis neuronal (Ito, 1984a). Tras su maduración durante 7 días en medio +KCl, se induce fácilmente la apoptosis al cambiarlas a un medio con bajas concentraciones de potasio (-KCl) (D'Mello y cols., 1993). Como hemos visto en las figuras 8 y 9, se produce la activación de las caspasas efectoras 3 y 7, se proteoliza la PARP y se fragmenta el ADN liberándose al citoplasma. Todo esto se traduce en una disminución de la viabilidad del cultivo medida por el método del MTT (Mosmann (1983). Esta correlación nos va a permitir emplear la medida de viabilidad como un buen indicador del fenómeno apoptótico en nuestros cultivos, facilitándonos enormemente su estudio.

Esta buena correlación volvió a ponerse de manifiesto cuando empleamos los inhibidores PD18342 (Figura 10) y SB203580 (Figura 15). Comprobamos que tanto el efecto neuroprotector, como la inducción de la muerte del cultivo se correspondían, respectivamente, con un bloqueo y con una activación de la proteólisis de la caspasa 3.

El hecho de que la inhibición de la PI3K con LY294002 reduzca la viabilidad de los cultivos mantenidos en el medio +KCl sugiere la implicación de dicha vía de transducción en la supervivencia neuronal. Estos resultados están de acuerdo con los de Miller y cols. (1997) en estas mismas células y que supusieron una de las primeras evidencias en este sentido. De hecho, nuestros resultados muestran que tras el cambio al medio proapoptótico -KCl se produce la desfosforilación tanto de la PKB como de la GSK3. Esto concuerda con lo esperado para un proceso apoptótico: al inactivarse la PKB todos los efectos antiapoptóticos descritos para la misma están desapareciendo en nuestro sistema. Esto podría ser suficiente para explicar la apoptosis inducida por el cambio de medio. Pero debemos añadir además que los efectos proapoptóticos de la GSK3 se activan ya que, como hemos visto, el cambio de medio activa por desfosforilación a la GSK3 (Figura 13).

Los resultados de Miller y cols., (1997) muestran, sin embargo, una mayor sensibilidad al efecto del LY294002. Estas diferencias obtenidas respecto a nuestros resultados pueden deberse a que no añaden insulina al medio y por lo tanto esta vía se encuentra únicamente activada por las concentraciones despolarizantes de  $K^+$ . En este mismo trabajo, también describen la activación por despolarización de la vía de

ERK, aunque con el inhibidor de las quinasas MEK 1 y 2, PD 98059, no reducen los niveles de viabilidad del cultivo en +KCl. Nosotros encontramos un resultado idéntico con este mismo inhibidor, sin embargo, empleando otro inhibidor de la misma enzima, el PD 18342, si reducimos significativamente la viabilidad del cultivo (Figura 10). Además la desfosforilación de ERK que se produce tras el cambio al medio -KCl indica con bastante claridad la implicación de esta vía en la supervivencia del cultivo en condiciones despolarizantes. El hecho de que la despolarización de la membrana induzca la supervivencia de los cultivos de neuronas a través de la activación de ambas vías parece bastante claro (Yano y cols., 1998; Soler y cols., 1998), pero parece que la mayor o menor importancia de cada una de las dos vías dependen ya no sólo del tipo celular del que se trate, sino de las condiciones en las que se mantiene las células (factores de crecimiento, hormonas, etc.).

En nuestras condiciones de cultivo, la insulina (5 µg/ml) aumenta (alrededor de un 25%) la viabilidad del cultivo de CGC en medio -KCl (figura 12), lo cual coincide con experimentos previos que mostraban que el IGF-1 promueve la supervivencia de CGC en medio -KCl (D'Mello y cols., 1993; Miller y cols., 1997). Sin embargo, en nuestro estudio, la  $CE_{50}$  que hemos obtenido para la insulina (75 nM) es bastante mayor que la dosis protectora del IGF-1 para el mismo estímulo apoptótico obtenida por D'Mello y cols. (1993): 3 nM. Este dato nos sugiere que la insulina está promoviendo la supervivencia al interaccionar con los receptores de tipo IGF por los que tiene una menor afinidad que el propio IGF-1 y 2. Este fenómeno ya ha sido descrito en tejidos de tipo conectivo y musculoesquelético (Hill y Milner, 1985).

En la figura 11 hemos visto claramente que en nuestras condiciones de cultivo la señal de supervivencia inducida por la insulina en el medio -KCl es dependiente de la actividad PI3K, con una  $K_{0.5}$  para el LY294002 de 5 µM. Esto significa que en presencia de insulina, la PI3K en los cultivos de CGC en medio -KCl se encuentra activa.

Aunque los datos publicados hasta la fecha muestran que en cultivos de CGC la apoptosis se acompaña con un activación de la vía JNK (Shimoke y cols., 1999; Yamagishi y cols., 2001), nuestros datos muestran lo contrario. Sin embargo, en otros sistemas se ha relacionado la actividad protectora del litio, el cual protege de

este tipo de apoptosis a las CGC, con su capacidad de activar esta vía (Yuan y cols., 1999). De todas formas, tanto las activaciones como las desactivaciones de esta ruta son puntuales y dependen del momento en el que hayan obtenido los lisados para su medida. Para aclarar más la verdadera implicación, habría que realizar unos experimentos con muestras experimentales a diferentes tiempos, de forma más detallada y precisa. Además, habría que intentar aclarar el papel que puedan jugar las diversas isoformas de JNK en el proceso apoptótico.

Algo similar podría pasar con los experimentos obtenidos con la vía de la p38 ya que con la medida de la actividad MAPKAPK2 no podemos clarificar que isoforma de la p38 es la implicada. Aunque durante la realización de estos experimentos se publicó un artículo que relacionaba la p38 con la viabilidad usando el inhibidor SB203580 (Harada y Sugimoto, 1999), nuestros experimentos muestran con claridad que este efecto, muy probablemente, se deba a la inhibición inespecífica de alguna otra quinasa.

**PROTECCIÓN POR EL LITIO DE LA APOPTOSIS  
NEURONAL INDUCIDA POR EL MEDIO  
CON BAJA CONCENTRACIÓN DE POTASIO**



## INTRODUCCIÓN

Como hemos visto en el capítulo anterior la inducción de la apoptosis de cultivos de células granulares de cerebelo (CGC) por el cambio a un medio con baja concentración de potasio (5 mM) es un sistema proapoptótico ampliamente utilizado. D'Mello y cols. (1994) estudiaron el efecto del litio sobre el desarrollo y la supervivencia de este tipo de cultivos de CGC, viendo que tenía un efecto protector sobre los cultivos maduros de CGC en los que se inducía la apoptosis mediante la bajada de las concentraciones de  $K^+$ . Se ha visto que el litio afecta a las vías de transducción implicadas en la liberación de neurotransmisores y en la secreción de hormonas y factores de crecimiento (ver revisión de Berridge y cols., 1989). Aunque los mecanismos por los que el litio actúa no están claros, se creyó desde un principio que está implicada su inhibición del ciclo del fosfatidilinositol, el cual parece estar involucrado en la señalización de factores tanto neurotróficos como de crecimiento (Berridge y cols., 1989). A este respecto, los trabajos de Dixon y Hokin (1997) mostraron que en preparaciones de córtex de rata, el litio, por un lado aumentaba la liberación de glutamato, y por otro, incrementaba la acumulación de inositol-(1,4,5)trifosfato ( $IP_3$ ). Esto último causaba la depleción de la concentración de inositol intracelular. La hipótesis de la depleción del inositol para explicar la acción farmacológica del litio (Berridge y cols., 1989) fue, por tanto, una de las primeras en proponerse.

Por otro lado, está generalmente aceptado que los antidepresivos, entre los que se encuentra el litio, ejercen su acción estabilizadora del humor por la desregulación gradual y selectiva de determinados receptores. En este punto, el hecho de que el litio estimule la liberación de glutamato, principal neurotransmisor de las neuronas granulares (Garthwaite y cols., 1986), estimulando a sus receptores, ha hecho sugerir que esta estimulación podría tener relevancia terapéutica, sobre todo a través del receptor de NMDA (Dixon y Hokin, 1997).

Sin embargo, y aunque el litio se lleva utilizando en psiquiatría desde hace muchos años para el tratamiento de los trastornos bipolares (Manji y cols., 1995; Lenox y Hahn, 2000), sus dianas terapéuticas a nivel bioquímico aún se desconocen (Jope, 1999).

Desde que se vio que el litio protegía frente a la apoptosis inducida por el medio  $-KCl$  (D'Mello y cols., 1994), no sólo se ha confirmado este punto (Grignon y cols.,



1996; Ciani y cols., 1997), si no que se ha ampliado su efecto protector a otros estímulos apoptóticos: glutamato (Chen y Chuang, 1999; Chalecka-Franaszek y Chuang, 1999), C<sub>2</sub>-ceramida (Centeno y cols., 1998),  $\beta$ -amiloide (Muñoz-Montaño y cols., 1997; Álvarez y cols., 1999), radiación ultravioleta (Inouye y cols., 1995), isquemia (Nonaka y Chuang, 1998), así como estaurosporina y choque térmico (Bijur y cols., 2000).

El hecho de que el litio sea un inhibidor de la GSK3 (Klein y Melton, 1996; Stambolic y cols., 1996) se ha empleado para explicar su efector neuroprotector, ya que se ha visto que la activación de GSK3 sobreexpresada en células neuronales promueve señales proapoptóticas (Pap y Cooper, 1998; Cohen, 1999; Bijur y cols., 2000; Li y cols., 2000). Aunque esta es la hipótesis actualmente aceptada, considera a la GSK3 como una enzima constitutivamente activa, sin tener en cuenta que se encuentra sometida a regulación. Esta enzima es inhibida por los efectores que activan la vía de transducción PI3K/PKB, como puedan ser la insulina o los factores de crecimiento (Cross y cols., 1995; Alessi y Cohen, 1998). La PKB va a inducir su inhibición mediante la fosforilación del residuo serina 9 (en la GSK3 $\beta$ ) o en la serina 21 (en la GSK3 $\alpha$ ) (Cross y cols., 1995; Welsh y cols., 1996; Shaw y cols., 1997). Sin embargo este no es el único mecanismo conocido por el que la PKB regula la apoptosis. Se sabe que esta serina/treonina quinasa fosforila a Bad (miembro de la familia de proteínas Bcl-2) en la serina 136 (Zha y cols., 1996; Datta y cols., 1997; DelPeso y cols., 1997).

Cuando Bad se encuentra desfosforilado se puede producir la activación de la procaspasa 9 por la liberación del citocromo c de la mitocondria (Green y Reed, 1998; Adams y Cory, 1998; Zou y cols., 1999). Entonces la caspasa 9 promovería la activación de otras caspasas como pueda ser la caspasa 3 (Slee y cols., 1999), la cual es la responsable de la proteólisis de gran cantidad de proteínas (Tewari y cols., 1995). Por esta razón, la medida de la actividad caspasa 3 puede emplearse como marcador bioquímico de la activación de la fase efectora de la apoptosis (Bijur y cols., 2000).

Respecto a la regulación de las cascadas de transducción de serina/treonina quinatas, tenemos que tener muy en cuenta el papel que juegan las distintas serina/treonina fosfatasa. Estas proteína quinatas se regulan unas a las otras por una fosforilación que es reversible y específica. Así, las proteína fosfatasa juegan un

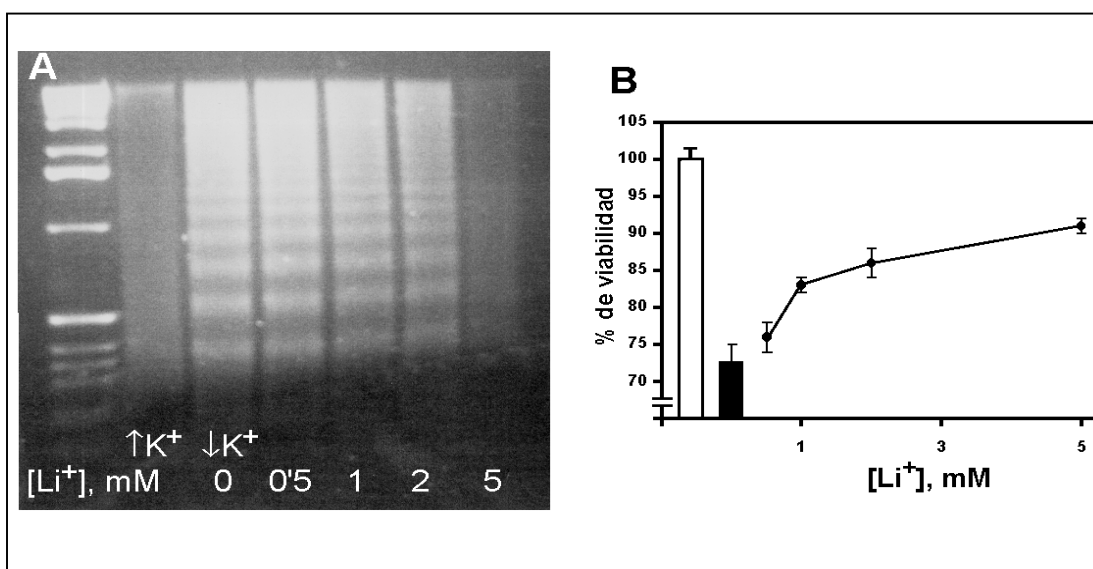
papel realmente importante a la hora de controlar tanto el grado de esta activación como su duración (Millward y cols., 1999).

En este capítulo vamos a intentar profundizar en los mecanismos moleculares por los cuales el litio ejerce su efecto como neuroprotector. Induiremos la apoptosis en los cultivos de CGC mediante el cambio al medio  $-KCl$ . Veremos como el medio  $-KCl$  induce la activación de la caspasa 3, así como promueve la desfosforilación de PKB y de GSK3. En presencia de litio (5 mM) estos efectos se verán bloqueados, lo cual nos llevará a proponer una nueva hipótesis a la hora de explicar los mecanismos neuroprotectores del litio. En ella juegan un papel importante las serina/treonina fosfatasas que se encuentran implicadas en la inactivación de la vía PI3K/PKB. Por ello, intentaremos dilucidar la implicación de los diversos tipos y su posible relación con el litio.

## **RESULTADOS**

En el capítulo anterior acabamos de comprobar, como ya describieron D'Mello y cols. (1993), que en cultivos de CGC mantenidos en medio  $+KCl$  se puede inducir la muerte por apoptosis al cambiar a un medio con concentraciones fisiológicas de  $K^+$  (5 mM) (D'Mello y cols., 1993). Así, tras caracterizar sucintamente las condiciones apoptóticas del modelo empleado, pasamos a estudiar el efecto del litio sobre este paradigma proapoptótico. A este respecto vemos, que la adición del litio en el momento del cambio de medio evita, en parte, la apoptosis de una forma dependiente de la dosis (Figura 17B), alcanzando el máximo de protección cuando la concentración es de 5 mM. Es a esta concentración cuando se observa la casi total desaparición de la fragmentación internucleosomal (Figura 17A), lo que nos indica una buena correlación entre los datos de fragmentación del ADN y los de viabilidad medida por el método del MTT. Esta acción protectora es específica del litio, ya que la adición de NaCl en iguales concentraciones no afecta a la viabilidad de los cultivos (datos no mostrados).

La caspasa 3 es una de las principales cisteína proteasas implicadas en la apoptosis. Confirmando los datos del capítulo anterior, comprobamos la activación de la caspasa 3 tras el cambio al medio  $-KCl$  (Figura 18A). Los lisados de CGC en el medio  $-KCl$  incubados con litio durante 24 h presentan un importante descenso en la



**Figura 17. Protección del litio frente a la apoptosis inducida por el medio -KCl.** (A) La fragmentación del ADN se estudió a las 24 h del cambio al medio -KCl con o sin la adición de litio mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1'4%. (B) Además se midió la viabilidad de los cultivos a los que se cambió a medio +KCl (barra blanca) o -KCl (barra negra). A este último se le añadieron distintas concentraciones de litio (círculos negros).

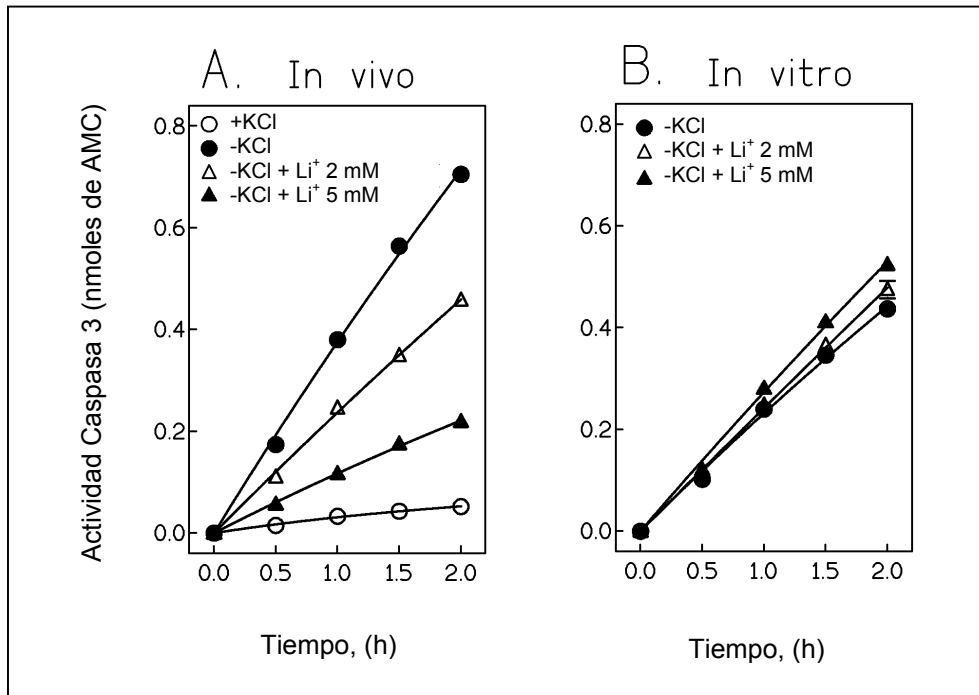
actividad de la caspasa 3 (Figura 18A), siendo este efecto dependiente de la concentración. Además hemos calculado la  $V_0$  de la catálisis del Ac-DEVD-AMC por la caspasa 3 (Tabla 5), mostrando claramente los datos que en condiciones del medio -KCl se aumenta su actividad unas 12 veces si se comparan con los datos de los cultivos mantenidos en +KCl. Nuestros datos muestran la inhibición de esta activación de una forma dependiente de la concentración de litio.

Una posible explicación para este efecto sería la de considerar al litio como un inhibidor directo de la caspasa 3. Para comprobarlo, estudiamos la capacidad del litio a la hora de inhibir la actividad caspasa 3 de lisados de cultivos en -KCl de CGC (Figura 18B). Sin embargo, no sólo no la inhibe, si no que se observa una ligera activación, lo que nos sugiere un mecanismo de acción más complejo que la simple

**Tabla 5.  $V_0$  de la actividad caspasa 3 en la apoptosis inducida por -KCl.**

Condiciones de cultivo	$V_0$ (pmol AMC/min)
+KCl	$0.51 \pm 0.05$
-KCl	$6.6 \pm 0.8$
-KCl + Li <sup>+</sup> 2 mM	$4.2 \pm 0.3$
-KCl + Li <sup>+</sup> 5 mM	$2.1 \pm 0.3$

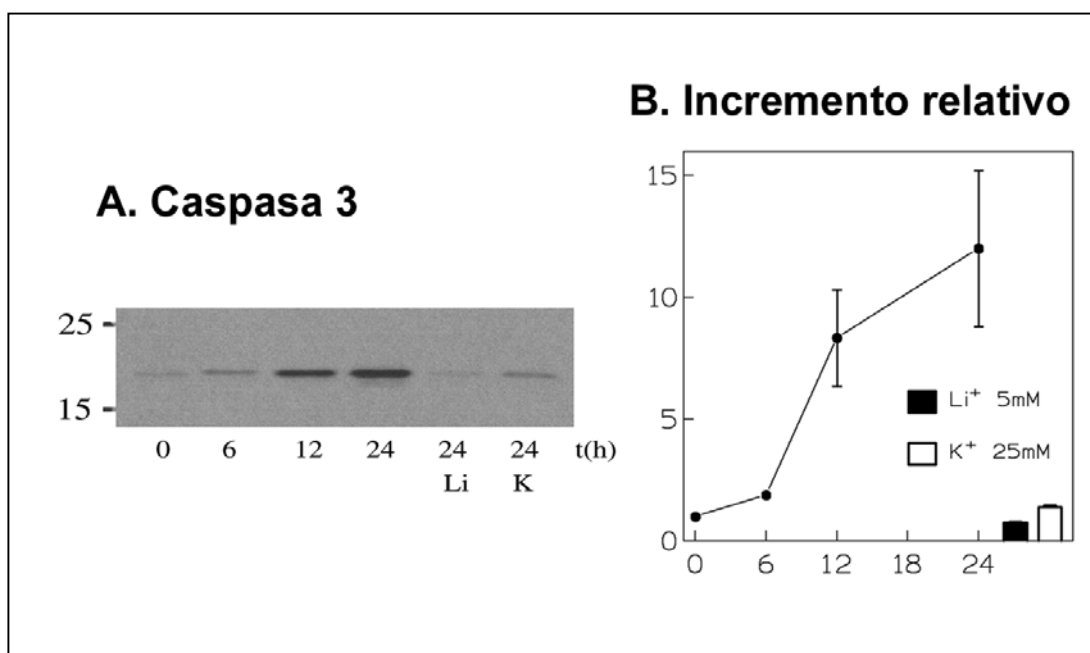
Los datos se corresponden a las mismas condiciones de la figura 18A.



**Figura 18. Efecto del litio en la actividad caspasa 3.** Los datos se ajustaron a la ecuación de una curva polinomial en cada una de las condiciones. **(A)** Tras 7 DIV, los cultivos de CGC se cambiaron a un medio +KCl (○) o a -KCl (●) y se obtuvieron los lisados a las 24 h. Se ensayaron dos concentraciones de litio en el medio: 2 mM (△) y 5 mM (▲) **(B)** Se obtuvieron los lisados de CGC en medio -KCl (●) a las 16 h tras el cambio y se ensayó la actividad caspasa 3 del cultivo con diferentes concentraciones de litio en el ensayo: 2 mM (△) ó 5 mM (▲).

inhibición directa.

Como la caspasa 3 se encuentra en forma de procaspasa 3 y sólo presenta actividad cuando es proteolizada (Thornberry y Lazebnik, 1998), decidimos estudiar más a fondo la inhibición de la proteólisis de la procaspasa 3 que ya habíamos detectado en el capítulo anterior (Mora y cols., 2001a y b). La figura 19A nos muestra los resultados del western blot empleando un anticuerpo que sólo reconoce la forma proteolizada de la caspasa 3. Tomando lisados de CGC en -KCl a diferentes tiempos, observamos como la forma activa de la caspasa 3 va aumentando. Cuantificando este incremento por densitometría, comprobamos que el aumento es dependiente del tiempo de exposición al estímulo apoptótico, llegando a un máximo a las 24 h, tiempo en el que el aumento es de unas 12 veces sobre el control en +KCl (Figura 19B). Se observa que el aumento de la forma proteolizada comienza a ser detectable a las 6h en el medio proapoptótico -KCl. En comparación, la incubación durante 24 h de litio 5 mM en -KCl nos presenta una banda de muy baja intensidad, comparable a la debida a la incubación durante 24 h en el medio +KCl (Figura 19A).

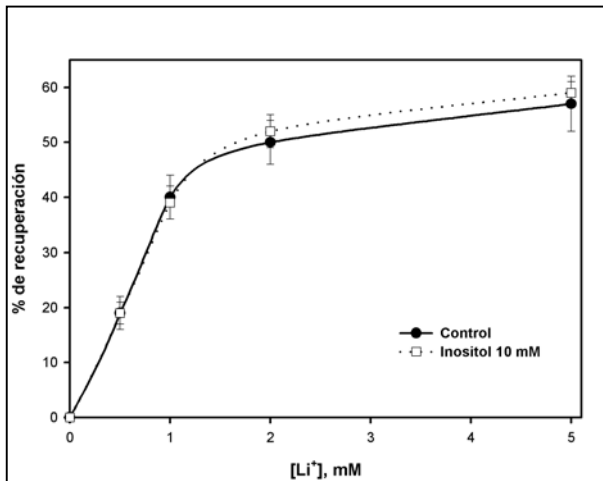


**Figura 19. Bloqueo por el litio de la activación proteolítica de la caspasa 3. (A)** Tras 7 DIV el medio de la CGC se cambió a +KCl o a -KCl con o sin litio 5 mM y los lisados se obtuvieron a diferentes tiempos. Los western blot (20  $\mu$ g de proteínas por cada calle) se realizaron con un anticuerpo que reconoce la forma proteolizada (activa) de la caspasa 3. **(B)** Resultado de la intensidad de las banda analizadas por densitometría.

Por tanto podemos concluir que el litio está impidiendo la activación proteolítica de la caspasa 3 actuando en algún punto anterior a esta activación en la señalización apoptótica inducida por el medio -KCl.

La activación de la caspasa 3 por el medio -KCl se produce incluso en presencia de insulina. Esto estaría de acuerdo con nuestros anteriores resultados de viabilidad (Mora y cols., 1999) en los que en -KCl sin insulina la viabilidad del cultivo de CGC cae un 50-60% y con insulina lo sigue haciendo, aunque los valores del descenso son algo menores (25-30%). En ambas circunstancias, el litio es capaz de proteger frente a la apoptosis inducida por el medio -KCl. Estos resultados, junto al hecho de que se active la caspasa 3 aun en presencia de insulina, nos apuntan a que, de algún modo, el medio -KCl está contrarrestando el efecto neuroprotector de la insulina descrito por la activación de la PKB (Marte y Downward, 1997; Miller y cols., 1997; Gleichmann y cols., 2000), mientras que el litio está evitando los efectos inducidos por el medio proapoptótico -KCl en los cultivos de CGC. Sin embargo, no está nada claro el modo en el que el litio está actuando.

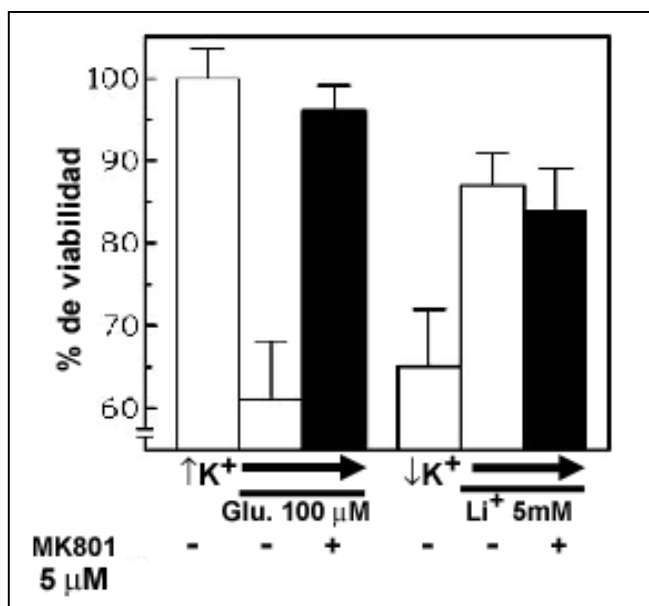
Se ha descrito que la inhibición de la mio-inositol monofosfatasa (IMPasa) por el litio podría tener relevancia terapéutica en el tratamiento de los trastornos bipolares. De ahí que se haya planteado la hipótesis de que el efecto protector del



**Figura 20. Efecto del inositol en la protección del litio frente a la apoptosis inducida por el medio -KCl.** Al mismo tiempo que se cambió al medio -KCl se añadió litio a distintas concentraciones tanto en ausencia (●) como en presencia de inositol 10 mM (○).

litio se debería a su inhibición sobre la IMPasa (Berridge y cols., 1989). Sin embargo, como muestra la figura 20, la adición de mio-inositol, que revertiría la depleción del mismo causada por la inhibición de la IMPasa, no afecta a la protección del litio sobre los cultivos sometidos al cambio al medio -KCl. Esto nos hace descartar esta hipótesis para la acción neuroprotectora del litio.

Se sabe que el litio y el valproato aumentan la liberación de glutamato y este efecto podría estar implicado en su actividad como fármacos antidepresivos (Dixon y Hokin, 1997). Por tanto, se ha pensado que su acción neuroprotectora pudiera ser consecuencia de la activación de algún receptor por parte del glutamato. Sin embargo, la inhibición de la actividad del canal de Ca<sup>2+</sup>, del propio receptor de NMDA, por parte del MK801 no es capaz de bloquear la capacidad del litio de proteger frente a la apoptosis (Figura 21). Y no se debe a que en nuestras condiciones no actúe, ya que el MK801 si es capaz de inhibir la acción neurotóxica del glutamato.



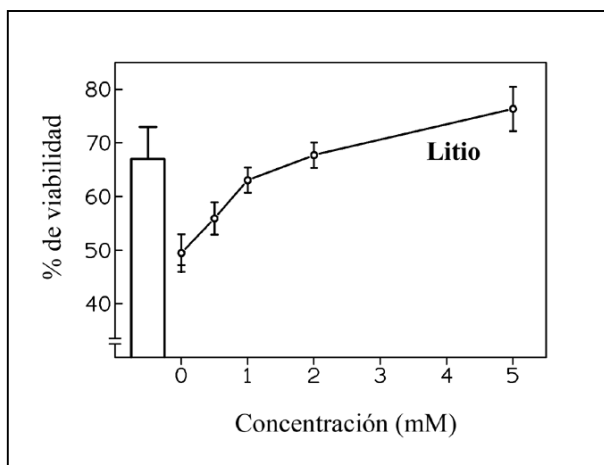
**Figura 21.- Efecto del MK801 en la acción del litio.** Una concentración 5 μM de MK801 (barras negras) no pudo disminuir significativamente la supervivencia inducida por el litio. Sin embargo, el MK801 bloquea los efectos tóxicos que produce el glutamato en el medio +KCl.

**Tabla 6. Efecto de diversos inhibidores sobre la neuroprotección del litio.** Se representa el % de viabilidad de los cultivos en medio  $-KCl$ . A todos ellos se les ha añadido  $Li^+$  5 mM y el inhibidor indicado durante 24 h. Entre corchetes la enzima a la que inhiben.

Control ( $Li^+$ 5 mM)	<b>MK 801</b> <b>5 <math>\mu M</math></b> [receptor NMDA] (Wong y cols., 1986)	<b>Wartmanina</b> <b>10 <math>\mu M</math></b> [PI3K] (Arcaro y Wymann, 1993)	<b>LY 294002</b> <b>30 <math>\mu M</math></b> [PI3K] (Vlahos y cols., 1995)	<b>SQ 22536</b> <b>300 <math>\mu M</math></b> [Adenilato ciclase] (Fabbri y cols., 1991)	<b>PD 98059</b> <b>50 <math>\mu M</math></b> [MEK1] (Alessi y cols., 1995)	<b>Rapamicina</b> <b>10 nM</b> [p70 S6Kinasa] (Braun y cols., 1995)
85%	84%	80%	77%	85%	82%	80%

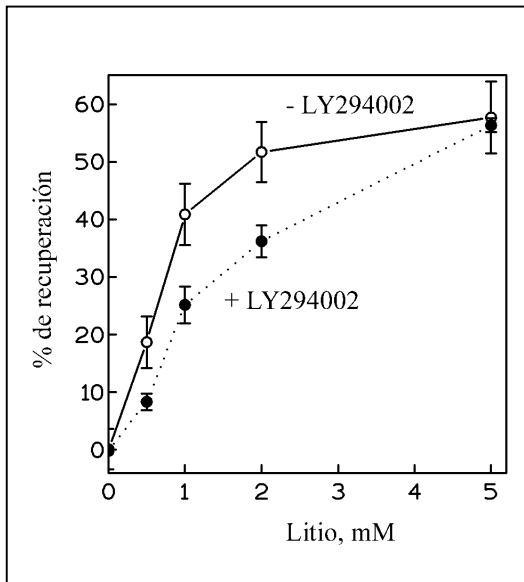
En vista de los anteriores resultados, decidimos probar una serie de inhibidores para intentar revertir la acción neuroprotectora del litio. Como podemos ver en la tabla 6, en principio no fuimos capaces de identificar ningún punto, de entre las señales de transducción estudiadas, como el implicado en la acción protectora del litio, ya que ningún inhibidor revierte totalmente la acción del mismo. Sólo los inhibidores que afectan a la vía de señalización de la insulina (wartmanina, LY294002 y rapamicina) parecen afectar algo a la acción protectora del litio. Sin embargo, debido a que también disminuían ligeramente la actividad de los cultivos mantenidos en medio  $+KCl$ , se puede descartar su efecto como verdaderos bloqueantes de la actividad neuroprotectora del litio.

Se ha visto que el tratamiento crónico con litio (Klein y Melton, 1996; Takahashi y cols., 1999) inhibe la actividad de la GSK3. Esta enzima es uno de los sustratos directos *in vivo* de la PKB, la cual promueve señales de supervivencia celular y protege frente a la apoptosis inducida por muy diferentes estímulos (Marte y Downward, 1997). Su activación en respuesta a factores de crecimiento (insulina, IGF-1, etc.) viene mediada por la PI3K. Por ello decidimos estudiar el papel que pudiera jugar esta vía de transducción en la supervivencia inducida por el tratamiento agudo con litio.



**Figura 22. Efecto de la insulina sobre la acción del  $Li^+$ .**

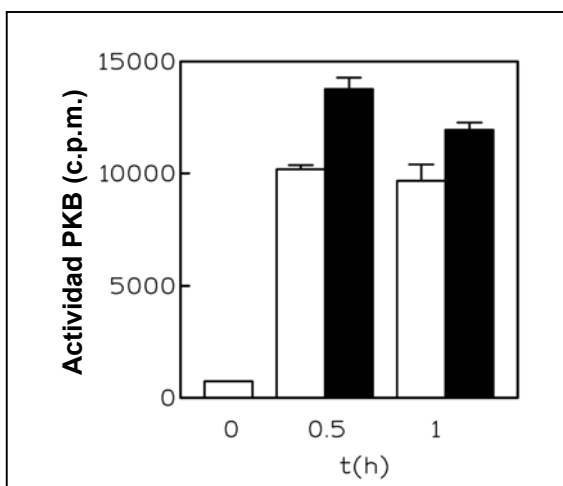
Consideramos el 100% de viabilidad a los cultivos en  $+KCl$  con 5  $\mu g/ml$  de insulina. Sin insulina la viabilidad disminuye un 5-10%. La barra representa el medio  $-KCl$  con insulina. Las diferentes concentraciones de  $Li^+$  (círculos) se añaden al medio  $-KCl$  sin insulina. 0 mM  $Li^+$  (círculo) se corresponde con  $-KCl$  sin insulina.



**Figura 23. Acción del LY294002 sobre la neuroprotección del litio en medio -KCl con 5 µg/ml de insulina.** 30 µM de LY294002 disminuye la viabilidad del control (+KCl) un 5-10%. La gráfica representa el efecto neuroprotector del litio en presencia (círculos negros) o en ausencia (círculos blancos) de 30 µM de LY294002.

La figura 22 representa la dependencia de la insulina para el efecto protector del litio. Los resultados en ausencia de insulina en el medio nos muestran que el litio, al igual que hacía en presencia de la misma, promueve la supervivencia de los cultivos de CGC en el medio -KCl. Estudiando más a fondo los datos respecto al LY294002 presentados en la tabla 6, en la figura 23 se puede observar que, a una concentración de 30 µM, no es capaz de bloquear la protección debida al litio en un medio -KCl con 5 µg/ml de insulina.

Para seguir investigando la implicación de esta vía de transducción, comprobamos la posibilidad de que el litio activara la PKB, fenómeno que había sido sugerido para explicar el efecto neuroprotector del litio en tratamiento crónico en cultivos de CGC expuestos a dosis apoptóticas de glutamato (Chalecka-Franaszek y Chuang, 1999). En la figura 24 podemos comprobar que tras la incubación de los cultivos en medio -KCl sin insulina la actividad de la PKB es muy baja. Tras la adición de insulina a este medio observamos una inducción de la actividad de la PKB



**Figura 24. Análisis del efecto del litio sobre la actividad PKB.** En el 6º DIV los cultivos de CGC fueron cambiados a un medio +KCl sin insulina e incubados durante toda la noche. Al 7º DIV incubados durante 1 h en -KCl sin insulina. Entonces, el medio fue cambiado a -KCl con insulina en presencia (barras negras) o en ausencia (barras blancas) de litio 5 mM. Los lisados para la medida de la actividad de la PKB se obtuvieron en los tiempos indicados tras el cambio al último medio de cultivo.



Tabla 7. Efecto *in vitro* del litio sobre la actividad de la PKB.

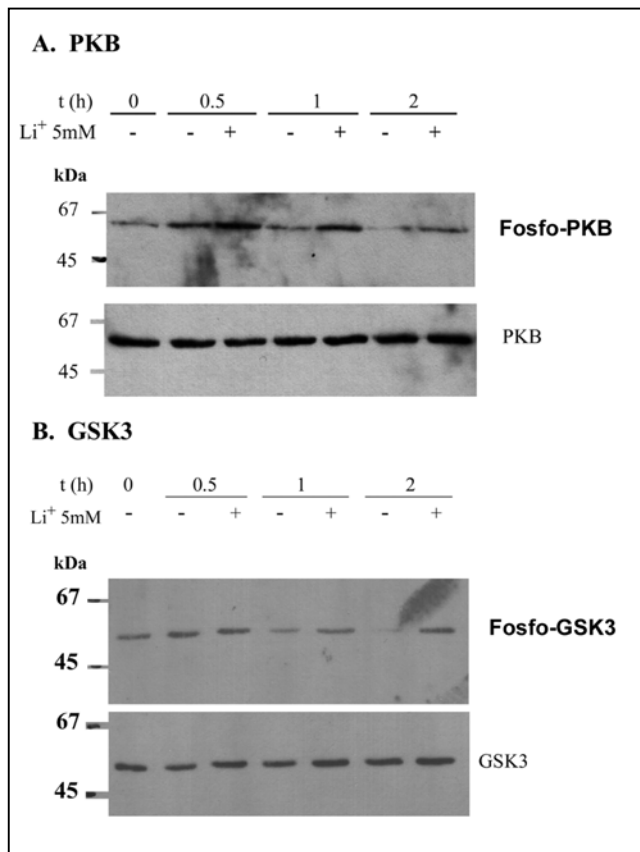
[Li <sup>+</sup> ], mM	% de actividad PKB
0	100 ± 5.6
2	110.8 ± 0.5
5	94.4 ± 8

En cultivos de CGC en los que la actividad de la PKB fue activada con insulina, la actividad de la PKB se midió añadiendo litio en el tampón de reacción a las concentraciones indicadas.

en nuestros lisados. Por su lado, el litio apenas induce un ligero aumento de la actividad PKB por encima de los valores de la insulina. *In vitro*, las medidas del efecto del litio sobre la actividad de la PKB nos confirman la incapacidad del ión para activar a la PKB (Tabla 7). Estos datos descartan la posibilidad de que el litio sea un activador directo de la PKB.

La activación de la PKB por la insulina también la podemos detectar por western blot (Figura 25A). La PKB en las condiciones iniciales se encuentra fosforilada (y por tanto activa), debido probablemente a la presencia del 10% de suero fetal bovino existente en el medio. De forma notoria comprobamos que el medio -KCl con insulina induce la desfosforilación de la PKB de forma dependiente del tiempo. Sin embargo, cuando añadimos litio a una concentración de 5 mM el estado de fosforilación de la PKB permanece inalterado (Figura 25A). Este resultado nos sugiere que el medio -KCl induce la activación de alguna actividad serina/treonina fosfatasa y que el litio impide esta activación.

Como la GSK3 es el principal sustrato de la PKB (Cross y cols., 1995; Welsh y cols., 1996; Shaw y cols., 1997) y el efecto neuroprotector del litio se ha llegado a explicar por sus efecto inhibitor sobre la misma (Klein y Melton, 1996; Stambolic y cols., 1996), decidimos comprobar si el litio afectaba al grado de fosforilación de la GSK3 tras la inducción de la apoptosis con el medio -KCl. Los resultados de la figura 25B nos muestran que -KCl también induce la desfosforilación de la GSK3 y en este caso su activación, dependientemente del tiempo. Tras 2 h de incubación en medio -KCl, la cantidad de GSK3 fosforilada es prácticamente indetectable, y dado que la cantidad de GSK3 total permanece constante durante este periodo, nuestros resultados sugieren que la GSK3 se activa por desfosforilación en el medio -KCl.

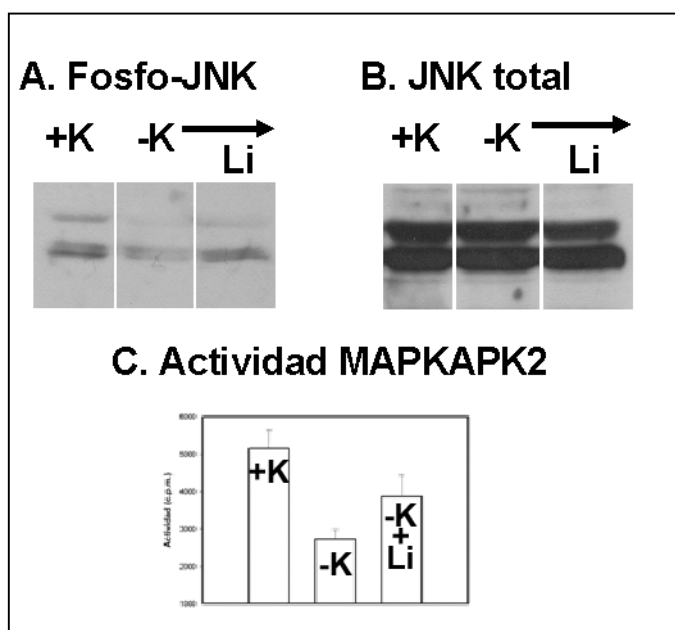


**Figura 25. Análisis por western blot del efecto del litio en el grado de fosforilación de la PKB y la GSK3.** Tras 7 DIV, el cultivo de CGC fue cambiado al medio -KCl con o sin 5 mM de litio y los lisados fueron obtenidos en los tiempos indicados. El western blot se reveló empleando anticuerpos específicos frente a la PKB total y fosforilada (A) o frente a la GSK3 $\alpha$  total o fosforilada (B).

Cuando los cultivos de CGC son incubados en medio -KCl en presencia de litio 5 mM, la GSK3 permanece fosforilada, y por tanto inactiva, de forma similar a los lisados incubados en +KCl. Como en estas condiciones la GSK3 se encuentra fosforilada, la protección debida al litio no puede ser mediada por su inhibición directa. Nuestros resultados sugieren que el litio está impidiendo la desfosforilación (y por tanto la activación) de la GSK3 inducida en los cultivos de CGC por el medio proapoptótico -KCl.

En resumen, estos resultados nos muestran que el tratamiento agudo con litio impide la desfosforilación de la PKB y de la GSK3 que es inducido tras el cambio al medio proapoptótico -KCl. Este efecto guarda una buena correlación con la inhibición de la activación de la caspasa 3 y sus conocidos efectos neuroprotectores en este sistema apoptótico. Sin embargo, todavía queda por aclarar el agente responsable de la desfosforilación tanto de la PKB como de la GSK3, ya que parece ser esta actividad serina/treonina fosfatasa la responsable de la inducción apoptótica y la diana sobre la que estaría actuando el litio.

Antes de profundizar un poco más en este aspecto, decidimos estudiar el efecto que podría tener el litio sobre las dos vías proapoptóticas que habíamos caracterizado en el capítulo anterior: p38 y JNK. En este punto habíamos observado que el cambio

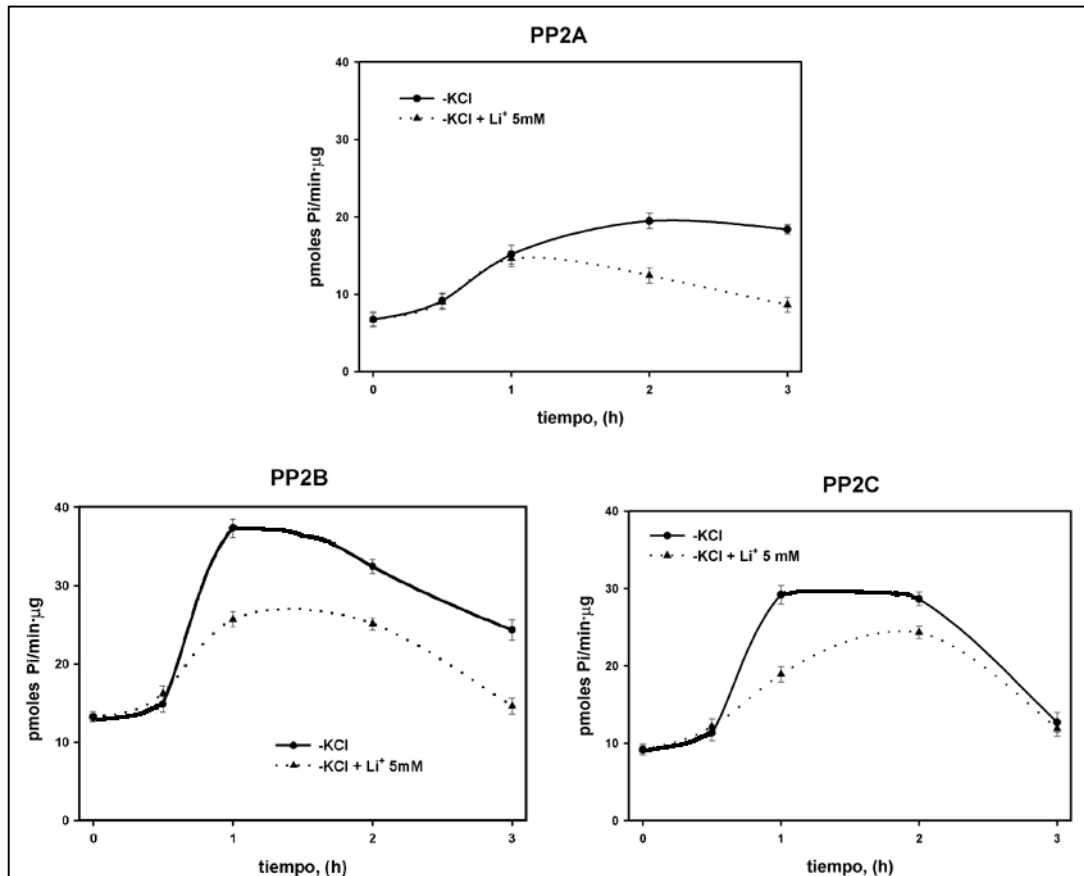


**Figura 26.** Efecto del litio sobre las vías de JNK y p38. En el 7º DIV, los cultivos fueron cambiado a los medio: +KCl, -KCl o -KCl en presencia de LiCl 5 mM. Los lisados obtenidos a las 24 h se utilizaron para realizar sendos western blots contra JNK fosforilado (A) o total (B). (C) La actividad de la MAPKAPK2 se midió a las 6 h tras el cambio al medio -KCl con o sin ClLi 5 mM.

al medio -KCl producía una inactivación de ambas vías de transducción. En la figura 26 podemos observar que, de un modo similar a lo que sucede con la vía de la PKB, la adición de litio 5 mM al medio -KCl, bloquea parcialmente las inactivaciones descritas. Observamos de nuevo, que el litio impide la desfosforilación de las proteína quinasas que se inducen por el cambio al medio proapoptótico -KCl.

Como el efecto más notorio del litio ha sido sobre la inactivación de la vía PI3K/PKB, decidimos estudiar el efecto de las actividades serina/treonina fosfatasa sobre dicha vía. Para ello utilizamos diferentes lisados para medir *in vitro* su actividad fosfatasa empleando como sustrato un péptido fosforilado correspondiente a la zona de la serina 473 de la PKB, que como hemos visto en la figura 25 es desfosforilada tras el cambio al medio -KCl (Mora y cols., 2001a).

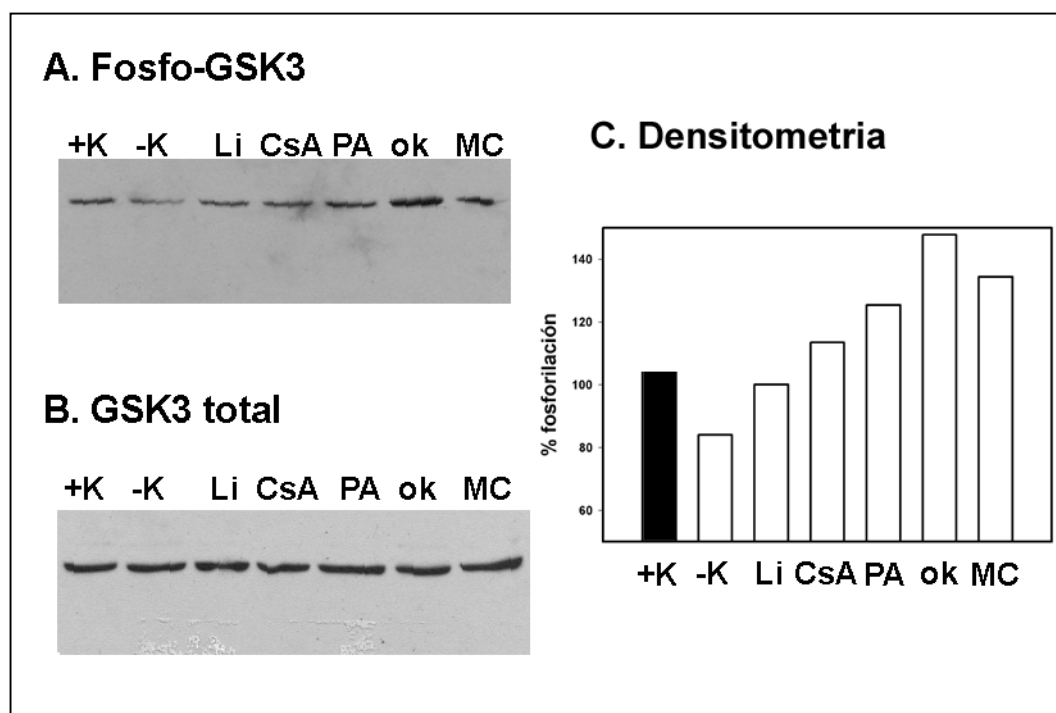
Así, en la figura 27 podemos observar que, después de 1 h del cambio de medio, se induce la activación de diversas actividades serina/treonina fosfatasas, siendo más marcadas las actividades de la PP2B y de la PP2C. La dinámica de esta activación parece corresponderse bastante bien con la cinética de desfosforilación observada para la PKB en la figura 25. En el caso de que en el medio -KCl incluyamos  $\text{Li}^+$  a una concentración 5 mM, se puede observar que todas las actividades serina/treonina fosfatasas descritas se encuentran reducidas en comparación con las provenientes de los lisados de cultivos en -KCl. De este modo, nuestros datos parecen indicar que efectivamente el litio estaría impidiendo la activación de dichas fosfatasas. De hecho, ensayos *in vitro* de estas actividades nos muestran que dicho ión es incapaz de inhibir



**Figura 27. Efecto del litio sobre las actividades serina/treonina fosfatasa inducidas por el medio -KCl.** Los lisados se obtuvieron a los tiempos indicados tras el cambio al medio -KCl en ausencia o presencia de Li<sup>+</sup> 5 mM. Como sustrato se empleó el péptido KHFPQF-pSYSAS como viene indicado en Materiales y Métodos.

la actividad serina/treonina fosfatasa (datos no mostrados), por lo que su modo de acción radicaría en impedir la activación de estas enzimas.

Sin embargo, con los datos que tenemos no podemos identificar con exactitud una determinada proteína fosfatasa. Además no sabemos la verdadera implicación que tendrían las diversas serina/treonina fosfatasa *in vivo* sobre el grado de fosforilación de la GSK3, la cual también es desfosforilada tras el cambio al medio proapoptótico -KCl. Así, decidimos emplear varios inhibidores conocidos de fosfatasa e incubarlos junto con el medio -KCl durante 1 h para ver el efecto sobre el grado de fosforilación de dicha proteína quinasa. De este modo, en la figura 28 se puede ver que el efecto del litio puede equipararse al de los inhibidores ciclosporina A (CsA) y fosfatidato (PA). La CsA es un conocido inhibidor de la PP2B (Fruman y cols., 1992), lo cual se suma a los datos de la actividad de dicha fosfatasa (Figura 27) implicándola tanto en la inducción de la apoptosis como en la supervivencia inducida por el litio. Por su parte, el fosfatidato parece estar implicado en la inhibición de las



**Figura 28. Efecto de diversos inhibidores de fosfatasa sobre la GSK3.** Los lisados empleados fueron incubados durante 1 h en el medio proapoptótico  $-KCl$  ( $-K$ ) en presencia de diferentes efectores: 25 mM de  $K^+$  ( $+K$ ), 5 mM de  $Li^+$  ( $Li$ ), 1  $\mu M$  de ciclosporina A ( $CsA$ ), 300 nM de fosfatidato ( $PA$ ), 1  $\mu M$  de ácido ocadaico ( $ok$ ) y 1  $\mu M$  de microcistina-LR ( $MC$ ).

proteína fosfatasa tipo 1 y 2A que se activan en la apoptosis inducida por la ceramida (Chalfant y cols., 1999; Kishikawa y cols., 1999). El hecho de que no hayamos medido la actividad de la PP1 y de que la activación de la PP2A sea ligera pero inhibida por la presencia de litio en el medio  $-KCl$ , hace que no podamos descartar su participación en el fenómeno apoptótico inducido tras el cambio de medio. El efecto tan marcado del ácido ocadaico y de la microcistina, ambos considerados inhibidores de PP1 y PP2A (Cohen y cols., 1990; Honkanen y cols., 1990), que elevan el grado de fosforilación de la GSK3 con una intensidad superior incluso al medio  $+KCl$ , coincide con el hecho de que se describiera inicialmente al ácido ocadaico como un activador de la PKB (Andjelkovic y cols., 1996) al estar bloqueando la actividad fosfatasa que en condiciones fisiológicas se encarga de desactivar esta vía para que pueda responder la célula a nuevas activaciones. De hecho, nuestros resultados muestran que en los cultivos existen unas actividades basales de las tres serina/treonina fosfatasa medidas (Figura 27).

## **DISCUSIÓN**

La buena correlación entre los fenómenos bioquímicos característicos de la apoptosis y el método de medida de viabilidad de los cultivos, que ya vimos en capítulo anterior, se vuelve a poner de manifiesto cuando determinamos la neuroprotección debida a la adición de litio al medio  $-KCl$  (Figura 17). Comprobamos que el ya descrito efecto protector del litio (D’Mello y cols., 1994) se debe a una acción antiapoptótica ya que, a parte de aumentar la viabilidad del cultivo, evita la aparición de la fragmentación internucleosomal del ADN típica del fenómeno apoptótico.

Las caspasas participan en una gran cantidad de los fenómenos apoptóticos como pueden ser la fragmentación de ADN, la condensación de la cromatina, formación de los cuerpos apoptóticos, etc. (Thornberry y Lazebnik, 1998). Nuestros resultados concuerdan con trabajos anteriores en los que se indicaba que la activación de las caspasas era necesaria para la ejecución de la apoptosis en CGC sometidas al medio  $-KCl$  (Armstrong y cols., 1997; Eldadah y cols., 1997; Padmanabhan y cols., 1999). Tras 24 h de incubación en  $-KCl$ , se activa (unas 12 veces) una actividad proteolítica capaz de digerir el sustrato fluorescente de la caspasa 3 (el DEVD). Aunque existen algunos trabajos anteriores que descartan la implicación de la caspasa 3 en la apoptosis de CGC en  $-KCl$  (D’Mello y cols., 1998; D’Mello y cols., 2000), nuestros resultados muestran claramente la aparición de una banda de 17 kDa de peso molecular que se corresponde con la forma proteolizada de la caspasa 3, tras el cambio al medio  $-KCl$ . El aumento en la intensidad de la banda correspondiente a la caspasa 3 proteolizada (12 veces) coincide con el de la actividad proteolítica sobre el DEVD. Por lo tanto queda bastante clara la participación de la actividad caspasa 3 en nuestro sistema apoptótico con  $-KCl$ .

Es importante hacer notar que aunque viendo los resultados globalmente podemos decir que el aumento de la caspasa 3 activa se empieza a detectar a las 6 h del cambio a medio  $-KCl$ , no es significativo por sí solo y el máximo se alcanza las 24 h. Esto si concordaría bien con los trabajos descritos anteriormente que no detectaban activación significativa de la caspasa 3 tras 8 h de incubación en  $-KCl$  (D’Mello y cols., 1998). Este retardo en la activación de la caspasa 3 se corresponde bien con lo que se ha dado en llamar “tiempo crítico” (Nardi y cols., 1997; Watson y cols., 1998): en CGC de ratón tras 4 h de incubación en  $-KCl$  se pueden rescatar de

la apoptosis casi la totalidad de las células del cultivo tras la adición de potasio. Sin embargo, sólo permanecerán viables el 50% si la adición del potasio se realiza a las 6 h tras el cambio de medio.

El uso de inhibidores de las caspasas y el estudio de sus acciones protectoras de la apoptosis se ha empleado como demostración del papel de las caspasas en el fenómeno apoptótico (Taylor y cols., 1997; D'Mello y cols., 1998; Harada y Sugimoto, 1999; Oberdoerster y Rabin, 1999; Lee y cols., 2000; Sastry y Rao, 2000). En este capítulo hemos visto que el litio impide la activación de la caspasa 3 inducida por el medio -KCl. Debido a que el litio ejerce una acción neuroprotectora en este sistema apoptótico (D'Mello y cols., 1994; Grignon y cols., 1996; Ciani y cols., 1997; Mora y cols., 1999), nuestros resultados sugieren que la activación de la caspasa 3 estaría implicada en la apoptosis inducida en las CGC por el cambio al medio -KCl y que la acción neuroprotectora del litio se debería, al menos en parte, a la inhibición de esta activación. Algo similar parece estar ocurriendo en células de neuroblastoma sometidas a otro estímulo proapoptótico (Bijur y cols., 2000).

Nuestros resultados también nos indican que el litio está impidiendo la activación de la caspasa 3 aunque no como un inhibidor directo de su actividad (Mora y cols., 2001a y b). Por lo tanto nos parece lógico pensar que la diana sobre la que actúa el litio se encuentra en algún punto de la cascada proapoptótica anterior a la activación de esta caspasa.

Utilizando las medidas de viabilidad hemos descartado una serie de puntos en los que se podría encontrar el mecanismo de acción de litio. El principal efecto conocido del litio sobre vías de transducción de señales es su inhibición de la IMPasa, por lo que desde un principio se propuso la hipótesis de que este sería con probabilidad su mecanismo de acción (Berridge y cols., 1989). La inhibición de esta enzima se traduce en la célula en una depleción de los niveles citoplasmáticos de inositol. De hecho en algunas líneas celulares (SY5Y), los efectos del litio sobre la vía de transducción JNK, que se dan también *in vivo* en el SNC, se pueden revertir por la adición de mio-inositol al medio de cultivo (Yuan y cols., 1999). En nuestro caso, el litio efectivamente aumenta la fosforilación de la JNK al igual que sucede en dichas líneas celulares (Figura 26). Sin embargo, en nuestras condiciones, el mio-inositol no es capaz de revertir el efecto protector del litio (Figura 20), por lo que descartamos esta hipótesis para este estímulo apoptótico.

Por otro lado, los fármacos anti-maníaco-depresivos, entre los que se encuentra el litio, incrementan la liberación de glutamato (Dixon y Hokin, 1997) lo que podría generar una señal de supervivencia al aumentar la concentración citoplasmática de  $\text{Ca}^{2+}$ . Sin embargo, el MK801 es incapaz de revertir significativamente el efecto protector del litio como hemos visto en la figura 21, por lo que eliminamos esta posibilidad, al menos en la protección de la apoptosis inducida por el medio  $-\text{KCl}$ .

Los únicos inhibidores que parecen revertir en cierta manera la acción del litio son los de la PI3K (wartmanina y LY294002). Sin embargo, y dado que ya reducen de por sí la viabilidad del cultivo, no podemos asegurar que realmente estén afectando a la neuroprotección causada por el litio. De hecho, los resultados de la figura 22, en los que no hay insulina en el medio y por tanto la PI3K está inactiva, muestran claramente que el efecto de supervivencia inducido por el litio es independiente de que esta vía se encuentre activada o no, siendo muy destacables los valores de viabilidad con litio 5 mM.

A este respecto, tras demostrarse que el litio era un inhibidor acompetitivo de la GSK3 (Klein y Melton, 1996; Stambolic y cols., 1996), todos los efectos neuroprotectores se explicaron mediante esta acción (Muñoz-Montaña y cols., 1997; Hong y cols., 1997; Centeno y cols., 1998; Álvarez y cols., 1999; Hartigan y Johnson, 1999; Takahashi y cols., 1999; Leroy y cols., 2000; Bijur y cols., 2000; Williams y Harwood, 2000). De hecho el papel de la GSK3 en la inducción de la apoptosis (Pap y Cooper, 1998; Cohen, 1999; Bijur y cols., 2000; Li y cols., 2000) y en la patogénesis de enfermedades neurológicas (Kovacs y Tanzi, 1998; Hanger y cols., 1992; Takashima y cols., 1998) ha sido ampliamente descrito, aunque el mecanismo por el que esta proteína quinasa induce la apoptosis permanece todavía desconocido (Bijur y cols., 2000). De cualquier manera, parecía que su efecto como inhibidor de la GSK3 era claramente el mecanismo que explicaba sus efectos neuroprotectores. Sin embargo, los experimentos de neuroprotección del litio en condiciones en las que la GSK3 se encontraría inactivada, hacen que hayamos decidido estudiar más a fondo el papel del litio y la GSK3 en el fenómeno apoptótico.

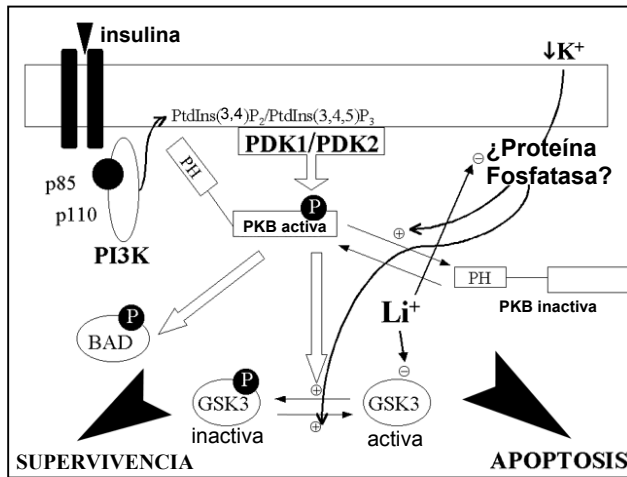
El principal mecanismo que regula la actividad de la GSK3 es su fosforilación. La actividad de la GSK3 se inhibe cuando se encuentra fosforilado un residuo de serina en su extremo amino terminal: la serina 21 de la GSK3 $\alpha$  y la serina 9 de la



GSK3 $\beta$  (Cross y cols., 1995; Welsh y cols., 1996; Shaw y cols., 1997). Además, la GSK3 es sustrato de otra serina/treonina quinasa, la PKB, la cual se activa tanto por insulina como por IGF-1 y fosforilan estos residuos en la GSK3 (Cross y cols., 1995; Shaw y cols., 1997). Esto nos llevó a estudiar el grado de fosforilación de la PKB y de la GSK3 en cultivos de CGC en  $-KCl$  con y sin litio. Observamos que el medio proapoptótico  $-KCl$  inducía la desfosforilación de ambas quinasas, lo cual venía a ser una inhibición de la PKB y una activación de la GSK3, bloqueándose así una de las vías de señalización implicadas en la supervivencia celular (Datta y cols., 1997; Dudek y cols., 1997; Alessi y Cohen, 1998; Sabbatini y McCormick, 1999; Gleichmann y cols., 2000). Además la activación de la GSK3 está directamente implicada en la inducción de la apoptosis (Li y cols., 2000). Si el único mecanismo responsable del efecto neuroprotector del litio fuera la inhibición incompetitiva de la GSK3, el hecho de que el litio bloquee la desfosforilación de la PKB y de la GSK3 es en cierto modo inesperado, ya que implicaría que la GSK3 es inhibida cuando se encuentra ya fosforilada. En presencia de insulina en el medio, la PKB y la GSK3 se encuentran fosforiladas en un principio. Tras el cambio al medio  $-KCl$ , sin embargo, los cultivos de CGC entran en apoptosis y el litio es capaz de proteger de este proceso (Mora y cols., 1999). Así, la neuroprotección del litio en el medio  $-KCl$  con insulina está basada en su capacidad para impedir la desfosforilación de la PKB y de la GSK3 (Figura 25). Por otro lado, este bloqueo sucede en el “tiempo crítico” y antes de la activación de la caspasa 3 (Mora y cols., 2001a).

Como el mecanismo por el que el litio impide la desfosforilación de la PKB y de la GSK3 no quedaba aclarado con estos experimentos, nos planteamos varias hipótesis. Por un lado, el litio podría activar la PI3K como sugirieron Chalecka-Franaszek y Chuang (1999), pero parece poco probable ya que, como hemos visto en la figura 23, en presencia del inhibidor de esta enzima, el LY294002, no se bloquea la acción neuroprotectora del litio (Mora y cols. 1999). Además en ausencia de insulina es bastante probable que la inhibición incompetitiva de la GSK3 por el litio sea la responsable de sus efectos protectores.

Otra posibilidad sería la de considerar que el medio  $-KCl$  estuviera induciendo la actividad de alguna fosfatasa que pudiera ser inhibida por el litio. El planteamiento general de esta hipótesis está descrito en la figura 29. Vemos, como en ausencia de insulina, el medio  $-KCl$  induce una proteína fosfatasa que inactivaría a la PKB y activaría a la GSK3. Esta actividad, por un mecanismo aún desconocido, participaría



**Figura 29. Modelo propuesto para el mecanismo neuroprotector del litio.** La insulina induce la fosforilación de la PKB (y su activación) y de la GSK3 (y su inactivación). En esta hipótesis el medio  $-KCl$  induciría la activación ( $\oplus$ ) de una serina/treonina proteína fosfatasa que desfosforilaría a la PKB y a la GSK3. El litio inhibiría ( $\ominus$ ) a esta fosfatasa bloqueando los efectos apoptóticos del medio  $-KCl$ .

en la inducción de la apoptosis. En estas condiciones el litio protegería frente a la apoptosis al inhibir a la GSK3 (Mora y cols., 1999). Cuando la insulina se encontrara presente en el medio, la PKB se encuentra activa y protege frente a la apoptosis al fosforilar tanto a Bad como a la GSK3. El medio  $-KCl$  volvería a activar la misma actividad proteína fosfatasa la cual cambiaría el estado de fosforilación de la PKB y de la GSK3, impidiendo así el efecto protector de la insulina. En estas condiciones, la protección del litio sería debida a que inhibe la actividad de la proteína serina/treonina fosfatasa inducida por el medio  $-KCl$ .

Esta última hipótesis parece la más interesante a explorar ya que se ha descrito al litio como un inhibidor de una serie de fosfatasas: la inositol monofosfatasa (IMPasa), la inositol polifosfato 1-fosfatasa (IPPasa) (Berridge y cols., 1982; Berridge y cols., 1989), y la 3'(2')-fosfoadenosina 5'fosfato fosfatasa (PAP) (Yenush y cols., 2000; Albert y cols., 2000). Así tras descartar la hipótesis inicial que hace unos años explicaba el mecanismo de acción terapéutica del litio por su inhibición de las inositol monofosfatasas (Berridge y cols., 1989), puede que volvamos a explicar su acción terapéutica como inhibidor de alguna otra actividad fosfatasa.

De hecho, los datos de la figura 27 apuntan claramente en esta dirección. Las actividades serina/treonina fosfatasa se activan tras el cambio al medio  $-KCl$ , activaciones que son bloqueadas por la presencia de litio en el medio. Sin embargo, la identificación de cual es la principal causante de la apoptosis plantea ciertas dificultades. Como se observa en la figura 27, tanto la PP2A, la PP2B como la PP2C están activadas constitutivamente en el medio  $+KCl$ . Esta activación basal parece deberse a que estarían regulando la vía de transducción de una forma habitual y el estímulo del medio  $-KCl$  sólo activaría más a dichas serina/treonina fosfatasas, principalmente la PP2B y la PP2C. Esto es, al menos, lo que nos sugiere el hecho de

que el ácido ocaidaico y la microcistina aumenten la fosforilación de la GSK3 a niveles superiores a los controles (figura 28).

Otra dificultad parece radicar en la acción “inespecífica” del litio a la hora de inhibir las desfosforilaciones. Como hemos visto actúa sobre las actividades de la PP2A, la PP2B y la PP2C. Además actúa sobre la desfosforilación de la JNK y sobre la inhibición de la p38 (Figura 26), la cual se activa por fosforilación. Esto hace pensar que el litio podría estar actuando en un punto inicial de la cascada proapoptótica que desencadenaría la desfosforilación de las diversas rutas de transducción de señales. Por ello y para un mejor estudio de este efecto, probablemente sería más adecuado el estudio del efecto del litio en algún sistema apoptótico del que se conociera con exactitud la serina/treonina fosfatasa que se activa y en la que radique el efecto proapoptótico. A este respecto, parece bastante claro que la ceramida, la cual activa a la PP2A (Kowluru y Metz, 1997; Ruvolo y cols., 1999), desfosforilaría a la PKB ejerciendo así parte de sus efectos proapoptóticos (Schubert y cols., 2000; Salinas y cols., 2000). Por ello el estudio de este estímulo proapoptótico y su posible protección por litio, nos podría arrojar luz sobre el mecanismo de acción del litio sobre las serina/treonina fosfatasa, y en concreto, sobre la PP2A.

PROTECCIÓN POR EL LITIO DE LA APOPTOSIS  
NEURONAL INDUCIDA POR LA CERAMIDA



## INTRODUCCIÓN

Como ya hemos comentado, el litio es ampliamente utilizado como fármaco estabilizante del humor en el tratamiento de pacientes con trastornos maniaco-depresivos (Jope y Williams, 1994). Aunque el mecanismo por el cual el litio ejerce su acción terapéutica no se conoce todavía, la principal hipótesis radica en la interferencia del ión en la generación de segundos mensajeros derivados de fosfoinosítidos (Berridge y cols., 1982). El litio inhibe a la inositol monofosfatasa, habiendo sido esta propiedad ampliamente utilizada desde hace más de 15 años para incrementar los efectos de los agonistas de receptores de fosfoinosítidos producidos por la fosfolipasa C. En presencia de litio, cuando el inositol intracelular se encuentra en forma de los diversos inositolfosfatos, la biosíntesis de fosfatidilinositol a partir del CDP-diacilglicerol (CDP-DAG) y la de inositol libre se encuentran desequilibradas. Este hecho se manifiesta fundamentalmente tras la acumulación del CDP-DAG que se produce por la estimulación de la fosfolipasa C en presencia de inositol, y se revierte si añadimos inositol libre en el medio (Godfrey, 1989). La llamada hipótesis de la depleción del inositol, se ve reforzada por la inhibición acompetitiva que el litio causa sobre la monoinositol fosfatasa. Esta acción es la razón de que se haya propuesto que este ión atenuaría selectivamente la actividad de los receptores de fosfoinosítidos producidos por la fosfolipasa C (PLC), los cuales se encontrarían anormalmente hiperestimulados.

Como las bases bioquímicas de los desórdenes bipolares actualmente no se conocen, deberían ser tenidos en cuenta otros efectos descritos para el litio a la hora de tratar de comprender el efecto terapéutico del mismo. Entre estos efectos están la inhibición de la función de las proteínas Gs y Gi (Avisar y cols., 1988; Masana y cols., 1992), y por tanto la de la  $G_{q/11}$  (Song y Jope, 1992), la inducción de la translocación de la proteína quinasa C (Li y cols., 1993) y su desregulación (Manji y cols., 1993), la estimulación de la liberación de glutamato (Dixon y Hokin, 1997), y la regulación de la transcripción de gran variedad de genes (Ozaki y Chuang, 1997).

En los últimos años, ha surgido una interesante y nueva línea de investigación, al aparecer el litio como un agente neuroprotector (D'Mello y cols., 1994; Muñoz-Montaño y cols., 1997; Nonaka y cols., 1998a; Centeno y cols., 1998; Chen y Chuang, 1999; Chalecka-Franaszek y Chuang, 1999; Mora y cols., 1999; Bijur y cols., 2000). Como hemos visto en el capítulo anterior, el efecto neuroprotector del

litio sobre la apoptosis inducida en las CGC por el medio  $-KCl$ , descrito por D'Mello y cols. (1994), ha sido posteriormente confirmado (Grignon y cols., 1996; Ciani y cols., 1997). Además, se ha visto que el tratamiento crónico con litio protege a cultivos de neuronas de diferentes zonas del cerebro de la apoptosis inducida por el glutamato (Nonaka y cols., 1998a). Tanto este tipo de apoptosis como la inducida por  $-KCl$  parecen estar mediadas por la activación de los receptores de NMDA. Así, parece ser que el litio es capaz de proteger en ambos casos al interferir en la función del receptor de NMDA. Esto concuerda con los datos de Nonaka y cols. (1998c) que vieron que el litio también es capaz de proteger a las CGC de la apoptosis inducida por diversos anticonvulsivantes, los cuales parece que están relacionados también con los receptores de NMDA (Gao y cols., 1995).

La apoptosis, además de ser una forma de muerte celular crítica en el SNC para el correcto desarrollo del mismo, se encuentra implicada en distintas enfermedades neurodegenerativas (Oppenheim, 1991). Aunque los mecanismos bioquímicos del proceso apoptótico no se han esclarecido todavía completamente, se ha demostrado la participación de la ceramida en diversos sistemas proapoptóticos (ver revisión de Testi, 1996). Respecto a la vía por la que la ceramida induce la apoptosis, se ha descrito que regula la actividad tanto de proteína quinasas (Zhang y cols., 1997) como de proteína fosfatasa (Dobrowsky y Hannun, 1992; Chalfant y cols., 1999). Entre las distintas proteína fosfatasas que se han descrito que son activadas por la ceramida, se encuentra la serina/treonina fosfatasa 2A (Kowluru y Metz, 1997; Ruvolo y cols., 1999).

Recientemente se ha mostrado que la vía PI3K/PKB, la cual puede ser inactivada por la PP2A (Millward y cols., 1999), es una de las principales dianas implicadas en la inducción de la apoptosis por la ceramida (Zhou y cols., 1998). De hecho, los análogos permeables de cadena corta  $C_2$ - y  $C_6$ -ceramida, inducen la apoptosis en diversas líneas celulares al desfosforilar a la PKB en la serina 473 pero sin llegar a afectar a la actividad de la PI3K (Schubert y cols., 2000; Salinas y cols., 2000).

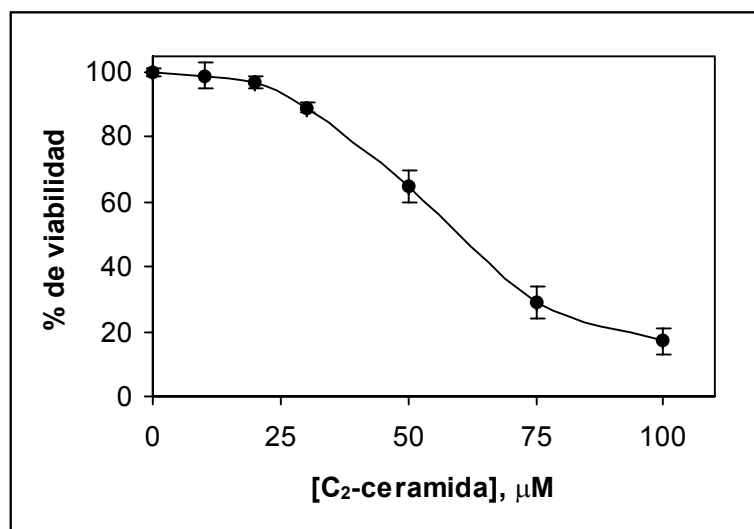
Entre otros mecanismos descritos, la PKB regula la apoptosis fosforilando a la GSK3 en la serina 9 de la GSK3 $\beta$  y en la serina 21 de la GSK3 $\alpha$  (Cross y cols., 1995), induciendo así su inactivación. A este respecto están apareciendo nuevos datos que recalcan la acción proapoptótica de la GSK3 (Pap y Cooper, 1998; Bijur y cols., 2000). De hecho, inhibidores selectivos de la GSK3 protegen a cultivos primarios de CGC de la apoptosis (Cross y cols., 2001).

El litio, como ya hemos indicado, está considerándose recientemente como un agente neuroprotector. Aunque esta acción ha sido explicada por ser un inhibidor acompetitivo de la GSK3 (Klein y Melton, 1996; Stambolic y cols., 1996), en el capítulo anterior hemos demostrado un nuevo mecanismo de acción: el litio inhibiría las actividades de una o varias serina/treonina fosfatasas activadas por el medio proapoptótico -KCl, siendo así capaz de evitar la desfosforilación de la PKB y la GSK3 inducidas por este paradigma apoptótico (Mora y cols., 2001a).

En este capítulo vamos a comprobar esta hipótesis usando como inductor de la apoptosis la C<sub>2</sub>-ceramida. Primero veremos como se puede proteger parcialmente la apoptosis por la adición de litio. Veremos que la C<sub>2</sub>-ceramida induce la desfosforilación tanto de la PKB como de la GSK3, y como el litio lo evita. Al inducir la C<sub>2</sub>-ceramida la activación de la PP2A, que se bloquea por la presencia del litio, corroboramos el nuevo modelo que presenta al litio como inhibidor de la/s serina /treonina fosfatasa/s inducida/s por los estímulos proapoptóticos.

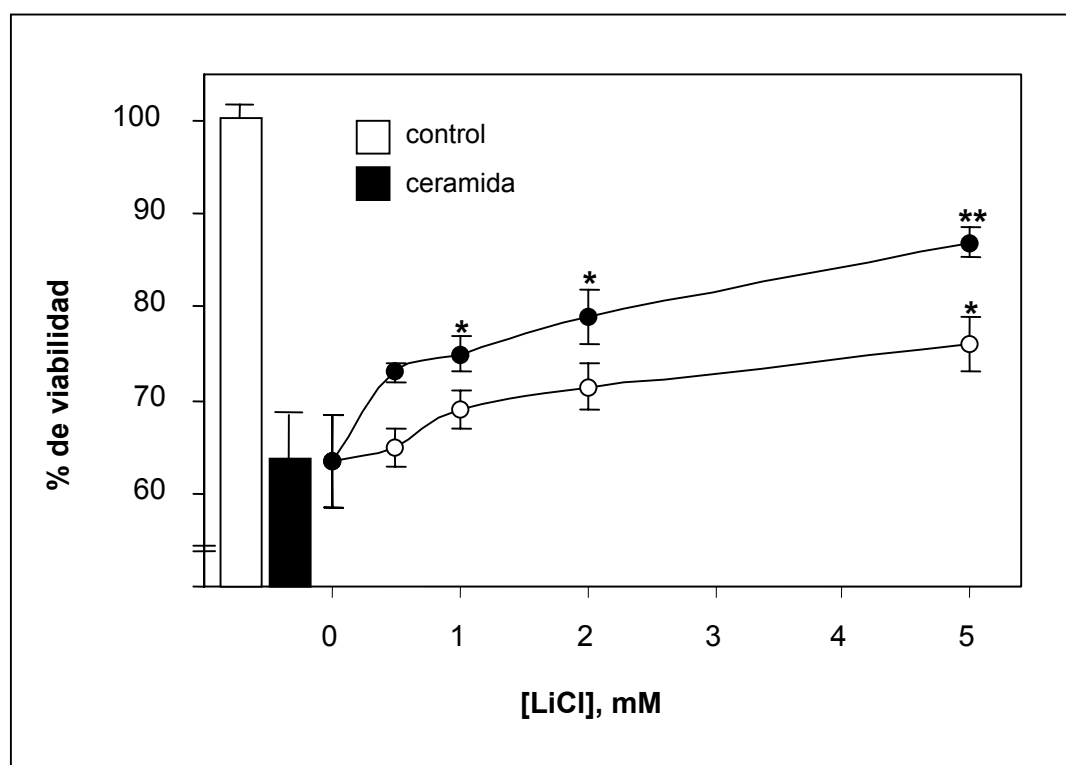
## RESULTADOS

La ceramida se conoce desde hace varios años como señal proapoptótica en una gran variedad de tipos celulares tanto del sistema nervioso como de otros orígenes (Obeid y cols., 1993; Hannun y Obeid, 1995; Hartfield y cols., 1997; Zhou y cols. 1998). Como se ve en la figura 30, mediante el ensayo de viabilidad con MTT comprobamos que el análogo de cadena corta de la ceramida (C<sub>2</sub>-ceramida) induce la



**Figura 30. Efecto de la concentración de C<sub>2</sub>-ceramida en la viabilidad celular.** Los cultivos de CGC fueron expuestos a diferentes concentraciones de C<sub>2</sub>-ceramida durante 18 h. El vehículo en el que iba la ceramida (1% de etanol) no afecta a la viabilidad del cultivo. Cada punto representa la media ± SEM de tres experimentos diferentes cada uno por triplicado.



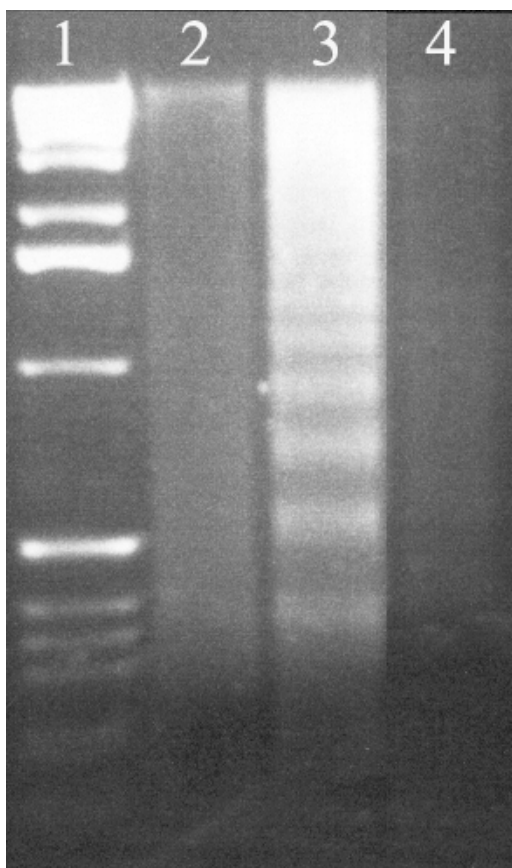


**Figura 31. Protección por litio de la muerte inducida por C<sub>2</sub>-ceramida.** Las CGC fueron tratadas con LiCl a diferentes concentraciones al mismo tiempo (círculos blancos) ó 5 h antes de la adición de 50  $\mu$ M de C<sub>2</sub>-ceramida (círculos negros). Se representa la media  $\pm$  SEM de tres experimentos diferentes cada uno por triplicado. \*: significativamente diferente ( $p < 0.05$ ) de 50  $\mu$ M de C<sub>2</sub>-ceramida en ausencia de litio; \*\*: significativamente diferente ( $p < 0.05$ ) de 5 mM de LiCl añadido al mismo tiempo que la C<sub>2</sub>-ceramida.

muerte de los cultivos de CGC, siendo la CE<sub>50</sub> aparente de alrededor de 60  $\mu$ M.

Mientras que la adición de LiCl a los cultivos no altera la viabilidad de los mismos (datos no mostrados), cuando se añade junto a la C<sub>2</sub>-ceramida se observa un efecto protector sobre la muerte inducida por la C<sub>2</sub>-ceramida que es dependiente de la concentración de litio (Figura 31). Este grado de protección se aumenta significativamente cuando el litio es preincubado durante 5 h antes de la adición de la C<sub>2</sub>-ceramida. El mayor efecto neuroprotector lo encontramos con una concentración de LiCl de 5 mM, tanto cuando se añade junto a la C<sub>2</sub>-ceramida (37% de recuperación), como cuando se añade 5 h antes de la misma (66% de recuperación). La preincubación con litio durante más tiempo (hasta 24 h) no da lugar a una mayor neuroprotección. Por otro lado, y al igual que ocurría con la apoptosis inducida por KCl, concentraciones de litio de 10 mM inducen la muerte de nuestros cultivos (datos no mostrados) tanto en presencia de C<sub>2</sub>-ceramida, como en los controles.

Posteriormente hemos comprobado que la muerte de nuestros cultivos inducida por la C<sub>2</sub>-ceramida se debe a un fenómeno apoptótico, ya que pudimos observar la

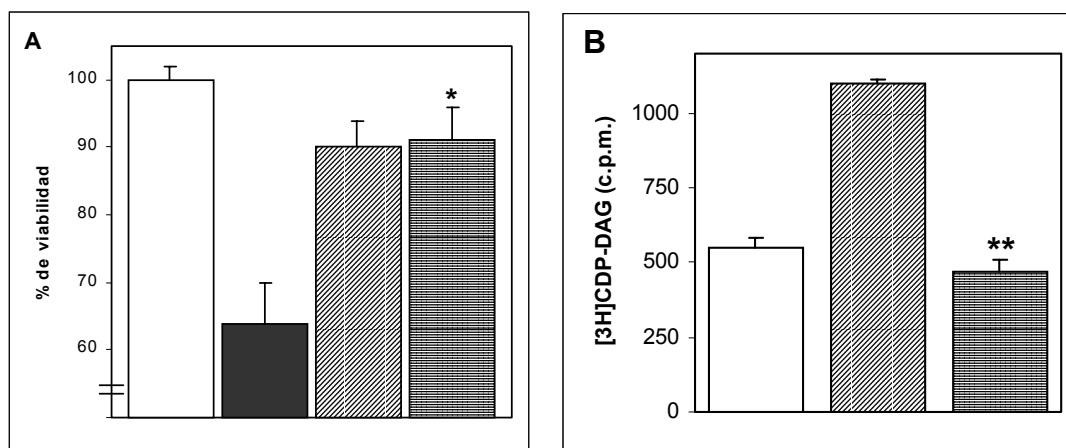


**Figura 32. El Litio evita la fragmentación internucleosomal del ADN causada por la C<sub>2</sub>-ceramida.** CGC fueron mantenidas en las condiciones control (calle 2) o bien tratadas con 50 mM de C<sub>2</sub>-ceramida solo (calle 3) o con LiCl 5 mM 5 h antes (calle 4). Cantidades iguales de ADN fueron cargadas en un gel de agarosa al 1'4%. Calle 1: marcador de peso molecular 1 Kb ladder.

fragmentación internucleosomal del ADN característica de este proceso (calle 3 de la figura 32). Así mismo, hemos observado que, de acuerdo con la protección observada en los ensayos de viabilidad, el litio reducía significativamente la aparición de estos pequeños fragmentos citosólicos de ADN (calle 4).

El siguiente experimento fue diseñado para comprobar si la protección del litio era debida a su acción como inhibidor del metabolismo de los inositol fosfatos. Como ya hemos mencionado, uno de los efectos bioquímicos mejor caracterizados del litio es su acción como inhibidor acompetitivo de la enzima inositol-monofosfato fosfatasa (IMPasa) (Hallcher y Sherman, 1980). Este efecto se traduce en el cerebro en una disminución del inositol libre intracelular y, por tanto, del

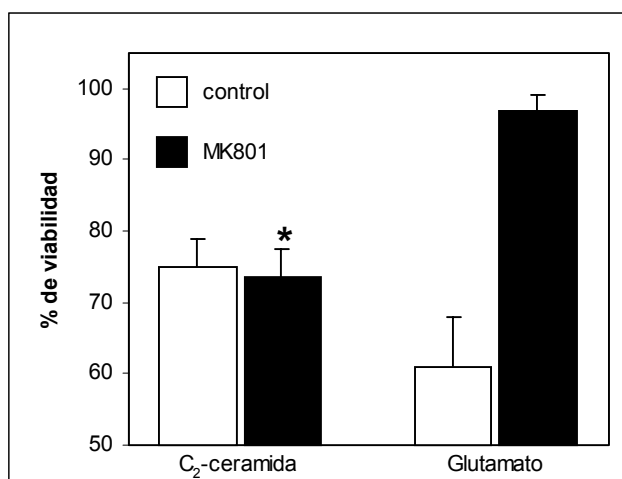
fosfatidilinositol-4,5-bifosfato, produciendo una alteración en la generación de segundos mensajeros por parte de la fosfolipasa C (PLC) (Batty y Nahorski, 1987). Como se ve en panel A de la figura 33, la protección que el litio ejerce sobre la apoptosis inducida por la C<sub>2</sub>-ceramida no se ve contrarrestada por el aumento en el medio extracelular de la concentración de inositol, de 40 μM, presente en el medio DME, hasta 3 mM. Sin embargo, esta concentración es suficiente para revertir la depleción de inositol producida por el litio: en el panel B (figura 33) se observa que el litio por si solo induce en 30 minutos un aumento del 100% de la concentración de [<sup>3</sup>H]CDP-DAG, probablemente por la propia actividad intrínseca de la PLC en los cultivos de CGC mantenidos en condiciones despolarizantes. Esta acumulación se reduce a los niveles iniciales si añadimos mio-inositol a una concentración final de 3



**Figura 33. La protección del litio frente a la C<sub>2</sub>-ceramida no está relacionada con el metabolismo de inositol fosfatos.** (A) Cultivos de CGC (barra blanca) fueron tratados con C<sub>2</sub>-ceramida 50  $\mu$ M sola (barra negra) o junto con LiCl 5 mM 5 h antes sin (barra con líneas diagonales) o con inositol 3 mM (barra con líneas horizontales). (B) Los cultivos fueron marcados con [<sup>3</sup>H]citidina (2  $\mu$ Ci/ml) durante 24 h (barra blanca) y posteriormente se incubó durante 30 minutos con LiCl 5 mM solo (barra con líneas diagonales) o con inositol 3 mM (barra con líneas horizontales), \*\*: no distinto significativamente ( $p > 0.05$ ) del control. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

mM. Este resultado, por tanto, descarta el mecanismo de la depleción de inositol como la causante de la protección de la apoptosis mediada por la C<sub>2</sub>-ceramida en las CGC.

Recientemente se ha descrito que la apoptosis inducida por el glutamato en CGC, fenómeno que se produce por la activación de los receptores de NMDA, se bloquea completamente por un tratamiento crónico (aunque no por una exposición aguda) con concentraciones de litio en el mismo rango milimolar (Nonaka y cols., 1998a). Estos autores mostraron que el litio impedía casi totalmente la elevación momentánea de la concentración de Ca<sup>2+</sup> citoplasmático que se producía al añadir el glutamato al medio. En principio consideramos que la protección parcial de la

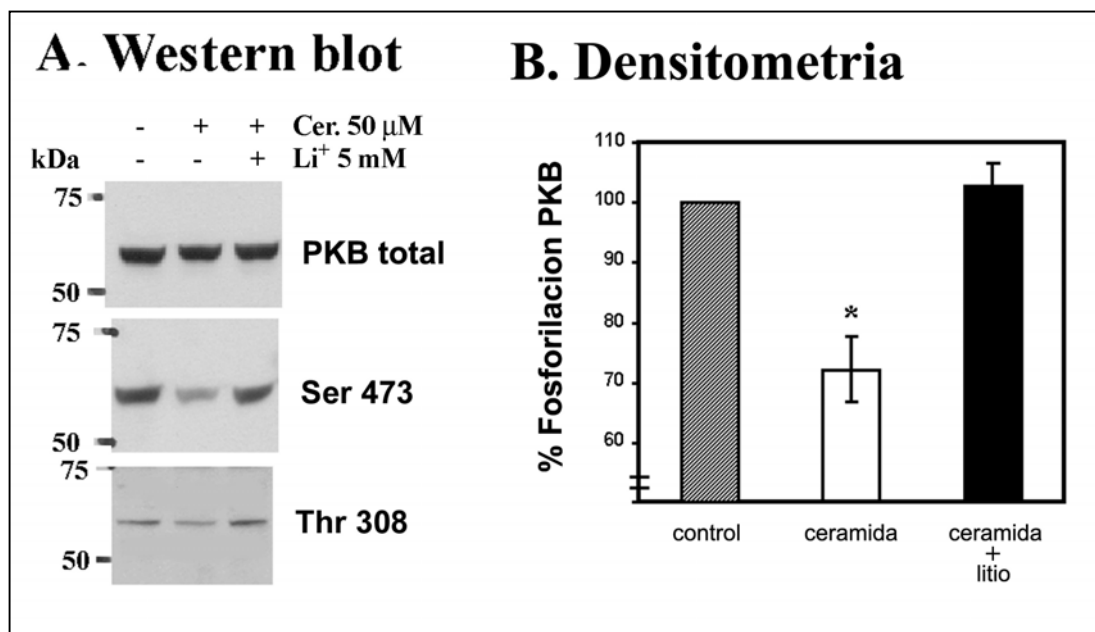


**Figura 34. La inducción de la apoptosis por la C<sub>2</sub>-ceramida no está relacionada con la activación del receptor de NMDA.** Como se indica, los cultivos fueron tratados durante 18 h con C<sub>2</sub>-ceramida 50  $\mu$ M o con glutamato 100  $\mu$ M, tanto en ausencia (barras blancas) como en presencia (barras negras) de MK801 5  $\mu$ M. Los resultados son la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. \*: no significativamente diferente ( $p > 0.05$ ) del control.

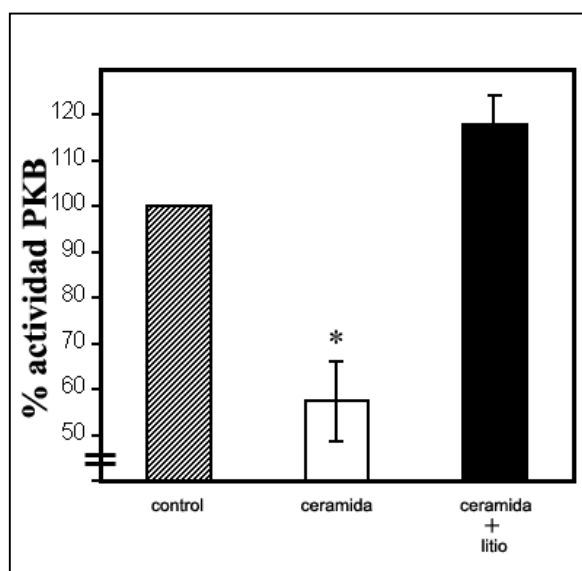
apoptosis por C<sub>2</sub>-ceramida podría deberse a un mecanismo similar. Como se ve en la figura 34, la inhibición de los receptores de NMDA con MK801 protege a las CGC de la toxicidad debida al glutamato. Sin embargo, este mismo tratamiento no afecta a la viabilidad de los cultivos expuestos a la C<sub>2</sub>-ceramida. Considerando además que la protección por el litio se da en exposiciones agudas al mismo (figura 31) y que en estas condiciones no se modifica la entrada de Ca<sup>2+</sup> inducida por el glutamato (Nonaka y cols., 1998a), nuestros datos apuntan en una dirección distinta a la implicación del receptor de NMDA.

Existen datos que apuntan a que la apoptosis inducida por la ceramida podría deberse a una inhibición de la quinasa antiapoptótica PKB (Zhou y cols., 1998), la enzima que fosforila e inhibe a la glucógenosintasa kinasa 3 (GSK3) (Alessi y Cohen, 1998).

Para profundizar en el mecanismo por el que la ceramida induce la apoptosis en los cultivos de CGC, decidimos estudiar el efecto que la ceramida pudiera tener sobre el grado de fosforilación de la PKB. Como se puede ver en la figura 35A, la incubación durante 30 minutos de los cultivos de CGC con 50 μM de C<sub>2</sub>-ceramida



**Figura 35. El litio bloquea la desfosforilación de la PKB inducida por la C<sub>2</sub>-ceramida.** Los cultivos fueron tratados al 7º DIV con C<sub>2</sub>-ceramida 50 μM y LiCl 5 mM. Los lisados se obtuvieron a los 30 minutos del tratamiento. 20 μg de proteínas se emplearon para la electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%, se transfirieron a la nitrocelulosa y se revelaron con anticuerpos anti-PKB total (extremo carboxilo) o fosforilada (S473 o T308) (A). Las bandas se cuantificaron por densitometría (B). Cada valor representa la media ± SEM de tres experimentos en triplicado. \*: *p*<0'05 comparado con los cultivos no tratados (control).

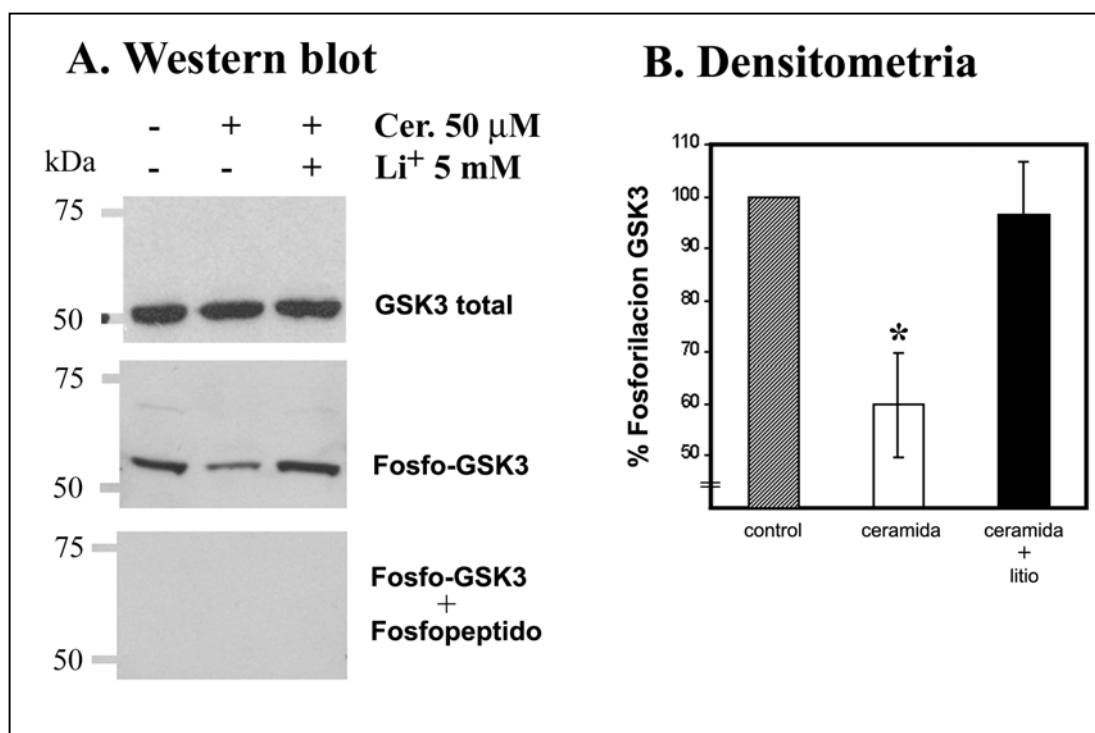


**Figura 36. El litio bloquea la inhibición de la actividad PKB inducida por la C<sub>2</sub>-ceramida.** Los cultivos fueron tratados al 7<sup>o</sup> DIV con C<sub>2</sub>-ceramida 50  $\mu$ M y LiCl 5 mM. Los lisados se obtuvieron a los 30 minutos del tratamiento. 300  $\mu$ g de proteínas se emplearon para la medida de la actividad PKB. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de tres experimentos en triplicado. \*:  $p < 0.05$  comparado con los cultivos no tratados (control).

disminuye el nivel de fosforilación de la PKB tanto en la serina 473 como en la treonina 308. A su vez, en el mismo grupo de experimentos, el litio previene esta desfosforilación inducida por la C<sub>2</sub>-ceramida. Estas desfosforilaciones deberían verse reflejadas en una disminución de la actividad de la PKB, ya que estos son los residuos que la enzima necesita tener fosforilados para ejercer su acción catalítica (Cross y cols., 1995). Así, tal y como esperábamos, la C<sub>2</sub>-ceramida inhibe la actividad de la PKB (Figura 36), manteniendo el grado de inhibición de su actividad una buena correlación con el grado de desfosforilación observado en dicha proteína. En la figura 36 también se puede observar que el litio impide la inhibición causada por la C<sub>2</sub>-ceramida sobre la PKB. Estos resultados nos sugieren que la protección parcial del litio frente a la apoptosis inducida por la C<sub>2</sub>-ceramida podría ser debida a la inhibición de la actividad serina/treonina fosfatasa causante de la desfosforilación de la PKB y de la correspondiente disminución en su actividad.

Como uno de los principales sustratos de la PKB es la GSK3 (Cross y cols., 1995), y esta proteína quinasa ha sido relacionada con la inducción de la apoptosis cuando se encuentra activa (Pap y Cooper, 1998; Bijur y cols., 1998; Cross y cols., 2001), decidimos comprobar el efecto que pudiera tener la C<sub>2</sub>-ceramida en el grado de fosforilación de la serina 21 de la GSK3 $\alpha$ , ya que cuando se encuentra fosforilada se induce la inactivación de la enzima. La figura 37 muestra que la C<sub>2</sub>-ceramida induce la desfosforilación de la GSK3 y que la coincubación con litio de la misma previene esta desfosforilación, impidiendo así sus efectos proapoptóticos.

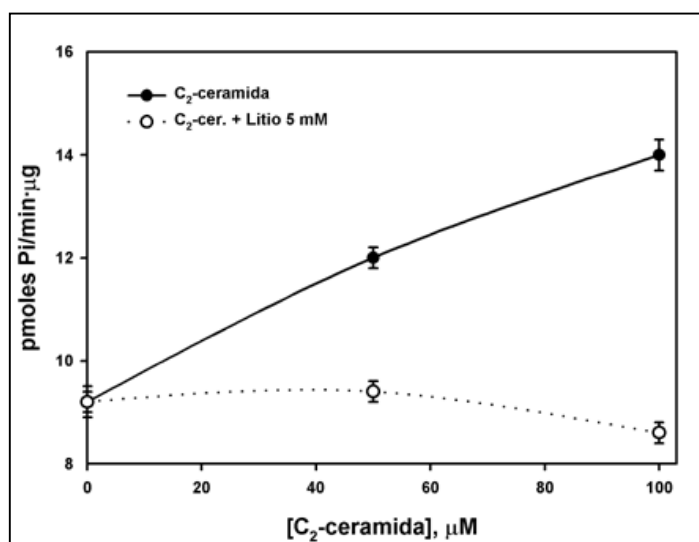
Estos resultados, al igual que en el capítulo anterior con el medio -KCl (Mora y cols., 2000a), sugieren la activación de alguna serina/treonina fosfatasa inducida por



**Figura 37. El litio bloquea la desfosforilación de la GSK3 inducida por la C<sub>2</sub>-ceramida.** Los cultivos fueron tratados al 7º DIV con C<sub>2</sub>-ceramida 50  $\mu$ M y LiCl 5 mM. Los lisados se obtuvieron a los 30 minutos del tratamiento. 20  $\mu$ g de proteínas se emplearon para la electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%, se transfirieron a la nitrocelulosa y se revelaron con anticuerpos anti-GSK3 total o fosforilada (S21) (A). Las bandas se cuantificaron por densitometría (B). Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de tres experimentos en triplicado. \*:  $p < 0.05$  comparado con los cultivos no tratados (control).

la C<sub>2</sub>-ceramida, la cual estaría implicada en la desfosforilación de la PKB y de la GSK3. Como ya ha sido demostrada la activación de la PP2A por la ceramida (Kowluru y Metz, 1997; Ruvolo y cols., 1999), decidimos estudiar la posible implicación de dicha proteína en este modelo apoptótico y su posible relación con el efecto neuroprotector del litio.

Como se puede observar en la figura 38, a los 30 minutos tras la adición de la C<sub>2</sub>-ceramida, se produce una activación de la actividad de la PP2A, la cual es dependiente de la concentración de C<sub>2</sub>-ceramida empleada. Además, la incubación del litio junto a la C<sub>2</sub>-ceramida inhibe esta activación, lo cual sugiere que la protección del litio frente a la ceramida en las CGC sería debida a que impide la activación de la PP2A. Esta actividad serina/treonina fosfatasa del tipo PP2A no es inhibida *in vitro* por el litio (datos no mostrados), aunque es totalmente inhibida *in vitro* por un potente inhibidor de la PP2A: microcistina LR a una concentración de 0.1  $\mu$ M (Honkanen y cols., 1990) (datos no mostrados).



**Figura 38.** El litio bloquea la activación de la PP2A inducida por la C<sub>2</sub>-ceramida. Los cultivos fueron tratados durante 30 minutos con diferentes concentraciones de C<sub>2</sub>-ceramida tanto en ausencia (●) como en presencia (○) de 5 mM de Li<sup>+</sup>. Para el ensayo de la actividad se emplearon 5 µg de proteínas y como sustrato el péptido RR-pTVA.

## DISCUSIÓN

Al igual que habíamos descartado para el efecto protector del litio sobre la apoptosis inducida por el medio -KCl la hipótesis de la depleción de inositol, también se descarta a la vista de los datos mostrados aquí en el caso de la apoptosis inducida por la ceramida. Así parece claro que la hipótesis de la reducción de la concentración intracelular de inositol no es el mecanismo por el que el litio ejerce sus efectos neuroprotectores, ya que añadiendo inositol no se revierten estos efectos. Es interesante hacer notar que esta misma concentración de inositol (3 mM) sólo revierte en un 17% la acumulación de [<sup>3</sup>H]CDP-DAG en respuesta a la estimulación de los receptores muscarínicos con una concentración 0.3 mM de carbacol (Centeno y cols., 1998). Sin embargo, este estímulo, durante 30 minutos y en las mismas condiciones de cultivo, induce un aumento en la acumulación de [<sup>3</sup>H]CDP-DAG mucho mayor (hasta un 8.400% sobre el control). Estos resultados, en concordancia con los de Gray y cols. (1994), nos muestran que la respuesta del CDP-DAG depende del equilibrio existente entre dos factores opuestos: por un lado la magnitud del estímulo sobre la PLC y por otra parte de la concentración citoplasmática de inositol libre.

Una vez descartada también la participación de los receptores de NMDA, pasamos a estudiar el papel que pudiera tener la GSK3, ya que ésta interviene de modo importante en el procesos apoptótico. De hecho, una sobreexpresión de esta enzima produce la apoptosis de la célula. Además, células que expresan mutantes dominantes negativos de la misma no entran en apoptosis cuando se inhibe a la PI3K

(Pap y Cooper, 1998). El litio se podría estar oponiendo a la acción de la ceramida sobre la GSK3 ya que se ha descrito que la inhibe directamente (Hong y cols., 1997). Este punto parece ser de especial interés, sobre todo teniendo en cuenta los datos mostrados en el capítulo anterior que nos presentan al litio como un inhibidor de la activación de las actividades serina/treonina fosfatasa que se inducen en CGC tras el cambio al medio proapoptótico -KCl. En conjunto, estos datos nos presentan al litio como un agente neuroprotector cuyas acciones evitar la desfosforilación de la PKB y de la GSK3 (Mora y cols., 2001a), acciones que podrían explicar el amplio número de inductores de apoptosis frente a los que el litio es efectivo.

La desfosforilación de la PKB que hemos observado que induce la C<sub>2</sub>-ceramida coincide con datos previos en diferentes sistemas (Schubert y cols., 2000; Salinas y cols., 2000) y también sugiere que en cultivos de CGC la ceramida puede inducir la apoptosis al activar alguna serina/treonina fosfatasa, como parece que puede darse en otros sistemas (Dobrowsky y Hannun, 1992; Chalfant y cols., 1999; Salinas y cols., 2000). Esta inactivación de la PKB es sólo uno de los efectos proapoptóticos descritos para la acción de la ceramida, y podría explicar porqué la protección del litio es solo parcial. El efecto del litio sobre la viabilidad se relacionaría con su capacidad para evitar la desfosforilación de la PKB inducida por la ceramida. En un principio, esto podría ser explicado por una activación de la PI3K causada por el litio. Sin embargo, en el medio hay insulina, la cual está activando a la PI3K como vimos en capítulos anteriores (Mora y cols., 1999), y la ceramida sigue induciendo apoptosis. Además, hemos visto que el litio es capaz de proteger a los cultivos de CGC incluso en presencia de inhibidores de la PI3K (Mora y cols., 1999). Por otro lado, en el capítulo anterior también comprobamos que el litio no activa directamente la actividad de la PKB (Mora y cols., 2001a), por lo que parece probable que el efecto del litio sobre la actividad de la PKB se deba a que evita la desfosforilación de la misma inducida por la C<sub>2</sub>-ceramida.

Estos resultados coinciden con bastante exactitud con los que obtuvimos en el capítulo anterior con un diferente estímulo apoptótico y en los que el litio también prevenía de desfosforilación de la PKB causada, en ese caso, por el medio -KCl (Mora y cols., 2001a). Tomando en consideración el conjunto, ambos resultados parecen sugerir que tanto el medio -KCl como la ceramida comparten un mecanismo común a la hora de inducir la apoptosis: la activación de determinadas actividades



serina/treonina fosfatasas que actuarían sobre la PKB. El litio ejercería su efecto neuroprotector al evitar la activación de las proteína fosfatasa.

Es importante hacer notar que el efecto del litio se debe a que impide la inactivación de la PKB y la activación de la GSK3, al bloquear su desfosforilación. Este modelo contrasta con su propiedad como inhibidor *in vitro* de la actividad de la GSK3. A este respecto, hay que recalcar que, en presencia de C<sub>2</sub>-ceramida y litio, la GSK3 se encuentra fosforilada en su serina 21 y que, por tanto, ya está inhibida. El mismo resultado obtuvimos en el capítulo anterior, al inducir la apoptosis en los cultivos de CGC mediante el cambio al medio -KCl. En ese caso la GSK3 se desfosforilaba incluso en presencia de insulina en el medio, previniendo el litio este efecto (Mora y cols., 2001a).

Aunque existen una serie de trabajos en los que parece bastante claro que la ceramida activa a la PPA (Kowluru y Metz, 1997; Ruvolo y cols., 1999), en otro se descarta la activación de la misma (Zhou y cols., 1998). Sin embargo, lo que si queda bien demostrado es la participación de alguna serina/treonina fosfatasa en la desfosforilación de la PKB causada por la ceramida. Nuestros resultados, por su parte, muestran la activación de una serina/treonina fosfatasa de tipo 2A en los cultivos estimulados con C<sub>2</sub>-ceramida. Como esta activación queda bloqueada en presencia de litio, podemos sugerir que el efecto neuroprotector del litio se debe a que impide la activación de esta proteína fosfatasa por un mecanismo aún desconocido, pero que no es la inhibición directa de dicho ión sobre la PP2A.

En conclusión, nuestros resultados demuestran que la C<sub>2</sub>-ceramida induce la desfosforilación tanto de la PKB como de la GSK3, probablemente a través de la activación que induce de la actividad de una serina/treonina fosfatasa de tipo 2A. Estas tres acciones son bloqueadas por el litio, sugiriendo que su mecanismo neuroprotector está relacionado con la inhibición de la activación de la/s proteína fosfatasa/s que se activaría/n por los diferentes estímulos apoptóticos. Esta conclusión nos muestra una nueva propiedad del litio para explicar su efecto protector y que no se encuentra relacionado con la inhibición descrita *in vitro* de la GSK3 (Klein y Melton, 1996; Stambolic y cols., 1996).

PROTECCIÓN POR EL VALPROATO DE LA  
APOPTOSIS NEURONAL INDUCIDA POR EL MEDIO  
CON BAJA CONCENTRACIÓN DE POTASIO



## INTRODUCCIÓN

Los estabilizantes del humor, litio y valproato (VPA), son ampliamente utilizados para el tratamiento de los trastornos bipolares (Bowden, 1995), siendo ambos igualmente efectivos a la hora del tratamiento de este tipo de pacientes, a pesar de su estructura química totalmente diferente. Las bases moleculares de su acción terapéutica permanecen todavía desconocidas. El hecho de que ambos requieran un largo periodo de tiempo para ejercer su acción hace que se haya pensado que puedan inducir cambios en la expresión génica (Manji y cols., 1995).

Los trabajos de Dixon y Hokin (1997) mostraron que en preparaciones de córtex de rata, el litio y el VPA, por un lado aumentaban la liberación de glutamato, y por otro, incrementaban la acumulación de inositol-(1,4,5)trifosfato (IP<sub>3</sub>). Esto último causaba la depleción del inositol intracelular. Esto sugiere que, en principio, estos efectos pueden ser relevantes a la hora de explicar su actividad terapéutica. Sin embargo, la hipótesis de la depleción del inositol para la acción del litio (Berridge y cols., 1989) ha sido ya descartada tanto para la protección de la apoptosis inducida por -KCl (D'Mello y cols., 1994) como para otros estímulos apoptóticos (Centeno y cols., 1998; capítulo anterior). Está generalmente aceptado que los antidepresivos ejercen su acción estabilizadora del humor por la desregulación gradual y selectiva de determinados receptores. Además, ambos fármacos estimulan la liberación de glutamato, el cual estimula al receptor de NMDA, lo cual sugiere que esta estimulación podría tener relevancia terapéutica (Dixon y Hokin, 1997).

En un intento por dilucidar los mecanismos moleculares por los que ambos fármacos ejercen su acción neuroprotectora se ha demostrado que su empleo crónico aumenta la expresión del gen antiapoptótico Bcl-2 (Chen y Chuang, 1999). Por otro lado, Chen y cols. (1999) han sugerido que la regulación de la expresión de genes mediada por AP-1 podría ser un efecto común del litio y el VPA (Chen y cols., 1999a). Sin embargo, es importante hacer notar que para este tipo de estudios (Ozaki y Chuang, 1997; Asghari y cols., 1998; Chen y cols., 1999b) el litio y el VPA se añaden a células todavía inmaduras (24-48 h *in vitro*) para conseguir tratamientos crónicos con los mismos. Nosotros, por el contrario, hemos realizado tratamientos agudos con los dos fármacos.

Un aspecto interesante de las rutas de transducción es la fuerte regulación existente entre la activación de las diferentes cascadas de quinasas y la señal, bien

extracelular o bien intracelular, que los desencadena. Las variaciones en las concentraciones intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  median la acción de diversas hormonas a través de la regulación puntual de determinadas enzimas claves en las señales de transducción. El efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  viene dado con frecuencia por un efector del mismo, la calmodulina (CaM) (Cohen y Klee, 1988).

A este respecto, la despolarización de la membrana plasmática por las altas concentraciones de potasio produce la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales calcio regulados por voltaje (VGCC) (Collins y Lile, 1989). Una vez en el citoplasma, a través de la  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM, activa las dos vías de transducción que parecen implicadas en la supervivencia de los cultivos de CGC: la vía de la PI3K (Joyal y cols., 1997) y la de las ERK (Egea y cols., 1998). De hecho, se ha postulado que ligeros aumentos en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracitoplasmático (del orden de menos de 100 nM sobre el nivel basal) promoverían la supervivencia de cultivos de neuronas incluso en ausencia de factores tróficos (ver revisión de Franklin y Jonson, 1992).

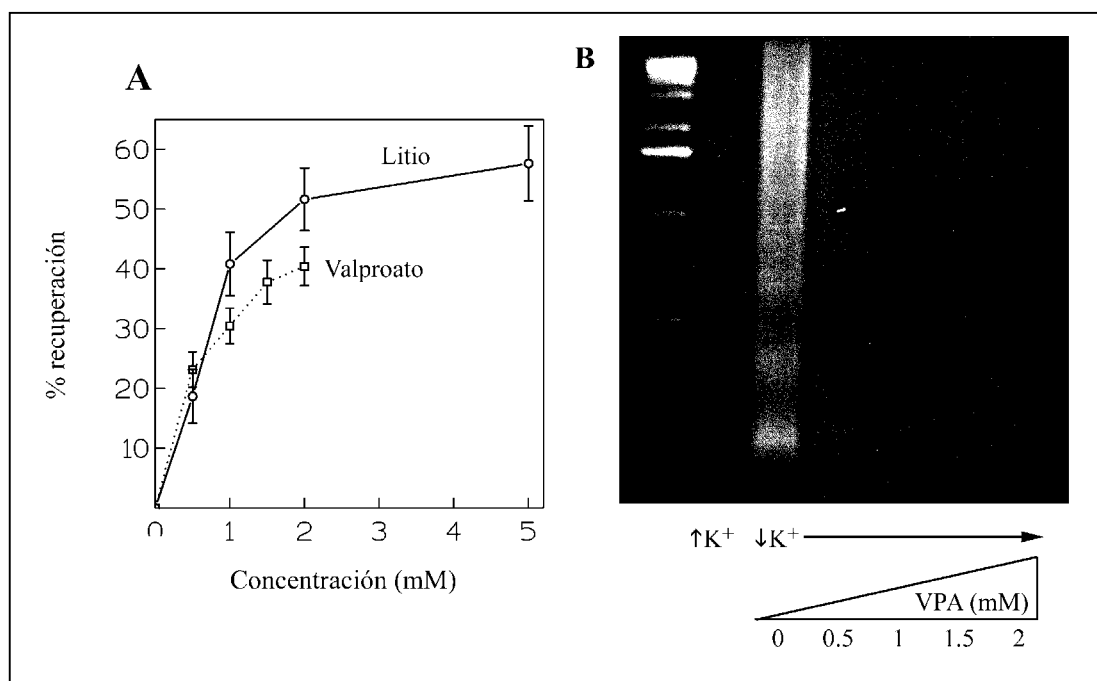
Sin embargo se sabe bien poco de la importancia de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$ , una vez dentro de la célula, en el fenómeno apoptótico. Esta homeostasis intracelular es principalmente mantenida por el retículo endoplasmático (Meldolesi y Pozzan, 1998). En respuesta a gran variedad de estímulos externos, el calcio es liberado desde el lumen del retículo a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . Estas respuestas están fundamentalmente mediadas por los receptores IP3 y de rianodina (Bootman y Berridge, 1995). Estos últimos pueden activarse por la cafeína. La mayoría del calcio del citoplasma va a ser eliminado del citoplasma a través del la ATPasa del retículo (SERCA) (Clapham, 1995), la cual se inhibe por el fármaco tapsigargina (Davidson y Varhol, 1995).

En este capítulo mostramos que en cultivos maduros de CGC el tratamiento agudo con VPA protege, al igual que el litio (D'Mello y cols., 1994), de la apoptosis inducida por el cambio a un medio  $-\text{KCl}$ . Intentaremos profundizar en la relación de la vía PI3K/PKB con la señalización antiapoptótica y analizamos las diferentes dependencias de la misma del litio y del valproato. También compararemos los efectos de ambos fármacos en la apoptosis inducida por ceramida, y en la activación de la caspasa 3, una de las principales caspasas implicadas en este proceso (Thornberry y Lazebnik, 1998). Además, vamos a intentar estudiar sucintamente la implicación del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular en la supervivencia de los cultivos mantenidos en el medio  $+\text{KCl}$ . Además comprobaremos la posible implicación de la supervivencia

inducida por el valproato con los reservorios internos de  $\text{Ca}^{2+}$ , posiblemente con el retículo endoplasmático.

## RESULTADOS

La dependencia de concentraciones despolarizantes de  $\text{K}^+$  (25 mM) para la supervivencia de los cultivos maduros de CGC se conoce ya desde hace tiempo (D'Mello y cols., 1993; Gallo y cols., 1987). Además se conoce que la apoptosis inducida por el cambio a un medio  $-\text{KCl}$  ( $\text{K}^+$  5 mM) se protege por un tratamiento agudo con litio (D'Mello y cols., 1994). Como mostramos en la figura 39A, el tratamiento agudo con VPA también protege, de manera dependiente de su concentración, de la apoptosis inducida por el cambio al medio  $-\text{KCl}$ . El rango de concentraciones en los que se previene la apoptosis concuerda con la dosis farmacológica del VPA (0.7 mM) (Bowden, 1995). Este efecto del valproato es específico, ya que el empleo de su isómero farmacológicamente inactivo (ácido octanoico) no reproduce los efectos neuroprotectores (datos no mostrados). Además,



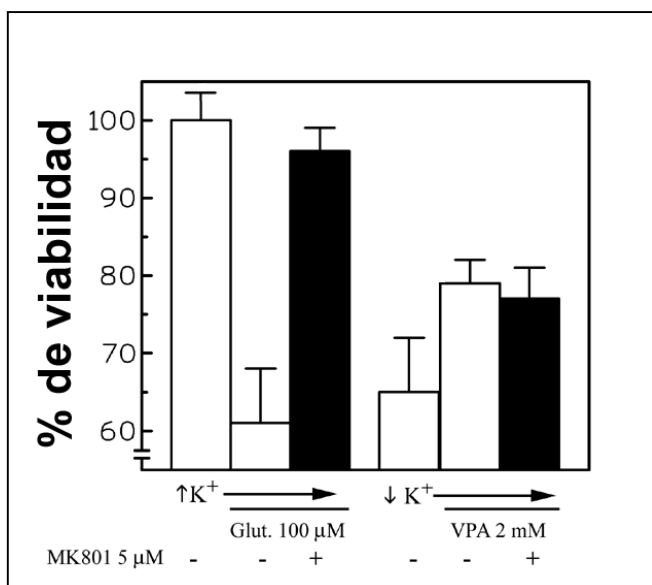
**Figura 39. Protección del valproato frente a la apoptosis inducida por el medio  $-\text{KCl}$ .** (A) Las CGC en  $-\text{KCl}$  fueron tratadas con diferentes concentraciones de litio (círculos) o VPA (cuadrados) en presencia de 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de insulina en el medio. (B) La fragmentación del ADN se estudió a las 24 h de la adición del VPA mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.4%.

y de acuerdo con los datos de viabilidad, el VPA también inhibe la fragmentación del ADN que se produce en la apoptosis inducida por el cambio al medio  $-KCl$  (Figura 39B).

Se sabe que el litio y el valproato aumentan la liberación de glutamato, y este efecto puede estar implicado en su actividad como fármacos antidepresivos (Dixon y Hokin, 1997). Aunque ya lo hemos descartado para el efecto neuroprotector del litio, decidimos comprobar si el VPA ejerce su acción protectora como consecuencia de la activación de algún receptor de glutamato. Sin embargo, la inhibición de la actividad del canal de  $Ca^{2+}$ , del receptor de NMDA, por parte del MK801 (5  $\mu M$ ) tampoco bloquea la capacidad del valproato de proteger frente a la apoptosis (Figura 40).

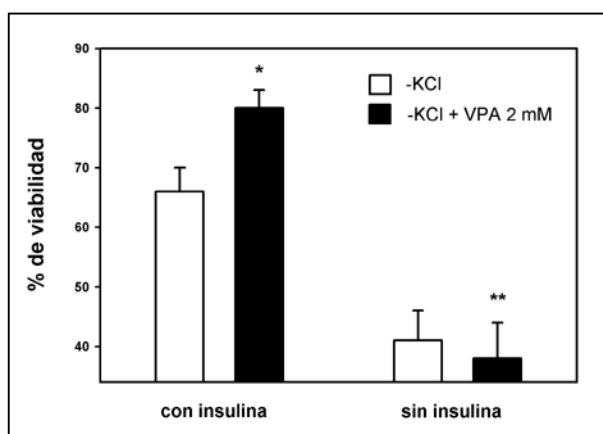
Se ha visto que el tratamiento crónico con litio (Klein y Melton, 1996; Takahashi y cols., 1999), y recientemente también con valproato (Chen y cols., 1999b), inhiben la actividad de la GSK3. Esta enzima es uno de los sustratos directos *in vivo* de la PKB, la cual promueve señales de supervivencia celular y protege frente a la apoptosis inducida por muy diferentes estímulos (Marte y Downward, 1997). Su activación en respuesta a factores de crecimiento (insulina, IGF-1, etc.) viene mediada por la PI3K. Por ello decidimos estudiar el papel que pudiera jugar esta vía de transducción en la supervivencia inducida por los tratamientos crónicos con litio y con valproato.

La figura 41 representa la dependencia de la insulina para el efecto protector del valproato. Los resultados en ausencia de insulina en el medio nos mostraban, en el capítulo 2 de Resultados (Figura 22; Mora y cols., 1999), que el litio promovía la



**Figura 40.- Efecto del MK801 en la acción del valproato.**

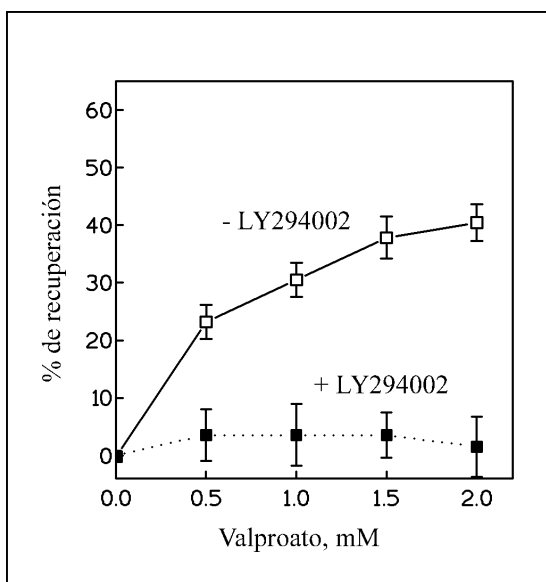
Una concentración 5  $\mu M$  de MK801 (barras negras) no pudo disminuir significativamente la supervivencia inducida por el VPA en el medio  $-KCl$  con  $8.721 \cdot 10^{-4}$  M de insulina. Sin embargo, el MK801 bloquea los efectos tóxicos que produce el glutamato en el medio  $+KCl$ .



**Figura 41. Efecto de la insulina sobre la acción del Valproato.** Consideramos el 100% de viabilidad a los cultivos en +KCl. Los cultivos se cambiaron al medio -KCl (□) en ausencia o presencia de  $8.7 \cdot 10^{-4}$  M de insulina. En estas condiciones se añadió VPA a 2 mM (■). \*: significativamente diferente ( $p < 0.05$ ) de -KCl con insulina. \*\*: no significativamente diferente ( $p > 0.05$ ) de -KCl sin insulina.

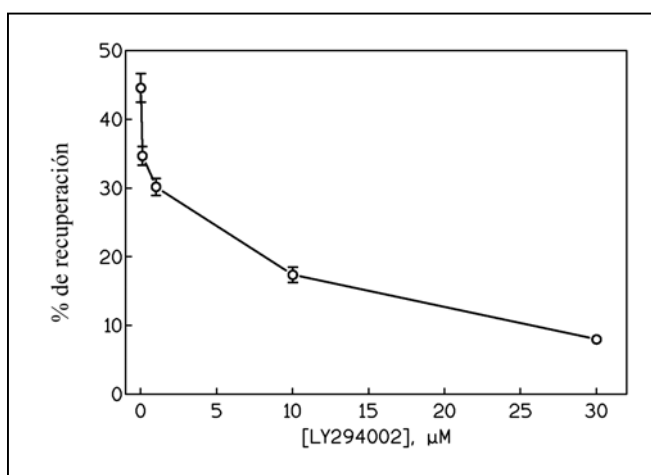
supervivencia de los cultivos de CGC en el medio -KCl mientras que el valproato, como vemos ahora (Figura 41), es incapaz de hacerlo. Este dato nos sugiere que el efecto neuroprotector del valproato depende de la existencia de una vía de transducción activada por la insulina.

Como la neuroprotección del valproato en CGC mantenidas en -KCl es dependiente de la insulina, la cual activa a la PI3K, estudiamos el efecto del inhibidor de dicha enzima, el LY294002, en la supervivencia promovida tanto por el litio como por el valproato. Así, en la figura 42 se puede observar que el LY294002, a una concentración de 30  $\mu$ M, bloquea la protección debida al valproato en un medio -KCl con 5  $\mu$ g/ml de insulina. Por el contrario, ya habíamos visto en el capítulo de 2 de Resultados (Figura 23) que no puede bloquear la protección debida al litio (Mora y cols., 1999). Además, como se puede ver en la figura 43, el bloqueo de la protección que produce el LY294002 es dependiente de su concentración. Estos resultados nos indican que el litio y el valproato ejercen su acción neuroprotectora a través de diferentes mecanismos de acción.



**Figura 42. Acción del LY294002 sobre la neuroprotección del valproato en medio -KCl con 5  $\mu$ g/ml de insulina.** 30  $\mu$ M de LY294002 disminuye la viabilidad del control (+KCl) un 5-10%. Efecto neuroprotector del VPA en presencia (cuadrados negros) o en ausencia (cuadrados blancos) de 30  $\mu$ M de LY294002.





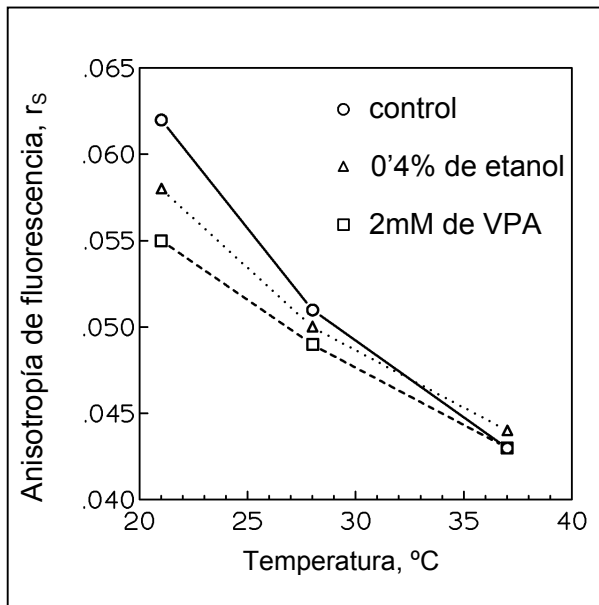
**Figura 43. Efecto del LY294002 en la protección frente a la apoptosis debida a 2 mM de valproato.** Los cultivos se encontraban en  $-\text{KCl}$  con  $5 \mu\text{g/ml}$  de insulina y la viabilidad se midió a las 24 h de la adición del LY294002.

El valproato actúa a través de una vía dependiente de la insulina en la que la PI3K tiene que encontrarse activa. La inhibición de esta actividad por el LY294002 bloquea el efecto protector del valproato. Por tanto el valproato necesita que la PI3K está activada y parece lógico pensar que probablemente ejerza su acción en algún punto posterior de esta vía de transducción: PDK1, PKB, etc. Sin embargo no parece que el litio necesite que esta vía de transducción se encuentre activa.

La diferencia en sus mecanismos de acción podría deberse a su diferente estructura química. El valproato es un ácido graso ramificado de cadena corta (ácido 2-propilpentanoico), por lo que podría ejercer su acción neuroprotectora cambiando la microviscosidad de la membrana plasmática, en la cual la PI3K, la PDK1 y la PKB se encuentran localizadas cuando se activa esta vía de transducción (Andjelkovic y cols., 1997; Anderson y cols., 1998).

Para comprobar esta hipótesis, medimos el efecto del valproato en la microviscosidad de liposomas de lecitina de soja mediante medida de polarización de fluorescencia usando como sonda fluorescente el DPH. En la figura 44 podemos ver los resultados con valproato y, como control, con etanol. Como se puede ver, a  $37^\circ\text{C}$  el valproato no cambia la anisotropía de fluorescencia del DPH y, por tanto, descartamos que el mecanismo de acción de dicho fármaco implique cambios en la microviscosidad de la membrana plasmática.

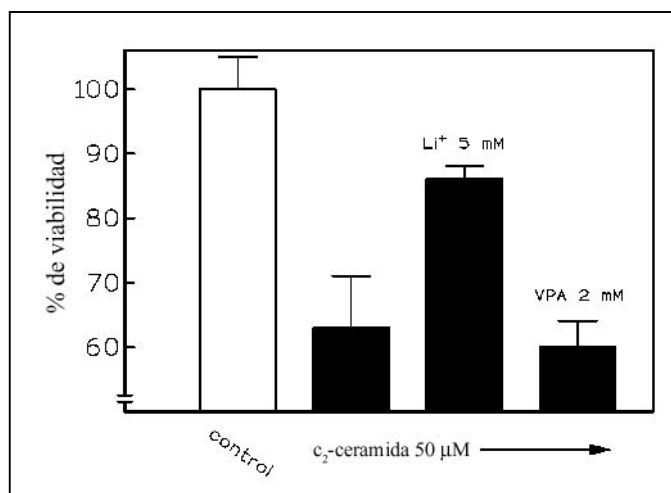
Para poder evaluar el verdadero papel de la PKB en la viabilidad de nuestros cultivos y la dependencia del valproato de esta vía de transducción necesitaríamos utilizar algún inhibidor de esta proteína quinasa. Pero no existe ninguno comercialmente disponible, por lo que decidimos emplear en su lugar un paradigma apoptótico en el que se induce la inhibición de la PKB. Como ya vimos en el capítulo anterior, se ha descrito que la ceramida induce la desfosforilación de la PKB, y por



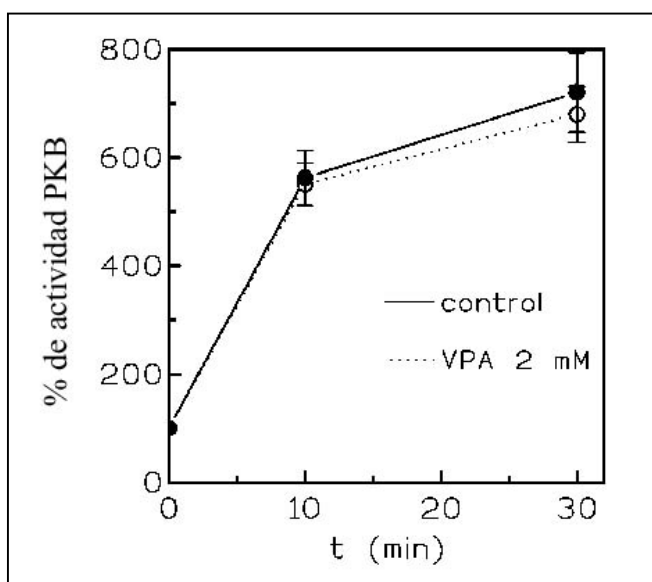
**Figura 44. Efecto del VPA en la anisotropía de fluorescencia de liposomas de lecitina.** Los círculos corresponden a los liposomas control, los triángulos al control con etanol y los cuadrados a los liposomas a los que se les añadió el valproato.

tanto su inhibición (Schubert y cols., 2000). La inducción de la apoptosis por la ceramida es dependiente de la actividad de la vía de la PI3K (Burrow y cols., 2000) y como ya describimos en el capítulo 3 de Resultados en las CGC se protege por el tratamiento agudo con litio (Centeno y cols., 1998). Como se puede observar en la figura 45, el valproato no puede proteger frente a la apoptosis inducida por la C<sub>2</sub>-ceramida. Este resultado, junto con los de las figuras 41, 42 y 43, apoyan el hecho de que el valproato necesita, para tener efecto neuroprotector, que la PKB se encuentre activa, necesidad que sin embargo, como hemos visto anteriormente no comparte con el litio (Mora y cols., 1999; Mora y cols., 2001b).

A este respecto, se ha descrito en CGC que el tratamiento crónico con litio induce un pequeño aumento en la actividad de la PKB (Chalecka-Franaszek y Chuang, 1999). Como esta posibilidad pudiera producirse para el caso del valproato, medimos el efecto del mismo en la activación de la PKB producida por la insulina. En la figura 46 podemos observar como la insulina induce el aumento esperado en la



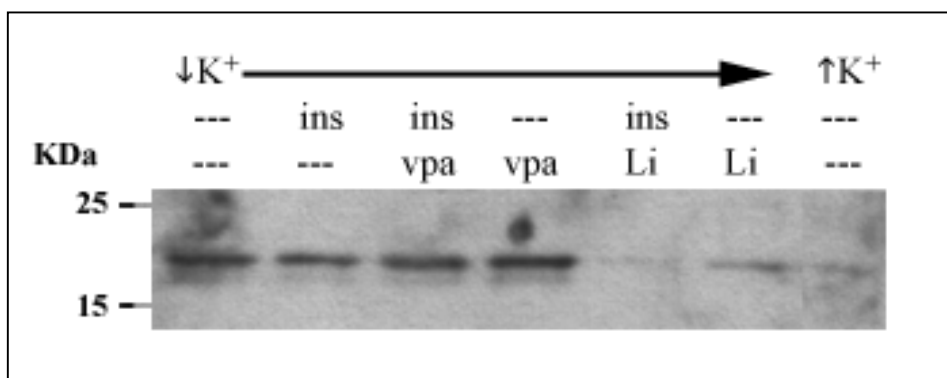
**Figura 45. Efecto del litio y del valproato sobre la apoptosis inducida por ceramida.** La adición de C<sub>2</sub>-ceramida al medio (barras negras) induce apoptosis en los cultivos de CGC. Li<sup>+</sup> 5 mM protege parcialmente, pero VPA (2 mM) es incapaz de hacerlo.



**Figura 46. Análisis del efecto del valproato en la actividad PKB.** En el 6º DIV se cambió el medio a +KCL sin insulina durante toda la noche. El 7º DIV se cambió a -KCL sin insulina durante 1 h para después cambiar a -KCL con  $8'721 \cdot 10^{-4}$  M de insulina con o sin valproato (2 mM). Los lisados para medir la actividad de la PKB se obtuvieron a los tiempos indicados.

actividad de la PKB (unas siete veces), pero, sin embargo, el valproato no modifica este patrón de activación. Al necesitar que la PKB se encuentre activa, pero no inducir ninguna variación en su patrón de activación, parece lógico pensar que el valproato esté ejerciendo su acción en algún punto posterior a la activación de esta enzima.

Uno de los pasos posteriores dentro de la cascada apoptótica es el mediado por las cisteína proteasas llamadas caspasas. Dentro de esta familia, la caspasa 3 se encuentra en el grupo de las caspasas efectoras (Thornberry y Lazebnik, 1998). Sabiendo además, como hemos visto en el capítulo 1 de Resultados, que esta caspasa se encuentra implicada en la apoptosis inducida en CGC por el medio -KCL (Mora y cols., 2001a y b), decidimos comprobar si su activación era afectada por los tratamientos con valproato. Empleando un anticuerpo que reconoce la forma

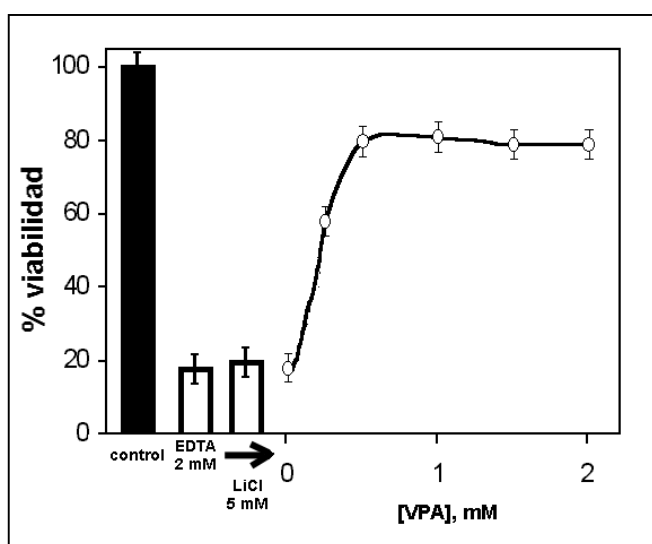


**Figura 47. Acción del VPA sobre la activación proteolítica de la procaspasa 3.** Tras 7 DIV, el medio se cambió a +KCL o -KCL con o sin alguno de los siguientes efectores: insulina ( $8'7 \cdot 10^{-4}$  M), valproato (2 mM) o litio (5 mM). Los lisados se obtuvieron a las 24 h y se tomaron 20 µg de proteínas para la electroforesis y el posterior revelado con anticuerpos frente a la caspasa 3 proteolizada.

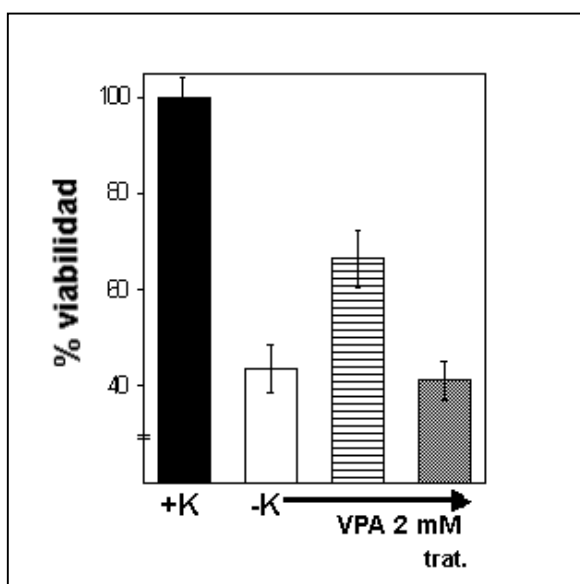
proteolizada, y por tanto activa, de la caspasa 3 comprobamos que ni la insulina, ni el valproato ni ambos juntos son capaces de afectar a la activación de la caspasa 3 (Figura 47). Sin embargo, habíamos visto que el litio impedía su activación tanto en presencia como en ausencia de insulina en el medio (Mora y cols., 2001a y b). Estos resultados nos diferencian los mecanismos de acción de ambos fármacos. Por un lado el litio, que impide la activación de la caspasa 3; y por otro el valproato, que al igual que la insulina, es incapaz de bloquear la activación de esta proteasa ejecutora de la apoptosis.

Como la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma es el inicio de la señal de supervivencia producida por el medio +KCl, decidimos comprobar el efecto que tenía sobre la viabilidad del cultivo el impedir la entrada del  $\text{Ca}^{+}$  a la célula. Añadiendo EDTA a un concentración final de 2 mM vemos que la viabilidad se reduce casi totalmente (Figura 48). Esta concentración de EDTA ya se ha descrito con anterioridad como suficiente para evitar la entrada del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular a través de los canales VGCC evitando la activación tanto de la vía PI3K como de la vía ERK, con lo que aunque estén los cultivos en condiciones despolarizantes no sobreviven (Fisher y cols., 1998; Egea y cols., 1998; Soler y cols., 1998). Como podemos ver en esta misma figura, mientras que el litio es incapaz de proteger de este descenso en la viabilidad, el VPA tiene un claro efecto neuroprotector.

Siendo tan necesario el  $\text{Ca}^{2+}$  para las funciones celulares, nos planteamos si el VPA estaba compitiendo con el EDTA por el mismo o si estaba liberando  $\text{Ca}^{2+}$  de los depósitos internos celulares. Para comprobar esta última hipótesis decidimos vaciar de  $\text{Ca}^{2+}$  los depósitos del retículo para ver si entonces el VPA podía proteger de la apoptosis inducida por el medio -KCl. Para ello tratamos durante 10 minutos con



**Figura 48. Protección del VPA frente a la muerte causada por el EDTA.** En el 7º DIV se añadió al medio de cultivo EDTA hasta una concentración final de 2 mM. A su vez se añadió bien litio (5 mM), bien VPA a diferentes concentraciones (O). A las 18 h tras la adición del EDTA se midió la viabilidad de los cultivos.



**Figura 49. Efecto de la depleción de los reservorios intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la protección por VPA.** El VPA se añadió a una concentración 2 mM a los cultivos cambiado al medio  $-\text{KCl}$ . Además un grupo (trat.) fue incubado con cafeína 20 mM durante 30 min y tras el cambio de medio además del VPA se añadió taspigargina 10  $\mu\text{M}$ . La viabilidad se midió a las 24 h tras el cambio de medio.

cafeína para estimular su salida, y en el cambio de medio se incluyó taspigargina, para evitar la posterior re-entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al retículo endoplasmático. Como se puede ver en la figura 49, este tratamiento impide que el VPA, aún en presencia de insulina, promueva la supervivencia de los cultivos en  $-\text{KCl}$ . Estos resultados sugieren que el  $\text{Ca}^{2+}$  existente en el retículo endoplasmático sea fundamental para la neuroprotección del valproato frente a la apoptosis inducida por el medio  $-\text{KCl}$  en los cultivos de CGC.

## DISCUSIÓN

Nuestros resultados muestran que el tratamiento agudo con valproato protege a los cultivos de CGC de la apoptosis inducida por el cambio al medio  $-\text{KCl}$ . Anteriormente se había descrito el mismo efecto para el litio (otro fármaco estabilizante del humor) mediante un mecanismo en el que podría estar implicada la activación de una tirosina quinasa (D'Mello y cols., 1994). La actividad del litio como inhibidor de la inositol monofosfatasa sugirió en principio la hipótesis de la depleción del inositol para explicar su acción neuroprotectora y la terapéutica. Sin embargo, diversos estudios ya han descartado esta hipótesis (D'Mello y cols., 1994; Centeno y cols., 1998; Chalecka-Franaszek y Chuang, 1999; capítulo anterior) y parece estar de acuerdo con el hecho de que el valproato no sea un inhibidor de este tipo de fosfatasa (Vadnal y Parthasarathy, 1995). Por otro lado, ambos fármacos incrementan la liberación de glutamato (Dixon y Hokin, 1997) lo

que podría generar una señal de supervivencia al aumentar la concentración citoplasmática de  $\text{Ca}^{2+}$ . Sin embargo, el MK801 es incapaz de revertir significativamente el efecto protector del litio y del valproato como hemos visto en las figura 21 y 40. Estos resultados coinciden con los obtenidos anteriormente para la apoptosis inducida por la  $\text{C}_2$ -ceramida (Centeno y cols., 1998; capítulo anterior) y eliminan la liberación del glutamato como mecanismo molecular para sus acciones neuroprotectoras.

Recientemente han aparecido un gran número de evidencias que nos muestran al litio y al valproato como reguladores de la expresión de genes en un gran número de líneas celulares y modelos animales en diversas condiciones. Chen y Chuang (1999) han descrito que el tratamiento crónico, pero no el agudo, con litio protege frente a la excitotoxicidad debida al glutamato al bloquear la expresión de los genes proapoptóticos p53 y Bax e incrementar la expresión de Bcl-2 en cultivos de CGC. Además, muestran que los niveles de Bcl-2 se aumentan en los tratamientos crónicos con litio y con valproato (Chen y Chuang, 1999). A este respecto se ha descrito para el litio (Klein y Melton, 1996) y para el valproato (Chen y cols., 1999b) una actividad común como inhibidores *in vitro* de la GSK3. Como esta enzima es sustrato de la PKB cuando se activa por la PI3K (ver revisión de Marte y Downward, 1997), decidimos comprobar la posibilidad de una activación de la PI3K por parte del valproato, como explicación de la actividad neuroprotectora de ambos fármacos. De hecho, la vía de transducción PI3K/PKB ha sido implicada en otras señales de supervivencia frente a la apoptosis (Centeno y cols., 1998; Chen y Chuang, 1999; Chalecka-Franaszek y Chuang, 1999; Mora y cols., 2001a).

La neuroprotección debida al valproato desaparece cuando no hay insulina en el medio, efecto que no observamos con el litio (Mora y cols., 1999; Mora y cols., 2001b). Además en presencia de insulina la señal de supervivencia es inhibida por el LY294002 con una  $K_{0.5}$  de alrededor de 5  $\mu\text{M}$ , lo que concuerda con la concentración efectiva de inhibición de la PI3K (Vlahos y cols., 1994). Estos resultados nos indican que la supervivencia inducida por el valproato necesita que la vía de transducción PI3K/PKB se encuentre activa. De ahí que el valproato pueda ser que actúe en algún punto posterior a la PI3K en dicha vía de transducción. El valproato, al ser un ácido graso ramificado, podría ejercer su

acción al cambiar la microviscosidad de la membrana plasmática y de alguna forma favorecer la activación de la PDK1 o de la PKB. No obstante, nuestros resultados descartan esta hipótesis, ya que a 37°C no hay cambios en la microviscosidad. Lo que si parece claro es que el valproato sólo aumenta la viabilidad de los cultivos de CGC en medio -KCl cuando la vía PI3K/PKB se encuentra activa.

Para confirmar este último punto decidimos emplear la ceramida como estímulo apoptótico ya que en este sistema la PKB se encontraría inactivada (Schubert y cols., 2000; Burrow y cols., 2000). Como hemos visto en la figura 44, el valproato es incapaz de proteger frente a este estímulo apoptótico mientras que el litio si lo es (Centeno y cols., 1998). Ya que la ceramida induce la desfosforilación de la PKB, y por tanto su inactivación (Schubert y cols., 2000), nuestros resultados vuelven a incidir en la necesidad de una vía PI3K/PKB activa para permitir el efecto neuroprotector del valproato.

Una posible explicación sería la de considerar al valproato como un modulador positivo de la actividad de la PKB. Para ensayar esta hipótesis primero cambiamos los cultivos durante una hora a un medio -KCl sin insulina. Así reducíamos totalmente la actividad de la PKB, la cual podíamos ahora activar mediante la adición de insulina. En estas condiciones (Figura 46) se activaba, dependientemente del tiempo, la actividad de la PKB. Sin embargo, el valproato no induce ningún cambio en esta activación.

Existen resultados que describen tanto al litio (Klein y Melton, 1996; Takahashi y cols., 1999) como al valproato (Chen y cols., 1999) como inhibidores de la GSK3, y apuntan la posibilidad de que ambos fármacos encuentren su acción neuroprotectora al actuar sobre el mismo punto en la vía PI3K/PKB. Sin embargo, nuestros resultados muestran claras diferencias respecto a la acción de ambos fármacos dentro de esta misma vía de transducción. Sólo cuando la insulina está presente, el valproato es capaz de proteger a los cultivos frente a la apoptosis. En estas condiciones, la insulina está activando a la PKB (Figura 46), y por tanto la GSK3 se debe encontrar inactiva. Esto nos indica que tanto la protección del litio, como la del valproato, en estas condiciones se debe estar produciendo por algún efecto adicional a la inhibición de la GSK3. Además, los efectos observados para valproato son contradictorios, ya que cuando no hay insulina en el medio, no observamos recuperación de viabilidad, por lo que, la inhibición que éste produce

*in vitro* sobre la GSK3 (Chen y cols., 1999b) probablemente no tenga lugar *in vivo*.

Este mismo efecto lo observamos cuando inhibimos la PKB con C<sub>2</sub>-ceramida, estando por tanto la GSK3 plenamente activa. Estos resultados, tomados en su conjunto, nos presentan un mecanismo neuroprotector para el valproato sin relación con su propiedad como inhibidor *in vitro* de la GSK3, y para el litio independiente de si la GSK3 se encuentra activa (-KCl sin insulina, ceramida) o inactiva (-KCl con insulina).

También hemos encontrado diferencias en el bloqueo de la activación de la caspasa 3. El litio es capaz de impedir su activación, mientras que ni el valproato ni la insulina afectan a la activación de esta proteasa. Estos resultados inciden en la hipótesis de que el valproato y la insulina deben compartir algún punto en sus mecanismos respectivos de protección y ese mecanismo no estaría relacionado con la regulación de la activación de caspasas. Además indican un diferente mecanismo para el litio, que parece actuar en algún punto anterior a la activación de la caspasa 3.

Era de esperar que el litio fuera incapaz de proteger frente a la muerte causada por haber quelado el Ca<sup>2+</sup> extracelular, sin embargo, que el valproato (VPA) sea capaz de inducir la supervivencia en estos cultivos no deja de ser un resultado francamente inesperado (Figura 48). Es notorio además, que el patrón de protección sea diferente ya que se alcanza el máximo de viabilidad con solo 0'5 mM y no como en la protección de -KCl que el máximo se daba a 2 mM (Figura 39) (Mora y cols., 1999).

Los resultados obtenidos con la depleción del Ca<sup>2+</sup> de los reservorios intracelulares (Figura 49) apuntan a que el VPA sería un “movilizador” de Ca<sup>2+</sup>, posiblemente desde el retículo endoplasmático. De hecho, durante la escritura de esta tesis, ha aparecido un artículo en el que se demuestra que el VPA evita la desfosforilación de las ERK que describimos en el capítulo inicial de Resultados (Yuan y cols., 2001). Esta activación de ERK se corresponde bien con el efecto activador sobre la misma vía descrito para el Ca<sup>2+</sup> a través de la CaM (Egea y cols., 1998). De hecho, tanto la activación de las ERK por VPA (Yuan y cols., 2001) como por la despolarización (Egea y cols., 1999) comparten la característica de necesitar que se encuentre activa Ras. Este dato podría tener relación con el hecho de que el VPA necesitara la insulina para ejercer su acción neuroprotectora, ya que la insulina



puede activar Ras a través del sustrato del receptor de insulina, IRS-1 (Kim y cols., 1997).

Sin embargo, el modo en el que el VPA pueda activar la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  de los reservorios intracelulares es desconocido. A este respecto existen datos que parecen apuntar al retículo endoplasmático, ya que el VPA aumenta la expresión de GRP78, una chaperona implicada en la regulación del  $\text{Ca}^{2+}$  en el retículo endoplasmático, mientras que el litio no la afecta en absoluto (Wang y cols., 1999). De todas formas este punto necesitará una mayor clarificación y un estudio detallado de la hipotética salida de  $\text{Ca}^{2+}$  al citoplasma.

## **DISCUSIÓN**



### Apoptosis en los cultivos primarios de células granulares de cerebelo

Los cultivos primarios de CGC son un modelo ampliamente extendido en el estudio de la apoptosis neuronal (Ito, 1984a). De hecho, hemos podido comprobar como, con el simple cambio al medio  $-KCl$ , aparecen los principales eventos de la apoptosis: activación de las caspasas efectoras 3 y 7, proteólisis de la PARP y fragmentación del ADN. El hecho de que los fenómenos apoptóticos descritos se hayan correspondido bien con la disminución de la viabilidad de los cultivos medida por la reducción del MTT (Mosmann, 1983) nos ha permitido estudiar de una manera sencilla el efecto de los diversos fármacos sobre los cultivos, tanto a la hora de inducir apoptosis como a la hora de proteger de la misma. Así, con las medidas de viabilidad describimos el efecto neuroprotector de los dos fármacos utilizados en este estudio, litio y valproato, que, como vimos en estudios un poco mas amplios, evitan la fragmentación del ADN característica del proceso apoptótico. Además, al ser un cultivo primario, se acerca más a las condiciones fisiológicas, lo que le confiere ciertas ventajas sobre los sistemas de líneas celulares que también se pueden emplear para este tipo de estudios. Aunque para el estudio particular de las vías de transducción no representan ninguna ventaja, el estudio de la importancia de dichas vías en las distintas funciones celulares se aproxima más a las condiciones *in vivo* que se pueden dar en los organismos. De ahí que consideremos este tipo de cultivos primarios una buena aproximación no sólo para comprender los fenómenos apoptóticos, sino para el estudio de las características neuroprotectoras de los diversos fármacos. Aunque no podamos dilucidar el efecto que tendrán en los organismos, el hecho de identificar la diana molecular sobre la que actúan puede ser de gran ayuda a la hora de diseñar nuevos fármacos y nuevas estrategias terapéuticas.

Utilizando las medidas de viabilidad de los cultivos, hemos visto que de las dos vías descritas como inductoras de la supervivencia de nuestros cultivos, PI3K y ERK, la segunda parecería ser la más fundamental. Sin embargo, no podemos descartar la acción de la vía PI3K/PKB, ya que su inhibición disminuye en cierta medida la viabilidad de los cultivos. De hecho, experimentos de otro grupo (Miller y cols., 1997) ponen de manifiesto la implicación de esta vía de transducción en la supervivencia de este tipo de cultivos. Nuestros propios resultados apoyan esta hipótesis al indicar que la acción neuroprotectora del litio parece deberse a que bloquea la inhibición de esta cascada de transducción inducida tanto por el cambio al

medio  $-KCl$  (Mora y cols., 2001a) como por la adición de ceramida. Como ya hemos comentado, las diferencias entre los experimentos de Miller y cols. (1997) y los nuestros podrían deberse a que nosotros en el medio tenemos insulina. Ésta, estaría activando a la PKB a través de la PI3K, lo cual se sumaría a los efectos activadores de esta vía debidos a las concentraciones despolarizantes de potasio del medio  $+KCl$ . Respecto al papel protector de la insulina, es interesante el hecho de que, aunque aumenta la viabilidad de los cultivos, no es capaz de disminuir la activación por proteólisis de la caspasa 3. El hecho de que a las 48 h tras el cambio de medio con insulina la viabilidad sea menor que a las 24 h (datos no mostrados) apunta la posibilidad de que la insulina simplemente esté retrasando esta activación. De todas formas, este punto requiere una mejor aclaración que debería llevarse a cabo estudiando con detalle si la insulina altera la cinética de activación de la caspasa 3 y/o su translocación al núcleo (Mandal y cols., 1999).

Otro de los hechos que apoyan la importancia de esta vía de transducción son los efectos proapoptóticos descritos para la GSK3 (Pap y Cooper, 1998). Recientemente se ha puesto de manifiesto su participación en la inducción de la apoptosis en diversos sistemas (Bijur y cols., 2000; Cross y cols., 2001). De hecho, hasta ahora los efectos neuroprotectores tanto del litio como del valproato se habían explicado por su efecto como inhibidores de esta proteína quinasa (Klein y Melton, 1996; Chen y cols., 1999b).

Al igual que lo que sucede con la PKB, el cambio al medio  $-KCl$  induce la desfosforilación, y por tanto la inactivación, de las ERK1 y 2. En este caso, su inhibición con PD184352 (Davies y cols., 2000), si disminuye significativamente la viabilidad del cultivo, aunque no hasta los niveles que lo hace el medio  $-KCl$ . El hecho de que la inhibición de esta vía induzca la apoptosis en los cultivos de CGC pone de manifiesto su importancia en la supervivencia de los mismos. Este punto no ha sido lo suficientemente estudiado por lo que parece claro que es una de las líneas de investigación en la continuación de estos trabajos. Parece que puede ser de gran importancia profundizar en la relación existente entre ambas vías ya que existen bastantes trabajos que establecen sus conexiones (Párrizas y cols., 1997; Kauffmann-Zeh y cols., 1997; Welch y cols., 1998) y su capacidad de promover la supervivencia, en mayor o menor medida, de diversos tipos de cultivos de neuronas (Marte y Downward, 1997; Soler y cols., 1998; Encinas y cols., 1999). Además el hecho de que el valproato parezca inducir la supervivencia a través de la activación de la ERK

(Yuan y cols., 2001) hace aún más necesario un estudio detallado de la implicación de ambas vías en la supervivencia de la CGC y de sus posibles interconexiones.

Aunque la implicación de las dos vías inductoras de supervivencia parece quedar clara con los experimentos realizados, no ocurre lo mismo cuando estudiamos los datos obtenidos sobre las vías proapoptóticas a las que hemos prestado atención. En un principio los resultados neuroprotectores del inhibidor de la p38, SB203580 a 10  $\mu$ M, parecían muy esperanzadores, sobre todo tras su confirmación por otro grupo de investigadores (Harada y Sugimoto, 1999). Sin embargo, el estudio más detallado de este efecto nos indicó que dicha acción era bastante inespecífica, ya que concentraciones menores no tenían efecto sobre la viabilidad de los cultivos de CGC. De hecho, al medir la actividad de la MAPKAPK2, sustrato de la p38 (Rouse y cols., 1994; Freshney y cols., 1994), observamos que disminuye tras el cambio al medio proapoptótico -KCl en lugar de aumentar, como sería lo esperado tras comprobar que el SB203580 protegía frente dicho estímulo apoptótico. Por el momento, y hasta que no sepamos a que proteína quinasa está inhibiendo el SB203580, este punto queda sin esclarecer.

Los resultados que hemos obtenido con la vía de JNK son bastante similares. Esta ruta de transducción se encuentra activada y tras el cambio al medio -KCl se produce su desactivación. Aunque los resultados de otros grupos mostraban la activación de esta vía al inducirse la apoptosis (Yamagishi y cols., 2001), en otros sistemas se ha relacionado la actividad protectora del litio con su capacidad de activarla (Yuan y cols., 1999). Esto último es lo que podemos confirmar con nuestros resultados, ya que hemos visto como el litio es capaz de inhibir la desfosforilación de la JNK inducida por el medio -KCl. De todas maneras, nuestros resultados muestran que la apoptosis inducida por el cambio al medio -KCl está acompañada de la inactivación de dos de las vías descritas como proapoptóticas.

Esto último ha sido algo ciertamente inesperado y que hace que planteemos nuestro sistema apoptótico de un modo diferente. El cambio al medio -KCl no parece por tanto inducir la activación de las vías proapoptóticas que, de hecho, se encuentran ya activadas en las condiciones iniciales de supervivencia (medio +KCl). En este punto conviene recordar que las concentraciones fisiológicas de  $K^+$  son las que se encuentran en el medio -KCl. De hecho la concentración del medio +KCl (25 mM  $K^+$ ) debe producir un estrés a la célula que puede que sea el causante de que se encuentren activas las llamadas SAPK o proteína quinasas activadas por estrés (tanto

JNK como p38). De todas formas, las concentraciones despolarizantes simulan la estimulación de la neuronas que durante el desarrollo y la maduración del SNC es la responsable de la supervivencia de sólo aquellas células que han establecido las conexiones correctas (Oppenheim, 1991). De ahí que podamos plantear que la apoptosis “fisiológica” que se produce durante el desarrollo no parece deberse a la inducción de vías de transducción proapoptóticas, si no a la falta de activación de las vías antiapoptóticas o de supervivencia. Esta activación estaría mediada tanto por los factores de crecimiento neuronales como por la propia estimulación nerviosa (Gallo y cols., 1987), la cual no deja de ser despolarizaciones de la membrana. Así, la falta de estimulación (como en el medio  $-KCl$ ) no activaría las vías de transducción necesarias para la supervivencia (PI3K y ERK) y se produciría la apoptosis digamos que de una forma “espontánea”. Así encontraremos, que las enfermedades neurodegenerativas en las que se produce la apoptosis de las neuronas del SNC, podrán deberse tanto a la hiperestimulación de vías proapoptóticas como a la inhibición de las señales de supervivencia, produciéndose siempre un desequilibrio entre las diferentes cascadas de transducción de señales. Por lo tanto, la caracterización exacta del proceso será de vital importancia a la hora de plantear una correcta estrategia terapéutica. Respecto a esta última contaremos no ya sólo con la inhibición de las señales proapoptóticas, si no que también deberemos plantear la posibilidad de activar vías como la de la PI3K o la de las ERK. En este marco, los sistemas de cultivos primarios aparecen como una buena herramienta para estudiar las implicaciones de las diferentes vías en las diversas poblaciones neuronales del SNC, así como un buen sistema para ensayar fármacos y tratar de dilucidar las dianas moleculares más relevantes antes de pasar a los estudios *in vivo* con animales.

### **Efecto neuroprotector del valproato**

Nuestros resultados han mostrado por primera vez que el tratamiento agudo con valproato protege a los cultivos de CGC de la apoptosis inducida por el cambio al medio  $-KCl$  (Mora y cols., 1999; Mora y cols., 2001b). Como esta característica la compartía con otro fármaco (el litio) empleado igualmente en el tratamiento de los trastornos maníaco-depresivos (Bowden y cols., 1994), pensamos que también podrían presentar algún mecanismo común en su acción neuroprotectora. A pesar de

que sus estructuras químicas son totalmente distintas (uno es un ión y el otro un ácido graso), ya se habían descrito algunos otros efectos comunes (Dixon y Hokin, 1997) y, de hecho, se había planteado la hipótesis de que ambos serían inhibidores de la GSK3 y por tanto se planteó esta característica como la responsable del mecanismo neuroprotector de ambos fármacos (Klein y Melton, 1996; Chen y cols., 1999b). Sin embargo, a la vista de los resultados que hemos obtenido podemos descartar totalmente que el valproato proteja de la apoptosis inducida por el medio proapoptótico -KCl mediante la inhibición de la GSK3. Lo más característico de la protección mediada por el valproato es que sólo se produce cuando en el medio hay insulina o IGF-1 (datos no mostrados), los cuales, a través de la PKB estarían fosforilando e inhibiendo a la GSK3 (Marte y Downward, 1997). Cuando la GSK3 se encuentra activa el valproato es incapaz de inducir la supervivencia de los cultivos, con lo que queda descartada totalmente la posibilidad de que inhiba a la GSK3 y así proteja de la apoptosis. Con el litio, que también se ha descrito que inhibe a la GSK3 (Klein y Melton, 1996; Stambolic y cols., 1996), esto no pasa, por lo que descartamos que en este sistema la inhibición de la GSK3 no sea capaz de inducir la supervivencia del cultivo. Es más, cuando utilizamos como estímulo apoptótico ceramida, ni siquiera en presencia de insulina es capaz el valproato de proteger frente a ella. Probablemente el efecto que la ceramida tiene al desfosforilar a la PKB bloquea totalmente cualquier posible efecto del valproato. Todo parece indicar que el valproato necesita que esta vía esté estimulada (estando la GSK3 inactiva) para poder tener un efecto protector. El a qué se debe esto no hemos sido capaces de dilucidarlo, aunque puede tener relación con el hecho de que en ausencia de insulina el valproato no sólo no protege si no que disminuye la viabilidad de los cultivos.

El motivo de esta toxicidad no parece claro, aunque si se confirmara la hipótesis de que induzca la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los reservorios internos podríamos encontrar la respuesta. Hemos visto que el valproato protege frente a la ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio extracelular, por lo que parece adecuado pensar que liberaría el mismo para que la neurona pudiera realizar correctamente sus funciones. Sin embargo el calcio, dependiendo del rango de concentración, también puede inducir la muerte de la célula (Wang y cols., 1999). Pudiera ser que la necesidad de la vía PI3K activada fuera por su posible efecto bloqueo de la toxicidad del calcio. Sin embargo, hasta que no se realicen medidas de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular no se podrán tener claros los efectos del valproato.



El hecho de que se haya descrito muy recientemente que el valproato mantiene la fosforilación de las ERK en la inducción de apoptosis (Yuan y cols., 2001) apoya la hipótesis del  $\text{Ca}^{2+}$ . Se sabe que este catión activa esta vía, siendo de hecho esta una de las acciones por las que el medio +KCl induce la supervivencia de los cultivos de neuronas, no sólo para el caso de las CGC (Yano y cols., 1998; Egea y cols., 1998; Soler y cols., 1998).

Este hecho, retoma la hipótesis sobre el efecto de todos los fármacos empleados en los trastornos maníaco-depresivos. Se piensa que actuarían sobre vías de transducción de señales que finalmente cambiarían los patrones de comunicación intercelular que se encontrarían alterados en este tipo de enfermos (Lenox y Hahn, 2000). Así el valproato parece afectar no sólo a una vía de transducción (ERK), sino al principal implicado en la transmisión del estímulo eléctrico en la neurona, el calcio.

### **Nueva hipótesis para el efecto neuroprotector del litio**

Basándonos en las hipótesis existentes para explicar el efecto del litio sobre el tratamiento de los pacientes con trastornos bipolares (Berridge y cols., 1989), ensayamos el efecto del inositol sobre la viabilidad inducida por el litio, viendo que no se afectaba. Tras descartar su relación, así como la del receptor de NMDA, nos centramos en la otra acción del litio que se empleaba para explicar sus efectos, no ya sólo en el desarrollo, sino últimamente también en la neuroprotección: la inhibición acompetitiva de la GSK3 (Klein y Melton, 1996; Stambolic y cols., 1996).

Así comprobamos que el litio protege frente a la apoptosis inducida tanto por el medio -KCl como por la ceramida (Centeno y cols., 1998; Mora y cols., 1999). El hecho de que ambos estímulos apoptóticos induzcan la activación de esta proteína quinasa hace factible que su inhibición por el litio sea la responsable de su efecto neuroprotector. Sin embargo, el hecho de que el litio fuera capaz de proteger frente al medio -KCl cuando existía insulina en el medio fue en cierta medida inesperado (Mora y cols., 1999; Mora y cols., 2001b). La insulina, como hemos visto, activa la vía PI3K/PKB en los cultivos de CGC y, por tanto, inhibe a la GSK3 (Cross y cols., 1995). Estando ésta ya inicialmente inhibida no podemos explicar el efecto del litio por su inhibición. De hecho, lo que nuestros datos han mostrado es que el litio afecta

tanto a la GSK3 como a la PKB. Es más, los efectos observados para el litio muestran que está impidiendo la desfosforilación de ambas proteína quinasas que se producen tras la estimulación apoptótica, bien con el medio -KCl (Mora y cols., 2001a), bien con ceramida. Esto explicaría los efectos neuroprotectores, ya que mantendría activa a la PKB, y por tanto se mantendrían sus efectos antiapoptóticos, tanto fosforilando a Bad (Zha y cols., 1996) como a la GSK3 (Cross y cols., 1995). Esta última se mantiene fosforilada en presencia del litio y, por tanto, se encuentra inactiva por lo que sus efectos proapoptóticos están impedidos.

La hipótesis de que la acción del litio por activación de la PKB queda claramente descartada por el hecho de que no afecta *in vitro* a la actividad de la misma. Además sería inexplicable que se impidiera la desfosforilación de la quinasa simplemente por su interacción con el litio. Así que nos quedaban dos posibilidades para explicar la acción del litio sobre la vía de la PKB. Una sería la activación de la PI3K, como habían sugerido otros autores (Chalecka-Franaszek y Chuang, 1999). Sin embargo, el aumento de la actividad de la PKB por la adición de litio al cultivo era muy pequeño para lo esperado en la activación de una quinasa, sobre todo si lo comparáramos con el efecto de la insulina. Además el efecto de la ceramida sobre la PKB ya había sido explicado por la activación de la actividad de alguna proteína fosfatasa (Zhou y cols., 1998). Así que decidimos comprobar primero la hipótesis de que el litio estuviera inhibiendo la activación de alguna serina/treonina fosfatasa que causara la desfosforilación de la PKB y de la GSK3. Esto último no nos pareció demasiado extraño, ya que el litio se conoce que inhibe a otra serie de fosfatasas como puedan ser la inositol-polifosfatasa o la inositol-monofosfatasa (Hallcher y Sherman, 1980).

Los resultados con la ceramida muestran claramente que la activación de la proteína fosfatasa 2A (PP2A) es bloqueada por la adición de litio al medio de cultivo, confirmando así nuestra hipótesis previa. Todo parece indicar, además, que este fenómeno, o al menos uno similar, está sucediendo en la apoptosis inducida por el medio -KCl. En este caso hemos detectado la activación tanto de la PP2B como de la PP2C. Aunque en este caso la inhibición por el litio no parece tan clara y habrá que profundizar más para corroborar que proteína fosfatasas están implicadas y cual es la diana exacta del litio.

De todas formas el hecho de que ambos estímulos apoptóticos estén actuando sobre la misma vía de transducción afectando a la fosforilación de la PKB nos hace

suponer en un mecanismo más o menos general en la inducción de la apoptosis en este tipo de cultivos. Es más, el litio coincide en ambos casos en su modo de protección por lo que podemos suponer que la diana sobre la que esté actuando podría tener importancia a la hora de impedir el desarrollo del proceso apoptótico, no sólo ya en las CGC, sino que tal vez se pudiera ampliar a otros cultivos de neuronas en incluso en otros tipos celulares y en organismos vivos. A este respecto, se ha visto que pacientes tratados con litio muestran un aumento en la masa encefálica que parece estar relacionado con las propiedades de este fármaco como agente neuroprotector y como inductor de la viabilidad de las células (Moore y cols., 2000). El que se haya estudiado ya desde hace muchos años su farmacodinámica, puede hacer plausible su empleo en enfermedades neurodegenerativas en las que se produce la apoptosis en determinadas células de SNC. Sin embargo, parece más adecuado estudiar detenidamente el efecto del litio para conocer con exactitud su diana molecular antes de pasar a realizar los estudios con animales de experimentación.

Respecto al punto exacto de actuación del litio, todo parece indicar que afectaría a alguna enzima que, en la cascada de señalización activada por el fenómeno apoptótico, se encuentra previa a la proteína fosfatasa causante de la desfosforilación de la PKB. Esta vía todavía la desconocemos pero parece ser que es la misma que en condiciones normales está desactivando a la PKB. Al menos, el hecho de que el litio aumente ligeramente la fosforilación de la PKB en cualquier condición en la que se active su fosforilación, así nos lo está indicando. El hecho de que la PP2A actúa tanto sobre la PKB como sobre alguna de la proteína quinasas de la vía de ERK (Millward y cols., 1999), nos hace pensar que deberíamos estudiar también el efecto del litio sobre la desfosforilación de las ERK que se produce tras el cambio al medio -KCl. Es más, a la hora de pensar en este mecanismo del litio como algo más generalizado, encontramos que en líneas celulares embrionarias, el litio afecta a su proliferación al impedir la desfosforilación de la cdc2 (Smits y cols., 1999). De nuevo encontramos que es la PP2A la fosfatasa responsable de esta desfosforilación (Millward y cols., 1999).

Por tanto, nuestros datos apuntan a un mecanismo general de la acción del litio como agente neuroprotector (Figura 50). Sus efectos serían debidos a la inhibición de la activación de determinadas proteínas fosfatasas. Estas serían las causantes de la desactivación de las cascadas de transducción responsables de la viabilidad. Así el litio, de una manera indirecta, mantendría las vías de supervivencia activas, aunque

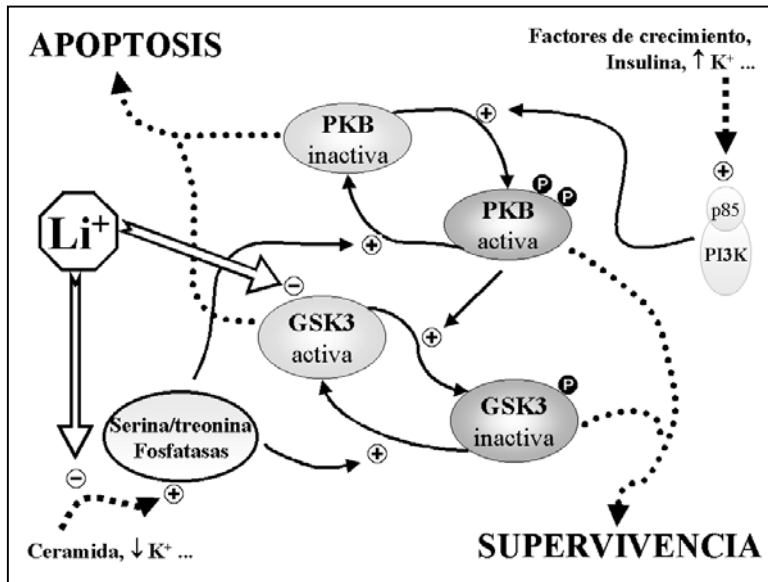


Figura 50. Hipótesis general de la acción neuroprotectora del Li+. ⊕: activación; •: inhibición.

para ello necesitaría que estas se encontrasen activadas. En el caso contrario, su inhibición directa de la GSK3 podría inducir la supervivencia en aquellos casos en los que la máxima responsable de la misma fuese la vía de transducción PI3K/PKB. En esta última condición no protegería totalmente ya que no podría mantener activa a la PKB y, por tanto, sus efectos antiapoptóticos no podrían darse.



## **CONCLUSIONES**



1. La apoptosis en los cultivos de neuronas granulares de cerebelo de rata inducida por un medio con bajas concentraciones de potasio se acompaña con una inactivación de las vías de transducción p38, JNK, PI3K/PKB y ERK y con una activación de la actividad proteína fosfatasa.
2. El Litio protege frente a la apoptosis inducida por el medio con bajas concentraciones de potasio, impidiendo la inactivación de la PKB y la activación de la GSK3.
3. La protección del Litio frente a la ceramida se debe a que impide la desfosforilación de PKB y GSK3 a través de inhibir la activación de la PP2A.
4. El Valproato protege frente a la apoptosis inducida por el medio bajo en potasio siempre y cuando la vía PI3K/PKB se encuentre activa.
5. El mecanismo protector del Valproato parece estar relacionado con las reservas de calcio intracelulares.





## **BIBLIOGRAFÍA**



- Adams, J.M. y Cory, S. (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* **281**: 1322-1326.
- Albert, A., Yanush, L., Gil-Mascarell, M.R., Rodríguez, P.L., Patel, S., Martínez-Ripoll, M., Blundell, T.L. y Serrano, R. (2000) X-ray structure of yeast Hal2p, a major target of lithium and sodium toxicity, and identification of framework interactions determining cation sensitivity. *J. Mol. Biol.* **295**: 927-938.
- Alessi, D.R., Cuenda, A., Cohen, P., Dudley, D.T. y Saltiel, A.R. (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**: 27489-27894.
- Alessi, D.R. y Cohen, P. (1998) Mechanism of activation and function of protein kinase B. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**: 55-62.
- Alessi, D.R. (2001) Discovery of PDK1, one of the missing links in insulin signal transduction. *Biochem. Soc. Trans.* **29**: 1-14.
- Aloyz, R.S., Bamji, S.X., Pozniak, C.D., Toma, J.G., Atwal, J., Kaplan, D.R. y Miller, F.D., (1998) p53 is essential for developmental neuron death as regulated by the TrkA and p75 neurotrophin receptors. *J. Cell. Biol.* **143**: 1691-1703.
- Altman, J. (1972) Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat 3: maturation of the components of the granule layer. *J. Comp. Neurol.* **145**: 465-513.
- Altman, J. (1992) Programmed cell death: the paths to suicide. *Trends Neurosci.* **15**: 278-280.
- Álvarez, G., Muñoz-Montaña, J.R., Satrustegui, J., Ávila, J., Bogonez, E. y Díaz-Nido, J. (1999) Lithium protects cultured neurons against  $\beta$ -amiloid-induced neurodegeneration. *FEBS Let.* **453**: 260-264.
- Anderson, K.E., Coadwell, J., Stephens, L.R. y Hawkins, P.T. (1998) Translocation of PDK-1 to the plasma membrane is important in allowing PDK-1 to activate protein kinase B. *Curr. Biol.* **8**: 684-691.
- Andjelkovic, M., Jakubowicz, T., Cron, P., Ming, X.-F., Han, J.-W. y Hemmings, B.A. (1996) Activation and phosphorylation of a pleckstrin homology domain containing protein kinase (RAC-PK/PKB) promoted by serum and protein phosphatase inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 5699-5704.
- Andjelkovic, M., Alessi, D.R., Meier, R., Fernández, A., Lamb, N.J., Frech, M., Cron, P., Cohen, P., Lucocq, J.M. y Hemmings, B.A. (1997) Role of

- translocation in the activation and function of protein kinase B. *J. Biol. Chem.* **272**: 31515-31524.
- Araki, S., Shimada, Y., Kayi, K. y Hyashi, H. (1990) Apoptosis of vascular endothelial cells by fibroblast growth factor deprivation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **168**: 1194-1200.
- Arcaro, A. y Wymann, M.P. (1993) Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in neutrophil responses. *Biochem. J.* **296**: 297-301.
- Armstrong, R.C., Aja, T.J., Hoang, K.D., Gaur, S., Bai, X., Alnemri, E.S., Litwack, G., Karanewsky, D.S., Fritz, L C. y Tomaselli, K.J. (1997) Activation of the CED3/ICE-related protease CPP32 in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis but not necrosis. *J. Neurosci.* **17**: 553-562.
- Asai, A., Qiu, J.-H., Narita, Y., Chi, Shunji, Saito, N., Shinoura, N., Hamada, H., Kuchino, Y. y Kirino, T. (1999) High level calcineurin activity predisposes neuronal cells to apoptosis. *J. Biol. Chem.* **274**: 34450-34458.
- Asghari, V., Wang, J.F., Reiaich, J.S. y Young, L.T. (1998) Differential effects of mood stabilizers on Fos/Jun proteins and AP-1 DNA binding activity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Mol. Brain Res.* **58**: 95-102.
- Avissar, S., Schreiber, G., Danon, A. y Belmaker, R.H. (1988) Lithium inhibits adrenergic and cholinergic increases in GTP binding in rat cortex. *Nature* **331**: 440-442.
- Balázs, R., Gallo, V., Kingsbury, A., Thangnipon, W., Smith, R., Aternill, C. y Woodhams, P. (1987), en *Glial-Neuronal Communication in Developmental regeneration* (Althaus, H.H. y Seifert, W., eds.) pp. 286-302. Springer-Verlag, Berlín.
- Balázs, R., Jorgensen, O.S. y Hack, N. (1988) N-methyl-D-aspartate promotes the survival of cerebellar granule cells in culture. *Neuroscience* **27**: 437-451.
- Barinaga, M. (1993) Death gives birth to the nervous system but how? *Science* **259**: 762-763.
- Barres, B.A., Hart, I.K., Coles, H.S.R., Burne, J.F., Voyvodic, J.T., Richardson, W.D. y Raff, M.C. (1992) Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell* **70**: 31-46.

- Basu, S., Bayoumy, S., Zhang, Y., Lozano, J. Y Kolesnick, R. (1998) BAD enables ceramide to signal apoptosis via Ras and Raf-1. *J. Biol. Chem.* **273**: 30419-30426.
- Batty, I. y Nahorski, S.R. (1987) Lithium inhibits muscarinic-receptor-stimulated inositol tetrakisphosphate accumulation in rat cerebral cortex. *Biochem. J.* **247**: 797-800.
- Berridge, M.J., Downes, C.P. y Hanley, M.R. (1982) Lithium amplifies agonist-dependent phosphatidylinositol responses in brain and salivary glands. *Biochem J.* **206**: 587-595.
- Berridge, M.J., Downes, C.P. y Hanley, M.R. (1989) Neural and developmental actions of lithium: a unifying hypothesis. *Cell* **53**: 411-419.
- Bijur, G.N., DeSarno, P. y Jope R.S. (2000). Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  facilitates staurosporine- and heat shock-induced apoptosis. Protection by lithium. *J. Biol. Chem.* **275**: 7583-7590.
- Bollen, M. y Stalmans, W. (1992) The structure, role, and regulation of type 1 protein phosphatases. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **27**: 227-281.
- Bootman, M.D. y Berridge, M.J. (1995) The elemental principles of calcium signaling. *Cell* **83**: 675-678.
- Bonni, A., Brunet, A., West, A.E., Datta, S.R., Takasu, M.A. y Greenberg, M.E. (1999) Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* **286**: 1358-1362.
- Bose, R., Verheij, M., Haimovitz-Friedman, A., Scotto, K., Fuks, Z. y Kolesnick, R. (1995) Ceramide synthase mediates daunorubicin-induced apoptosis: an alternative mechanism for generating death signals. *Cell* **82**: 405-414.
- Bowden, C.L., Brugger, A.M., Swann, A.C., Calabrese, J.P., Janicak, P.G., Petty, F., Dilsaver, S.C., Davis, J.M., Rush, A.J., Snau, J.G., Garza Trevino, E.S., Risch, S.C., Goodwick, P.J. y Morris, D.D. (1994) Efficacy of divalproex vs. lithium and placebo in the treatment of mania. *J. Am. Med. Assoc.* **271**: 918-924.
- Bowden, C.L. (1995) en *Textbook of Psychopharmacology* (Schatzberg, A.F. y Nemeroff, C.B., eds.), pp. 603-614. APA Press, Washington DC.
- Budihardjo, I., Olivier, H., Lutter, M., Luo, X. y Wang, X. (1999) Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**: 269-260.

- Bulleit, R.F. y Hsieh, T. (2000) MEK inhibitors block BDNF-dependent and -independent expression of GABA<sub>A</sub> receptor subunit mRNAs in cultured mouse cerebellar granule neurons. *Dev. Brain Res.* **119**: 1-10.
- Burgoyne, R.D. y Cambray-Deakin, M.A. (1998) The cellular neurobiology of neuronal development: the cerebellar granule cell. *Brain Res.* **472**: 77-101.
- Burrow, M.E., Weldon, C.B., Collins-Burrow, B.M., Ramsey, N., McKee, A., Klippel, A., McLachlan, J.A., Clejan, S. y Beckman, B.S. (2000) Cross-talk between Phosphatidylinositol 3-kinase and sphingomyelinase pathways as a mechanism for cell survival/death decisions. *J. Biol. Chem.* **275**: 9628-9635.
- Bradford, M.M. (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.
- Braun, W., Kallen, J., Mikol, V., Walkinshaw, M.D. y Wuthrich, K. (1995) Three-dimensional structure and actions of immunosuppressants and their immunophilins. *FASEB J.* **9**: 63-72.
- Brewster, J.L., de Valoir, T., Dwyer, N.D., Winter, E. y Gustin, M.C. (1993) An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science* **259**: 1760-1763.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J. y Greenberg, M.E. (1999) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96**: 857-868.
- Cade, J.F.J. (1949) Lithium salts in the treatment of psychotic excitement. *Med. J. Aust.* **36**: 349-352.
- Calissano, P., Ciotti, M.T., Battistini, L., Zona, C., Angelini, A., Merlow, D. y 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. USA* **90**: 8752-8756.
- Casaccia-Bonnet, P., Carter, B.D., Dobrowsky, R.T. y Chao, M.V. (1996) Death of oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75. *Nature* **383**: 716-719.
- Centeno, F. y Gutiérrez-Merino, C. (1992) Location of functional centers in the microsomal cytochrome P450 system. *Biochemistry* **31**: 8473-8481.

- Centeno, F., Deschamps, S., Lompre, A.M., Anger, M., Moutin, M.J., Dupont, Y., Palmgren, M.G., Villalba, J.M., Moller, J.V., Falson, P. y LeMaire, M. (1994) Expression of the sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in yeast. *FEBS Lett.* **354**: 117-122.
- Centeno, F., Mora, A., Fuentes, J.M., Soler, G. y Claro, E. (1998) Partial lithium-associated protection against apoptosis induced by C<sub>2</sub>-ceramide in cerebellar granule neurons. *Neuroreport* **9**: 4199-4203.
- Ciani, E., Rizzi, S., Paulsen, R.E. y Contestabile, A. (1997) Chronic pre-explant blockade of the NMDA receptor affects survival of cerebellar granule cells explanted in vitro. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **99**: 112-117.
- Clapham, D.E. (1995) Calcium signalling. *Cell* **80**: 259-268.
- Claro, E., Fain, J.N. y Picatoste, F. (1993) Noradrenaline stimulation unbalances the phosphoinositide cycle in rat cerebral cortical slices. *J. Neurochem.* **60**: 2078-2086.
- Cobb, M.H. y Goldsmith, E.J. (1995) How MAP kinases are regulated. *J. Biol. Chem.* **270**: 14843-14856.
- Cohen, G.M. (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* **326**: 1-16.
- Cohen, J.J. (1991) Programmed cell death in the immune system. *Adv. Immunol.* **50**: 55-85.
- Cohen, P. y Klee, C.B. (1988) *Calmodulin*. Elsevier Science Publishing Co., Inc, Nueva York.
- Cohen, P y Cohen, PTW (1989) Protein phosphatases come of age. *J. Biol. Chem.* **264**: 21435-21438.
- Cohen, P. (1989) The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu. Rev. Biochem.* **58**: 453-508.
- Cohen, P., Holmes, C.F. y Tsukitani, Y. (1990) Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation. *Trends Biochem. Sci.* **15**: 98-102.
- Cohen, P. (1994) The discovery of protein phosphatases: from chaos and confusion to an understanding of their role in cell regulation and human disease. *Bioessays* **16**: 583-588.
- Cohen, P. (1999). The Croonian Lecture 1998. Identification of a protein kinase cascade of major importance in insulin signal transduction. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **354**: 485-495.



- Collins, F. y Lile, J.D. (1989) The role of dihydropyridine-sensitive voltage-gated calcium channels in potassium-mediated neuronal survival. *Brain Res.* **502**: 99-108.
- Collins, F., Schmidt, M.F., Guthrie, P.B. y Kater, S.B. (1991) Sustained increase in intracellular calcium promotes neuronal survival. *J. Neurosci.* **11**: 2582-2587.
- Cross, D.A.E., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovic, M. y Hemmings, B.A. (1995) Inhibition of glycogen-synthase kinase-3 by insulin is mediated by protein-kinase B. *Nature* **378**: 785-789.
- Cross, D.A.E., Culbert, A.A., Chalmers, K.A., Facci, L., Skaper, S.D. y Reith, A.D. (2000) Selective small-molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 activity protect primary neurones from death. *J. Neurochem.* **77**: 94-102.
- Crowder, R.J. y Freeman, R.S. (1999) The survival of sympathetic neurons promoted by potassium depolarization, but not by cyclic AMP, requires phosphatidylinositol 3-kinase and Akt. *J. Neurochem.* **73**: 466-475.
- Cuenda, A., Rouse, J., Doza, Y.N., Meier, R., Cohen, P., Gallagher, T.F., Young, P.R. y Lee, J.C. (1995) SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Lett.* **364**: 229-233.
- Cuenda, A. (2000) *Methods to assay stress-activated protein kinases* en *Methods in Molecular Biology*, vol 99: (Ed. S.M. Keyse). Humana Press Inc. Totowa, Nueva Jersey.
- Cull-Candy, S.G., Howe, J.R. y Ogden, D.C. (1988) Noise and single channels activated by excitatory amino acids in rat cerebellar granule neurones. *J. Physiol.* **400**: 189-222.
- Chalecka-Franaszek, E. y Chuang, D.M. (1999) Lithium activates the serine threonine kinase Akt-1 and suppresses glutamate-induced inhibition of Akt-1 activity in neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 8745-8750.
- Chalfant, C.E., Kishikawa, K., Mumby, M.C., Kamibayashi, C., Bielawska, A. y Hannun, Y.A. (1999) Long chain ceramides activate protein phosphatase-1 and protein phosphatase-2A. Activation is stereospecific and regulated by phosphatidic acid. *J. Biol. Chem.* **274**: 20313-20317.
- Chen, G., Yuan, P.X., Jiang, Y.M., Huang, L.D. y Manji, H.K. (1999a) Valproate robustly enhances AP-1 mediated gene expression. *Mol. Brain Res.* **64**: 52-58.

- Chen, G., Huang, L.D., Jiang, Y.M. y Manji, H.K. (1999b) The mood-stabilizing agent valproate inhibits the activity of glycogen synthase kinase-3. *J. Neurochem.* **72**: 1327-1330.
- Chen, R.W. y Chuang, D.M. (1999) Long term lithium treatment suppresses p53 and Bax expression but increases Bcl-2 expression. A prominent role in neuroprotection against excitotoxicity. *J. Biol. Chem.* **274**: 6039-6044.
- Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y. y Greenberg, M.E. (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* **91**: 231-241.
- Davidson, y Varhol, (1995) Kinetics of thapsigargin-Ca<sup>2+</sup>-ATPase (sarcoplasmic reticulum) interaction reveals a two-step binding mechanism and picomolar inhibition. *J. Biol. Chem.* **270**: 11731-11734.
- Davies, S.P., Reddy, H., Caivano, M. y Cohen, P. (2000) Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem. J.* **351**: 95-105.
- Davis, R.J. (1994) MAPKs: new JNK expands the group. *Trends Biochem. Sci.* **19**: 470-473.
- Dbaibo, G.S., Pushkareva, M.Y., Jayadev, S., Schwarz, J.K., Horowitz, J.M., Obeid, L.M. y Hannun, Y.A. (1995) Retinoblastoma gene product as a downstream target for a ceramide-dependent pathway of growth arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 1347-1351.
- Dbaibo, G.S., Perry, D.K., Gamard, C.J., Platt, R., Poirier, G.G., Obeid, L.M. y Hannun, Y.A. (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.
- Deak, M., Clifton, A.D., Lucocq, L.M. y Alessi, D.R. (1998) Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *EMBO J.* **17**: 4426-4441.
- DelPeso, L., González-García, M., Page, C., Herrera, R. y Núñez, G. (1997) Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* **278**: 687-689.
- DePaoli-Roach, A.A., Park, I.K., Cerovsky, V., Csontos, C., Durbin, S.D., Kuntz, M.J., Sitikov, A., Tang, P.M., Verin, A. y Zolnierowicz, S. (1994)

- Serine/threonine protein phosphatases in the control of cell function. *Adv. Enzyme. Regul.* **34**: 199-224.
- Derijard, B., Hibi, M., Wu, I.H., Barrett, T., Su, B., Deng, T., Karin, M. y Davis, R.J. (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.
- Derijard, B., Raingeaud, J., Barrett, T., Wu, I.H., Han, J., Ulevitch, R.J. y Davis, R.J. (1995) Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science* **267**: 682-685.
- Diehl, J.A., Cheng, M., Roussel, M.F. y Sherr, C.J. (1998) Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* **12**: 3499-3511.
- Dixon, J.F. y Hokin, L.E. (1997) The antibipolar drug valproate mimics lithium in stimulating glutamate release and inositol 1,4,5-trisphosphate accumulation in brain cortex slices but not accumulation of inositol monophosphates and bisphosphates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 4757-4760.
- D'Mello, S.R., Galli, C., Ciotti, T. y 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. USA* **90**: 10989-10993.
- D'Mello, S.R., Anelli, R. y Calissano, P. (1994) Lithium induces apoptosis in immature cerebellar granule cells but promotes survival of mature neurons. *Exp. Cell Res.* **211**: 332-338.
- D'Mello, S.R., Borodezt, K. y 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., Aglieco, F., Roberts, M.R., Borodezt, K. y Heycock, J.W. (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.
- D'Mello, S.R., Kuan, C.-Y., Flavell, R.A. y Rakic, P. (2000) Caspase-3 is required for apoptosis-associated DNA fragmentation but not for cell death in neurons deprived of potassium. *J. Neurosci. Res.* **59**: 24-31.
- Dobrowsky, R.T. y Hannun, Y.A. (1992) Ceramide stimulates a cytosolic protein phosphatase. *J. Biol. Chem.* **267**: 5048-5051.

- Dobrowsky, R.T., Kamibayashi, C., Mumby, M.C. y Hannun, Y.A. (1993) Ceramide activates heterotrimeric protein phosphatase 2A. *J. Biol. Chem.* **268**: 15523-15530.
- Donella Deana, A., Mac Gowan, C.H., Cohen, P., Archiori, F., Meyer, H.E. y Pinna, L.A. (1990) An investigation of the substrate specificity of protein phosphatase 2C using synthetic peptide substrates: comparison with protein phosphatase 2A. *Biochim. Biophys. Acta* **1051**: 199-202.
- Dudek, H., Datta, S.R., Franke, T.F., Birnbaum, M.J., Yao, R., Cooper, G.M, Segal, R. A., Kaplan, D.R. y Greenberg, M.E. (1997) Regulation of neuronal survival by the serine-threonine kinase Akt. *Science* **275**: 661-665.
- Egea, A., Espinet, C. y Comella, J.X. (1998) Calmodulin modulates Mitogen-Activated Protein Kinase activation in response to membrane depolarization in PC12 cells. *J. Neurochem.* **70**: 2554-2564.
- Egea, A., Espinet, C. y Comella, J.X. (1999) Calcium influx activates Extracellular-Regulated Kinase/Mitogen-Activated Kinase pathway through a calmodulin-sensitive mechanism in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* **274**: 75-85.
- Eldadah, B.A., Yakolev, A.G. y Faden, A.I. (1997) The role of ced-3-related cysteine proteases in apoptosis of cerebellar granule cells. *J. Neurosci.* **17**: 6105-6113.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A. y Nagata, S. (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* **391**: 43-50.
- Encinas, M., Iglesias, M., Llecha, N. y Comella, J.X. (1999) Extracellular-regulated kinases and phosphatidylinositol 3-kinase are involved in brain-derived neurotrophic factor-mediated survival and neuritogenesis of the neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *J. Neurochem.* **73**: 1409-1421.
- Fabbri, E., Brighenti, L. y Ottolenghi, C. (1991) Inhibition of adenylate cyclase of catfish and rat hepatocyte membranes by 9-(tetrahydro-2-furyl)adenine (SQ 22536). *J. Enzyme Inhib.* **5**: 87-98.
- Fernandes-Alnemri, T., Takahashi, A., Armstrong, R., Krebs, J., Fritz, L., Tomaselli, K.J., Wang, L., Yu, Z., Croce, C.M. y Salveson, G. (1995) Mch3, a novel human apoptotic cysteine protease highly related to CPP32. *Cancer Res.* **55**: 6045-6052.

- Fischer, E.H. y Krebs, E.G. (1966) Relationship of structure to function of muscle phosphorylase. *Fed. Proc.* **25**: 1511-1520.
- Fisher, R., Julsgart, J. y Berchtold, M.W. (1998) High affinity calmodulin target sequence in the signalling molecule PI 3-kinase. *FEBS Lett.* **425**: 175-177.
- Franklin, J.L. y Johnson, E.M. (1992) Suppression of programmed neuronal death by sustained elevation of cytoplasmic calcium. *Trends Neurosci.* **15**: 501-508.
- Franklin, J.L., Sanz-Rodríguez, C., Juhasz, A., Deckwerth, T.L. y Johnson, E.M. (1995) Chronic depolarization prevents programmed death of sympathetic neurons in vitro but does not support growth: requirement for Ca<sup>2+</sup> influx but not Trk activation. *J. Neurosci.* **15**: 643-664.
- Freshney, N.W., Rawlinson, L., Guesdon, F., Jones, E., Cowley, S., Hsuan, J. y Saklatvala, J. (1994) Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell* **78**: 1039-1049.
- Frodin, M. y Gammeltoft, S. (1999) Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction. *Mol. Cell. Endocrinol.* **151**: 65-77.
- Fruman, D.A., Klee, C.B., Bierer, B.E. y Burakoff, S.J. (1992) Calcineurin phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK 506 and cyclosporin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 3686-3690.
- Fuchs, S.Y., Adler, V., Pincus, M.R. y Ronai, Z. (1998) MEKK1/JNK signalling stabilizes and activates p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 10541-10546.
- Fukunaga, K., Kobayashi, T., Tamura, S. y Miyamoto, E. (1993) Dephosphorylation of autophosphorylated Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II by protein phosphatase 2C. *J. Biol. Chem.* **268**:133-137.
- Galcheva-Gargova, Z., Derijard, B., Wu, I.-H. y Davis, R.J. (1994) An osmosensing signal transduction pathway in mammalian cells. *Science* **265**: 806-808.
- Galli, C., Meucci, O., Scorziello, A., Werge, T.M., Calissano, P. y Schettini, G. (1995) Apoptosis in cerebellar granule cells is blocked by high KCl, forskolin, and IGF-1 through distinct mechanisms of action: the involvement of intracellular calcium and RNA synthesis. *J. Neurosci.* **15**: 1172-1179.
- Gallo, V., Kingsbury, A., Balázs, R. y Jorgensen, O.S. (1987) The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J. Neurosci.* **7**: 2203-2213.

- Gao, X.M., Margolis, R.L., Leeds, P., Hough, C., Post, R.M. y Chuang, D.-M. (1995) Carbamazepine induction of apoptosis in cultured cerebellar neurons: effects of N-methyl-D-aspartate, aurointricarboxylic acid and cycloheximide. *Brain. Res.* **703**: 63-71.
- Garrington, T.P. y Johnson, G.L. (1999) Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**: 211-218.
- Garthwaite, J., Garthwaite, G. y Hajos, F. (1986) Aminoacid neurotoxicity: relationship to neuronal depolarization in rat cerebellar slices. *Neuroscience* **18**: 449-460.
- Giasson, B.I. y Mushynski, W.E. (1997) Study of proline-directed protein kinases involved in phosphorylation of the heavy neurofilament subunit. *J. Neurosci.* **17**: 9466-9472.
- Gleichmann, M., Weller, M. y Schulz, J.B. (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.
- Glucksman, A. (1951) Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biol. Rev.* **26**: 59-86.
- Godfrey, P.P. (1989) Potentiation by lithium of CMP-phosphatidate formation in carbachol-stimulated rat cerebral-cortical slices and its reversal by myo-inositol. *Biochem. J.* **258**: 621-624.
- González, G.A. y Montminy, M.R. (1989) Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell* **59**: 675-680.
- Gray, D.W., Challiss, R.A.J. y Nahorski, S.R. (1994) Differential effects of lithium on muscarinic cholinceptor-stimulated CMP-phosphatidate accumulation in cerebellar granule cells, CHO-M3 cells, and SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J. Neurochem.* **63**: 1354-1360.
- Green, D.R. y Reed, J.C. (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**: 1309-1312.
- Grignon, S., Levy, N., Courand, F. y Brugnerolle, B. (1996) Tyrosine kinase inhibitors and cicloheximide inhibits Li<sup>+</sup> protection of cerebellar granule neurons switched to non-depolarizing medium. *Eur. J. Pharmacol.* **315**: 111-114.

- Gupta, S., Barret, T., Whitmarsh, A.J., Cavanagh, J., Sluss, H.K., Derijard, B. y Davis, R. (1996) Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO J.* **15**: 2760-2770.
- Haimovitz-Friedman, A., Kolesnick, R.N. y Fucks, Z. (1997) Ceramide signaling in apoptosis. *Br. Med. Bull.* **53**: 539-553.
- Hallcher, L.M. y Sherman, W.R. (1980) The effects of lithium ion and other agents on the activity of myo-inositol-1-phosphatase from bovine brain. *J. Biol. Chem.* **255**: 10896-10901.
- Han, J., Lee, J.-D., Bibbs, L. y Ulevitch, R.J. (1994) A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* **265**: 808-811.
- Hanger, D.P., Hughes, K., Woodgett, J.R., Brion, J.P. y Anderton, B.H. (1992). Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: generation of paired helical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase. *Neurosci. Lett.* **147**: 58-62.
- Hannun, Y.A. y Obeid, L.M. (1995) Ceramide: an intracellular signal for apoptosis. *Trends Biochem. Sci.* **20**: 73-77.
- Hannun, Y.A. (1996) Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science* **274**: 1855-1859.
- Harada, J. y Sugimoto, M. (1999a) Activation of caspase 3 in  $\beta$ -amyloid-induced apoptosis in rat cerebellar granule neurons. *Brain Res.* **842**: 311-323.
- Harada, J. y Sugimoto, M. (1999b) An inhibitor of p38 and JNK MAP kinases prevents activation of caspase and apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *Jpn. J. Pharmacol.* **79**: 369-378.
- Hartfield, P.J., Mayne, G.C. y Murray, A.W. (1997) Ceramide induces apoptosis in PC12 cells. *FEBS Lett.* **401**: 148-152.
- Hartigan, J.A. y Johnson, G.V. (1999) Transient increases in intracellular calcium result in prolonged site-selective increases in Tau phosphorylation through a glycogen synthase kinase 3 $\beta$ -dependent pathway. *J. Biol. Chem.* **274**: 21395-21401.
- Herrera, B., Fernández, M., Álvarez, A.M., Roncero, C., Benito, M., Gil, J., Fabregat, I. (2001) Activation of caspases occurs downstream from radical oxygen species production, Bcl-xL down-regulation, and early cytochrome c

- release in apoptosis induced by transforming growth factor beta in rat fetal hepatocytes. *Hepatology* **34**: 548-556.
- Hill, D.J. y Milner, R.D. (1985) Insulin as a growth factor. *Pediatr. Res.* **19**: 879-886.
- Hockberger, P.E., Tseng, H.Y. y Connor, J.A. (1987) Immunocytochemical and electrophysiological differentiation of rat cerebellar granule cells in explant cultures. *J. Neurosci.* **7**: 1370-1383.
- Hong, M., Chen, D.C., Klein, P.S. y Lee, V.M. (1997) Lithium reduces tau phosphorylation by inhibition of glycogen synthase kinase-3. *J. Biol. Chem.* **272**: 25326-25332.
- Honkanen, R.E., Zwiller, J., Moore, R.E., Daily, S.L., Khatra, B.S., Dukelow, M. y Boynton, A.L. (1990) Characterization of microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases. *J. Biol. Chem.* **265**: 19401-19404.
- Inouye, M., Yamamura, H. y Nakano, A. (1995) Lithium delays the radiation-induced apoptotic process in external granule cells of mouse cerebellum. *J. Radiat. Res.* **36**: 203-208.
- Ip, Y.T. y Davis, R.J. (1998) Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)—from inflammation to development. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**: 205-219.
- Ito, M. (1984a) Granule cells, en *The Cerebellum and Neuronal Control* (Ito, M., ed.) pp. 74-85. Raven, Nueva York.
- Ito, M. (1984b) Mossy fiber system, reticular and pontine nuclei, en *The Cerebellum and Neuronal Control* (Ito, M., ed.) pp. 235-255. Raven, New York.
- Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y. y Nagata, S. (1991) The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* **66**: 233-243.
- Johnson, E.M. y Deckworth, T.L. (1993) Molecular mechanisms of developmental neuronal death. *Annu. Rev. Neurosci.* **16**: 31-46.
- Jones, M. y Murray, A. (1995) Evidence that ceramide selectively inhibits protein kinase C- $\alpha$  translocation and modulates bradykinin activation of phospholipase D. *J. Biol. Chem.* **270**: 5007-5013.
- Jope, R.S. y Williams, M.B. (1994) Lithium and brain signal transduction systems. *Biochem. Pharmacol.* **47**: 429-441.



- Jope, R.S. (1999) Anti-bipolar therapy: mechanism of action of lithium. *Mol. Psychiatry* **4**: 117-128.
- Joyal, J.L., Burks, D.J., Pons, S., Matter, W.F., Vlahos, C.J., White, M.F. y Sacks, D.B. (1997) Calmodulin activates Phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.* **272**: 28183-28186.
- Kaplan, D.R. y Miller, F.D. (1997) Signal transduction by the neurotrophin receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**: 213-221.
- Kauffmann-Zeh, A., Rodríguez-Viciano, P., Ulrich, E., Gilbert, C., Coffey, P., Downward, J. y Evan, G. (1997) Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB. *Nature* **385**: 544-548.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Curie, A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**: 239-257.
- Kidd, V.J. (1998) Proteolytic activities that mediate apoptosis. *Annu. Rev. Physiol.* **60**: 533-573.
- Kim, B., Leventhal, P.S., Saltiel, A.R. y Feldman, E.L. (1997) Insulin-like growth factor-I-mediated neurite outgrowth in vitro requires Mitogen-activated protein kinase activation. *J. Biol. Chem.* **272**: 21268-21273.
- Kishikawa, K., Chalfant, C.E., Perry, D.K., Bielawska, A. y Hannun, Y.A. (1999) Phosphatidic acid is a potent and selective inhibitor of protein phosphatase 1 and an inhibitor of ceramide-mediated responses. *J. Biol. Chem.* **274**: 21335-21341.
- Klein, P.S. y Melton, D.A. (1996) A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 8455-8459.
- Korsmeyer, S.J., Wei, M.C., Saito, M., Weiler, S., Oh, K.J. y Schlesinger, P.H. (2000) Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell. Death Differ.* **7**: 1166-1173.
- Koury, M.J. y Bondurant, M.C. (1990) Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed death in erythroid progenitor cells. *Science* **248**: 378-381.
- Kovacs, D.M. y Tanzi, R.E. (1998) Monogenic determinants of familial Alzheimer's disease: presenilin-1 mutations. *Cell. Mol. Life Sci.* **54**: 902-909.
- Kowluru, A. y Metz, S.A. (1997) Ceramide-activated protein phosphatase-2A activity in insulin-secreting cells. *FEBS Lett.* **418**: 179-182.

- Krypanioui, N e Isaacs, J.T. (1988) Activation of programmed cell death in the rat ventral prostate after castration. *Endocrinology* **122**: 552-562.
- Kuan, C.Y., Roth, K.A., Flavell, R.A. y Rakic, P. (2000) *Trends Neurosci.* **23**: 291-297.
- Kyriakis, J.M., Banerjee, P., Nikolakaki, E., Dai, T., Rubie, E.A., Ahmad, M.F., Avruch, J. y Woodgett, J.R. (1994) The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* **369**: 156-160.
- Kyriakis, J.M. y Avruch, J. (1996) Sounding the alarm: protein kinase cascades activated by stress and inflammation. *J. Biol. Chem.* **271**: 24313-24316.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Larnet, Y., Dolphin, A.C. y Davies, A.M. (1992) Intracellular calcium regulates the survival of early sensory neurons before they become dependent on neurotrophic factors. *Neuron* **9**: 563-574.
- Lasher, R.S. y Zaigon, I.S. (1972) The effect of potassium on neuronal differentiation in cultures of dissociated newborn rat cerebellum. *Brain Res.* **41**: 482-488.
- Law, B. y Rossie, S. (1995) The dimeric and catalytic subunit forms of protein phosphatase 2A from rat brain are stimulated by C2-ceramide. *J. Biol. Chem.* **270**: 12808-12813.
- Lazar, D.F., Wiese, R.J., Brady, M.J., Mastick, C.C., Waters, S.B., Yamauchi, K., Pessin, J.E., Cuatrecasas, P. y Saltiel, A.R. (1995) Mitogen-activated protein kinase kinase inhibition does not block the stimulation of glucose utilization by insulin. *J. Biol. Chem.* **270**: 20801-20807.
- Lazebnik, Y.A., Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Poirier, G.G. y Earnshaw, W.C. (1994) Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* **371**: 346-347.
- Lee, D., Long, S.A, Adams, J.L., Chan, G., Vaidya, K.S., Francis, T.A., Kikly, K., Winkler, J.D., Sung, C-M., Debouck, C., Richardson, S., Levy, M.A., DeWolf, W.E. Jr., Keller, P.M., Tomaszek, T., Head, M.S., Ryan, M.D., Haltiwanger, R.C., Liang, P-H., Janson, C.A., McDevitt, P.J., Johanson, K., Concha, N.O., Chan, W., Abdel-Megnid, S.S., Badger, A.M., Lark, M.W., Nadean, D.P., Suva, L.J., Gowen, M. y Nuttall, M.E. (2000) Potent and selective nonpeptide

- inhibitors of caspase 3 and 7 inhibits apoptosis and maintain cell functionality. *J. Biol. Chem.* **275**: 16007-16014.
- Lee, J.C., Laydon, J.T., McDonnell, P.C., Gallagher, T.F., Kumar, S., Green, D., McNulty, D., Blumenthal, M.J., Heys, J.R., Landvatter, S.W., Strickler, J.E., McLaughlin, M.M., Siemens, I.R., Fisher, S.M., Livi, G.P., White, J.R., Adams, J.L. y Young, P.R. (1994) A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* **372**: 739-746.
- Lee, J.Y., Hannun, Y.A. y Obeid, L.M. (1996) Ceramide inactivates cellular protein kinase C  $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* **271**: 13169-13174.
- Lenox, R.H. y Hahn, C.-G. (2000) Overview of the mechanism of lithium in the brain: fifty-year update. *J. Clin. Psychiatry* **61**: 5-15.
- Leroy, K., Menu, R., Conreur, J.L., Dayanandan, R., Lovestone, S., Anderton, B.H. y Brion, J.P. (2000) The function of the microtubule-associated protein tau is variably modulated by graded changes in glycogen synthase kinase-3 $\beta$  activity. *FEBS Lett.* **465**: 34-38.
- Levi, G., Aloisi, F., Ciotti, M.T. y Gallo, V. (1984) Autoradiographic localization and depolarization-induced release of acidic amino acids in differentiating cerebellar granule cell cultures. *Brain Res.* **290**: 77-86.
- Li, M., Wang, X., Meintzer, M.K., Laessig, T., Birnbaum, M.J. y Heidenreich K.A. (2000) Cyclic AMP promotes neuronal survival by phosphorylation of glycogen synthase kinase 3 $\beta$ . *Mol. Cell. Biol.* **20**: 9356-9363.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S. y Wang, X. (1997) Cytochrome *c* and ATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**: 479-489.
- Li, P.P., Sibony, D., Green, M.A. y Warsh, J.J. (1993) Lithium modulation of phosphoinositide signaling system in rat cortex: selective effect on phorbol ester binding. *J. Neurochem.* **61**: 1722-1730.
- Lippke, J.A., Gu, Y., Sarnecki, C., Caron, P.R. y Su, M.S. (1996) Identification and characterization of CPP32/Mch2 homolog 1, a novel cysteine protease similar to CPP32. *J. Biol. Chem.* **271**: 1825-1828.
- Liu, J., Farmer, J.D.Jr., Lane, W.S., Friedman, J., Weissman, I. y Schreiber, S.L. (1991) Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* **66**: 807-815.

- Liu, X., Zou, H., Slaughter, C. y Wang, X. (1997) DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* **89**: 175-174.
- Lozano, J., Berra, E., Municio, M.M., Díaz-Meco, M.T., Domínguez, I., Sanz, L. Y Moscat, J. (1996) Protein kinase C zeta isoform is critical for kappa B-dependent promoter activation by sphingomyelinase. *J. Biol. Chem.* **269**: 19200-19202.
- MacFarlane, M., Cain, K., Sun, X.M., Alnemri, E.S. y Cohen, G.M. (1997) Processing/activation of at least four interleukin-1beta converting enzyme-like proteases occurs during the execution phase of apoptosis in human monocytic tumor cells. *J. Cell Biol.* **137**: 469-479.
- Mandal, M., Adam, L. y Kumar, R. (1999) Redistribution of activated caspase-3 to the nucleus during butyric acid-induced apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **260**: 775-780.
- Manji, H.K., Etcheberrigaray, R., Guan, C y Olds, J.L. (1993) Lithium decreases membrane-associated protein kinase C in hippocampus: selectivity for the alpha isozyme. *J. Neurochem.* **61**: 2303-2310.
- Manji, H.K., Potter, W.Z. y Lenox, R.H. (1995) Signal transduction pathways. Molecular targets for lithium's actions. *Arch. Gen. Psychiatry* **52**: 531-543.
- Manthorpe, M., Fagnani, R., Skaper, S.D. y Varon, S. (1986) An automated colorimetric microassay for neuronotrophic factors. *Brain Res.* **390**: 191-198.
- Marks, N. y Berg, M.J. (1999) Recent advances on neuronal caspases in development and neurodegeneration. *Neurochem. Int.* **35**: 195-220.
- Marte, B.M. y Downward, J. (1997) PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond. *Trends Biochem. Sci.* **22**: 355-358.
- Martin, D.P., Schmidt, R.E., DiStefano, P.S., Lowry, O.H., Carter, J.G. y Johnson, E.J. Jr. (1988) Inhibitors of protein synthesis and RNA synthesis prevent neuronal death caused by nerve growth factor deprivation. *J. Cell Biol.* **106**: 829-844.
- Masana, M.I., Bitran, J.A., Hsiao, J.K. y Potter, W.Z. (1992) In vivo evidence that lithium inactivates Gi modulation of adenylate cyclase in brain. *J. Neurochem.* **59**: 200-205
- Mashima, T., Naito, M., Kataoka, S., Kawai, H. y Tsuruo, T. (1995) Aspartate-based inhibition of interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme prevents antitumor agent-

- induced apoptosis in human myeloid leukemia U937 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **209**: 907-915.
- Mathews, C.K. y van Holde, K.E. (1998) *Bioquímica* (2ª edición). McGraw-Hill/Interamericana. Madrid.
- Matsuda, S., Kawasaki, H., Moriguchi, T., Gotoh, Y. y Nishida, E. (1995) Activation of protein kinase cascades by osmotic shock. *J. Biol. Chem.* **270**: 12781-12786.
- Matsudaira, P. (1987) Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J. Biol. Chem.* **262**: 10035-10038.
- Maudrell, K., Antonsson, B., Magnenat, E., Camps, M., Muda, M., Chabert, C., Gillieron, C., Boschert, U., Vial-Knecht, E., Martinou, J.C. y Arkininstall, S. (1997) Bcl-2 undergoes phosphorylation by c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinases in presence of the constitutively active GTP-binding protein Rac1. *J. Biol. Chem.* **272**: 25238-25242.
- McCormick, S.D. (1996) Effects of growth hormone and insulin-like growth factor I on salinity tolerance and gill Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in Atlantic salmon (*Salmo salar*): interaction with cortisol. *Gen. Comp. Endocrinol.* **101**: 3-11.
- McLaughlin, M.M., Kumar, S., McDonnell, P.C., van Horn, S., Lee, J.C., Livi, G.P. y Young, P.R. (1996) Identification of mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase-3, a novel substrate of CSBP p38 MAP kinase. *J. Biol. Chem.* **271**: 8488-8492.
- Meldolesi, J. y Pozzan, T. (1998) The endoplasmic reticulum store: a view from the lumen. *Trends Biochem. Sci.* **23**: 10-14.
- Merrill, A.H., Jr. Schmelz, E.M., Dillehay, D.L., Spiegel, S., Shayman, J.A., Schroeder, J.J., Riley, R.T., Voss, K.A. y Wang, E. (1997) Sphingolipids—the enigmatic lipid class: biochemistry, physiology, and pathophysiology. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **142**: 208-225.
- Mielke, K. y Herdegen, T. (2000) JNK and p38 stresskinases—degenerative effectors of signal-transduction-cascades in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* **61**: 45-60.
- Miller, T.M., Tansey, M.G., Johnson, E.M. y Creedon, D.J. (1997) Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity blocks depolarization- and insulin-like growth factor I-mediated survival of cerebellar granule cells. *J. Biol. Chem.* **272**: 9847-9853.

- Millward, T.A., Zolnierowicz, S. y Hemmings, B.A. (1999) Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A. *Trends Biochem. Sci.* **24**: 186-191.
- Miyashita, T., Krajewski, M., Wang, H.G., Lin, H.K., Liebermann, D.A., Hoffman, B. y Reed, J.C. (1994) Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* **9**: 1799-1805.
- Molkentin, J.D., Lu, J.R., Antos, C.L., Markham, B., Richardson, J., Robbins, J., Grant, S.R. y Olson, E.N. (1998) A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* **93**: 215-228.
- Moore, G.J., Bebchuk, J.M., Wilds, I.B., Chen, G. y Manji, H.K. (2000) Lithium-induced increase in human brain grey matter. *Lancet* **356**: 1241-1242.
- Mora, A., González-Polo, R.A., Fuentes, J.M., Soler, G. y Centeno, F. (1999) Different mechanism of protection against apoptosis by valproate and Li<sup>+</sup>. *Eur. J. Biochem.* **266**: 886-891.
- Mora, A., Sabio, G., González-Polo, R.A., Cuenda, A., Alessi, D.R., Alonso, J.C., Fuentes, J.M., Soler, G. y Centeno, F. (2001a) Lithium inhibits caspase 3 activation and dephosphorylation of PKB and GSK3 induced by K<sup>+</sup> deprivation in cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* **78**: 199-206.
- Mora, A., Sabio, G., Alonso, J.C., Soler, G. y Centeno, F. (2001b) Different dependence of lithium and valproate on PI3K/PKB pathway. *Bipolar Disord.* (en prensa).
- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**: 55-63.
- Mumby, M.C. y Walter, G. (1993a) Protein serine/threonine phosphatases: structure, regulation, and functions in cell growth. *Physiol. Rev.* **73**: 673-699.
- Mumby, M.C. y Walter, G. (1993b) Protein serine/threonine phosphatases and cell transformation. *Biochim. Biophys. Acta.* **1155**: 207-226.
- Muñoz-Montañó, J.R., Moreno, F.J., Ávila, J. y Díaz-Nido, J. (1997) Lithium inhibits Alzheimer's disease-like tau protein phosphorylation in neurons. *FEBS Lett.* **411**: 183-188.
- Namura, S., Zhu, J., Fink, K., Endres, M., Srinivasan, A., Tomaselli, K.J., Yuan, J. y Moskowitz, M.A. (1998) Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia. *J. Neurosci.* **18**: 3659-3668.

- Nardi, N., Avidan, G., Daily, D., Zilkha-Falb, R. y Barzilai, A. (1997) Biochemical and temporal analysis of events associated with apoptosis induced by lowering the extracellular potassium concentration in mouse cerebellar granule neurons. *J. Neurochem.* **68**: 750-759.
- Nevins, J.R. (1992) E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science* **258**: 424-429.
- New, L., Jiang, Y., Zhao, M., Liu, K., Zhu, W., Flood, L.J., Kato, Y., Parry, G.C. y Han, J. (1998) PRAK, a novel protein kinase regulated by the p38 MAP kinase. *EMBO J.* **17**: 3372-3384.
- Nicholson, D.W., Ali, A., Thornberry, N.A., Vaillancourt, J.P., Ding, C.K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P.R., Labelle, M. y Lazebnik, Y.A. (1995) Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* **376**: 37-43.
- Nishida, E. y Gotoh, Y. (1993) The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways. *Trends Biochem. Sci.* **18**: 128-131.
- Nonaka, S., Hough, C.J. y Chuang, D.-M. (1998a) Chronic lithium treatment robustly protects neurons in the central nervous system against excitotoxicity by inhibiting N-methyl-D-aspartate receptor mediated calcium influx. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 2642-2647.
- Nonaka, S. y Chuang, D.-M. (1998b) Neuroprotective effects of chronic lithium of focal cerebral ischemia in rats. *Neuroreport* **9**: 2081-2084.
- Nonaka, S., Katsube, N. y Chuang, D.-M. (1998c) Lithium protects rat cerebellar granule cells against apoptosis induced by anticonvulsants, phenytoin and carbamazepine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **286**: 539-547.
- Núñez, G., Benedict, M.A., Hu, Y. e Inohara, N. (1998) Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* **17**: 3237-3245.
- Nusse, R. (1997) A versatile transcriptional effector of Wnt signaling. *Cell* **89**: 321-323.
- Obeid, L.M., Linardic, C.M., Karolak, L.A. y Hannun, Y.A. (1993) Programmed cell death induced by ceramide. *Science* **259**: 1769-1771.
- Oberdoerster, J. y Rabin, R.A. (1999) Enhanced caspase activity during ethanol-induced apoptosis in rat cerebellar granule cells. *Eur. J. Pharmacol.* **385**: 273-282.

- O'Hare, M.J., Sheng, T.H., Morris, E.J., Cregan, S.P., Xu, Q., Slack, R.S. y Park, D.S. (2000) Induction and modulation of cerebellar granule neuron death by E2F-1. *J. Biol. Chem.* **275**: 25358-25364.
- Oliver, F.J., de la Rubia, G., Rolli, V., Ruiz-Ruiz, M.C., de Murcia, G. y Murcia, J.M. (1998) Importance of poly(ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis. Lesson from an uncleavable mutant. *J. Biol. Chem.* **273**: 33533-33539.
- Oppenheim, R.W. (1991) Cell death during development of the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* **14**: 453-501.
- Östman, A. y Böhmer, F.-D. (2001) Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatases. *Trends Cell Biol.* **11**: 258-266.
- Ozaki, N. y Chuang, D.M. (1997) Lithium increases transcription factor binding to AP-1 and cyclic AMP-responsive element in cultured neurons and rat brain. *J. Neurochem.* **69**: 2336-2344.
- Padmanabhan, J., Park, D.S., Greene, L.A. y Shelanski, M.L. (1999) Role of cell cycle regulatory proteins in cerebellar granule neuron apoptosis. *J. Neurosci.* **19**: 8747-8756.
- Pap, M. y Cooper G.M. (1998) Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway. *J. Biol. Chem.* **273**: 19929-19932.
- Park, J., Kim, I., Oh, Y.J., Lee, K., Han, P.L. y Choi, E.J. (1997) Activation of c-Jun N-terminal kinase antagonizes an antiapoptotic action of Bcl-2. *J. Biol. Chem.* **272**: 16725-16728.
- Párrizas, M., Saltiel, A.R., y LeRoith, D. (1997) Insulin-like growth factor 1 inhibits apoptosis using the phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways. *J. Biol. Chem.* **272**: 154-161.
- Pawlowski, J. y Kraft, A.S. (2000) Bax-induced apoptotic cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 529-531.
- Payne, D.M., Rossomando, A.J., Martino, P., Erickson, A.K., Her, J.H., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Weber, M.J. y Sturgill, T.W. (1991) Identification of the regulatory phosphorylation sites in p42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *EMBO J.* **10**: 885-892.



- Pilar, G. y Landmesser, L.J. (1976) Ultrastructural differences during embryonic cell death in normal and peripherally deprived ciliary ganglia. *J. Cell Biol.* **68**: 339-356.
- Raff, M.C. (1992) Social controls on cell survival and cell death. *Nature* **356**: 397-400.
- Raff, M.C., Barres, B.A., Burne, J.F., Coles, H.S., Ishizaki, Y. y Jacobson, M.D. (1993) Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science* **262**: 695-700.
- Raingeaud, J., Gupta, S., Rogers, J.S., Dickens, M., Han, J., Ulevitch, R.J. y Davis, R.J. (1995) Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J. Biol. Chem.* **270**: 7420-7426.
- Rao, K.M. (2001) MAP kinase activation in macrophages. *J. Leukoc. Biol.* **69**: 3-10.
- Reed, J.C. y Paternostro, G. (1999) Postmitochondrial regulation of apoptosis during heart failure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 7614-7616.
- Reynolds, C.H., Utton, M.A., Gibb, G.M., Yates, A. y Anderton, B.H. (1997) Stress-activated protein kinase/*c-jun* N-terminal kinase phosphorylates tau protein. *J. Neurochem.* **68**: 1736-1744.
- Rommel, C., Clarke, B.A., Zimmermann, S., Nunez, L., Rossman, R., Reid, K., Moelling, K., Yancopoulos, G.D. y Glass, D.J. (1999) Differentiation stage-specific inhibition of the Raf-MEK-ERK pathway by Akt. *Science* **286**: 1738-1741.
- Rossé, T., Olivier, R., Monney, L., Rager, M., Conus, S., Fellay, I., Jansen, B. y Borner, C. (1998) Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature* **391**: 496-499.
- Rouse, J., Cohen, P., Trigon, S., Morange, M., Alonso-Llamazares, A., Zamanillo, D., Hunt, T. y Nebreda, A.R. (1994) A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* **78**: 1027-1037.
- Ruvolo, P.P., Deng, X., Ito, I., Carr, B.K. y May, W.S. (1999) Ceramide induces Bcl2 dephosphorylation via a mechanism involving mitochondrial PP2A. *J. Biol. Chem.* **274**: 20296-20300.

- Ruvolo, P.P., Deng, X. y May, W.S. (2001) Phosphorylation of Bcl2 and regulation of apoptosis. *Leukemia* **15**: 515-522.
- Sabbatini, P. y McCormick, F. (1999) Phosphoinositide 3-OH kinase (PI3K) and PKB/Akt delay the onset of p53-mediated transcriptionally dependent apoptosis. *J. Biol. Chem.* **274**: 24263-24269.
- Salinas, M., López-Valdaliso, R., Martín, D., Alvarez, A. y Cuadrado, A. (2000) Inhibition of PKB/Akt1 by C2-ceramide involves activation of ceramide-activated protein phosphatase in PC12 cells. *Mol. Cell. Neurosci.* **15**: 156-169.
- Sastry, P.S. y Rao, K.S. (2000) Apoptosis and the nervous system. *J. Neurochem.* **74**: 1-20.
- Satoh, M.S. y Lindahl, T. (1992) Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair. *Nature* **356**: 356-358.
- Saunders, J.W. Jr. (1966) Death in embryonic systems. *Science* **154**: 604-612.
- Sawai, H., Okazaki, T., Takeda, Y., Tashima, M., Sawada, H., Okuma, M., Kishi, S., Umehara, H. y Domae, N. (1997) Ceramide-induced translocation of protein kinase C-delta and -epsilon to the cytosol. Implications in apoptosis *J. Biol. Chem.* **272**: 2452-2458.
- Scheid, M.P. y Duronio, V. (1998) Dissociation of cytokine-induced phosphorylation of Bad and activation of PKB/Akt: involvement of MEK upstream of Bad phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 7439-7444.
- Schreiber, M., Kobus, A., Piu, F., Szabowski, A., Mohle-Steinlein, U., Tian, J., Karin, M., Angel, P. y Wagner, E.F. (1999) Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent. *Genes Dev.* **13**: 607-619.
- Schreiber, S.L. y Crabtree, G.R. (1992) The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol. Today* **13**: 136-142.
- Schou, M. (1991) Clinical aspects of lithium in Psychiatry, en *Lithium and the Cell* (Birch, N.J., ed.) pp. 1-6. Academic Press, London.
- Schubert, K.M., Scheid, M.P. y Duronio, V. (2000) Ceramide inhibits protein kinase B/Akt by promoting dephosphorylation of serine 473. *J. Biol. Chem.* **275**: 13330-13335.
- Schulz, J.B., Weller, M. y Klockgether, T. (1996) Potassium deprivation-induced apoptosis of cerebellar granule neurons: a sequential requirement for new

- mRNA and protein synthesis, ICE-like protease activity, and reactive oxygen species. *J. Neurosci.* **16**: 4696-4706.
- Segal, R.A. y Greenberg, M.E. (1996) Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Annu. Rev. Neurosci.* **19**: 463-489.
- Sendter, M., Holtmann, B., Kolbeck, R., Thoenen, H. y Barde, Y.A. (1992) Brain-derived neurotrophic factor prevents the death of motoneurons in newborn rats after nerve section. *Nature* **360**: 757-758.
- Shaw, M., Cohen, P. y Alessi, D.R. (1997) Further evidence that the inhibition of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  by IGF-1 is mediated by PDK1/PKB-induced phosphorylation of Ser-9 and not by dephosphorylation of Tyr-216. *FEBS Lett.* **416**: 307-311.
- Sheng, M., Thompson, M.A. y Greenberg, M.E. (1991) CREB: a Ca(2+)-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. *Science* **252**: 1427-1430.
- Shenolikar, S y Nairn AC (1991) Protein phosphatases: recent progress. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* **23**: 1-121.
- Shi, Y.F., Sahai, B.M. y Green, D.R. (1989) Cyclosporin A inhibits activation-induced cell death in T-cell hybridomas and thymocytes. *Nature* **339**: 625-626.
- Shibasaki, F. y McKeon, F. (1995) Calcineurin functions in Ca(2+)-activated cell death in mammalian cells. *J. Cell. Biol.* **131**: 735-743.
- Shimoke, K., Kubo, T., Numakawa, T., Abiru, Y., Enokido, Y., Takei, N., Ikeuchi, T. y Hatanaka, H. (1997) Involvement of phosphatidylinositol-3 kinase in prevention of low K(+)-induced apoptosis of cerebellar granule neurons. *Dev. Brain Res.* **101**: 197-206.
- Shimoke, K., Yamagishi, S., Yamada, M., Ikeuchi, T. y Hatanaka, H. (1999) Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity elevates c-Jun N-terminal kinase activity in apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **112**: 245-253.
- Skaper, S.D., Floreani, M., Negro, A., Facci, L. y Giusti, P. (1998) Neurotrophins rescue cerebellar granule neurons from oxidative stress-mediated apoptotic death: selective involvement of phosphatidylinositol 3-kinase and the mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Neurochem.* **70**: 1859-1868.
- Slee, E.A., Harte, M.T., Kluck, R.M., Wolf, B.B., Casiano, C.A., Newmeyer, D.D., Wang, H.G., Reed, J.C., Nicholson, D.W., Alnemri, E.S., Green, D.R. y Martin,

- S.J. (1999) Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspase-2, -3, -6, -7, -8 and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J. Cell Biol.* **144**: 281-292.
- Smits, V.A.J., Essers, M.A.G., Loomans, D.S.E., Klompmaker, R., Rijksen, G. y Medema, R.H. (1999) Inhibition of cell proliferation by lithium is associated with interference in cdc2 activation. *FEBS Lett.* **457**: 23-27.
- Song, L. y Jope, R.S. (1992) Chronic lithium treatment impairs phosphatidylinositol hydrolysis in membranes from rat brain regions. *J. Neurochem.* **58**: 2200-2206.
- Soler, R.M., Egea, J., Mintenig, G.M., Sanz-Rodríguez, C., Iglesias, M. y Comella, J.X. (1998) Calmodulin is involved in membrane depolarization-mediated survival of motoneurons by phosphatidylinositol-3 kinase- and MAPK-independent pathways. *J. Neurosci.* **18**: 1230-1239.
- Srivastava, A.K. y Pandey, S.K. (1998) Potential mechanism(s) involved in the regulation of glycogen synthesis by insulin. *Mol. Cell. Biochem.* **182**: 135-141.
- Stambolic, V., Ruel, L. y Woodgett, J.R. (1996) Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells. *Curr. Biol.* **6**: 1664-1668.
- Sturgill, T.W., Ray, L.B., Erikson, E. y Maller, J.L. (1988) Insulin-stimulated MAP-2 kinase phosphorylates and activates ribosomal protein S6 kinase II. *Nature* **334**: 715-718.
- Su, B. y Karin, M. (1996) Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expresión. *Curr. Opin. Immunol.* **8**: 402-411.
- Summers, S.A., Garza, L.A., Zhou, H. y Birnbaum, M.J. (1998) Regulation of insulin-stimulated glucose transporter GLUT4 translocation and Akt kinase activity by ceramide. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 5457-5464.
- Suzuki, A., Iwasaki, M., Kato, M. y Wagai, N. (1997) Sequential operation of ceramide synthesis and ICE cascade in CPT-11-initiated apoptotic death signaling. *Exp. Cell Res.* **233**: 41-47.
- Takahashi, M., Yasutake, K. y Tomizawa, K. (1999) Lithium inhibits neurite growth and tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 $\beta$ -dependent phosphorylation of juvenile tau in cultured hippocampal neurons. *J. Neurochem.* **73**: 2073-2083.
- Takashima, A., Murayama, M., Murayama, O., Kohno, T., Honda, T., Yasutake, K., Nihoumatsu, N., Mercken, M., Yamaguchi, H., Sugihara, S. y Wolozin, B.

- (1998) Presenilin 1 associates with glycogen synthase kinase-3 $\beta$  and its substrate tau. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 9637-9641.
- Tan, Y., Rouse, J., Zhang, A., Cariati, S., Cohen, P. y Comb, M.J. (1996) FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2. *EMBO J.* **15**: 4629-4642.
- Taylor, J., Gatchalian, C.L., Keen, G. y Rubin, L.L. (1997) Apoptosis in cerebellar granule neurons: involvement of interleukin-1 $\beta$  converting enzyme-like protease. *J. Neurochem.* **68**: 1598-1605.
- Testi, R. (1996) Sphingomyelin breakdown and cell fate. *Trends Biochem. Sci.* **21**: 468-471.
- Tewari, M., Quan, L.T., O'Rourke, K., Desnoyers, S., Zeng, Z., Beidler, D.R., Poirier, G.G., Salvensen, G.S. y Dixit, V.M. (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.
- Thornberry, N.A. y Lazebnik, Y. (1998) Caspases: enemies within. *Science* **281**: 1312-1316.
- Ushio-Fukai, M., Alexander, R.W., Akers, M., Yin, Q., Fujio, Y., Walsh, K. y Griendling, K.K. (1999) Reactive oxygen species mediate the activation of Akt/Protein kinase B by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **274**: 22699-22704.
- Vadnal, R. y Parthasarathy, R. (1995) Myo-inositol monophosphatase: diverse effects of lithium, carbamazepine, and valproate. *Neuropsychopharmacology* **12**: 2777-2785.
- Vanhaesebroeck, B. y Alessi, D.R. (2000) The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem. J.* **346**: 561-576.
- Verheij, M., Bose, R., Lin, X.H., Yao, B., Jarvis, W.D., Grant, S., Birrer, M.J., Szabo, E., Zon, L.I., Kyriakis, J.M., Haimovitz-Friedman, A., Fuks, Z. y Kolesnick, R.N. (1996) Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature* **380**: 75-79.

- Vlahos, C.J., Matter, W.F., Hui, K.Y. y Brown, R.F. (1994) A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J. Biol. Chem.* **269**: 5241-5248.
- Vlahos, C.J., Matter, W.F., Brown, R.F., Traynor-Kaplan, A.E., Heyworth, P.G., Prossnitz, E.R., Ye, R.D., Marder, P., Schelm, J.A. y Rothfuss, K.J. (1995) Investigation of neutrophil signal transduction using a specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Immunol.* **154**: 2413-2422.
- Vojtek, A.B. y Der, C.J. (1998) Increasing complexity of the Ras signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **273**: 19925-19928.
- Wang, H.-G., Pathan, N., Ethell, I.M., Krajewski, S., Yamaguchi, Y., Shibasaki, F., McKeon, F., Bobo, T., Franke, T.F., y Reed, J.C. (1999) Ca<sup>2+</sup>-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* **284**: 339-343.
- Wang, J.-F., Bown, C. y Young, L.T. (1999) Differential display PCR reveal novel targets for the mood-stabilizing drug valproate including the molecular chaperone GRP78. *Mol. Pharmacol.* **55**: 521-527.
- Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C.I., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. y Nagata, S. (1992) Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* **356**: 314-317.
- Watson, A., Eilers, A., Lallemand, D., Kyriakis, J., Rubin, L.L. y Ham, J. (1998) Phosphorylation of c-Jun is necessary for apoptosis induced by survival signal withdrawal in cerebellar granule neurons. *J. Neurosci.* **18**: 751-762.
- Weber, G. (1966) Polarization of the fluorescence of solutions en *Fluorescence and Phosphorescence Analysis* (Hercules, D.M., ed.). John Wiley and Sons, Nueva York.
- Welch, H., Eguinoa, A., Stephens, L.R. y Hawkins, P.T. (1998) Protein kinase B and Rac are activated in parallel within a phosphatidylinositide 3OH-kinase-controlled signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **273**: 11248-11256.
- Welsh, G.I., Wilson, C. y Proud, C.G. (1996) GSK3: a shaggy frog story. *Trends in Cell Biol.* **6**: 274-279.
- Wera, S. y Hemmings, B.A. (1995) Serine/threonine protein phosphatases. *Biochem. J.* **311**: 17-29.

- Westwick, J.K., Bielawska, A.E., Dbaibo, G., Hannun, Y.A. y Brenner, D.A. (1995) Ceramide activates the stress-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* **270**: 22689-22692.
- Whitmarsh, A.J., Yang, S.-H., Su, M.S.-S., Sharrocks, A.D. y Davis, R.J. (1997) Role of p38 and JNK mitogen-activated protein kinases in the activation of ternary complex factors. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 2360-2371.
- Whitmarsh, A.J. y Davis, R.J. (1998) Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals. *Trends Biochem. Sci.* **23**: 481-485.
- Williams, R.S.B. y Harwood, A.J. (2000) Lithium therapy and signal transduction. *Trends in Pharmacol. Sci.* **21**: 61-64.
- Wong, E.H., Kemp, J.A., Priestley, T., Knight, A.R., Woodruff, G.N. e Iversen, L.L. (1986) The anticonvulsant MK-801 is a potent N-methyl-D-aspartate antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 7104-7108.
- Woodgett, J.R., Avruch, J. y Kyriakis, J.M. (1995) Regulation of nuclear transcription factors by stress signals. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **22**: 281-283.
- Wu, C.L., Classon, M., Dyson, N. y Harlow, E. (1996) Expression of dominant-negative mutant DP-1 blocks cell cycle progression in G1. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 3698-3706.
- Wyllie, A.H., Kerr, J.F.R., Curie, A.R. (1981) Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* **68**: 251-305.
- Wyllie, A.H. (1998) *ISI Atlas of Science: Immunology*, pp. 192-196.
- Xing, J., Ginty, D.D. y Greenberg, M.E. (1996) Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science* **273**: 959-962.
- Yan, G.-M., Lin, S.-Z., Irwin, R.P. y Paul, S.M. (1994) Depolarization or glutamate receptor activation blocks apoptotic cell death of cultured cerebellar granule neurons. *Brain Res.* **656**: 43-51.
- Yan, G.-M. y Paul, S.M. (1997) Cultured Cerebellar Granule Neurons as a Model of Neuronal Apoptosis, en *Neuromethods 29: Apoptosis Techniques and Protocols* (ed.: J. Poirier), pp. 47-66. Humana Press, Totowa, New Jersey.

- Yano, S., Tokumitsu, H. y Soderling, T.R. (1998) Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the Protein-Kinase B pathway. *Nature* **396**: 584-587.
- Yamagishi, S., Yamada, M., Ishikawa, Y., Matsumoto, T., Ikeuchi, T. y Hatanaka, H. (2001) p38 mitogen-activated protein kinase regulates low potassium-induced c-Jun phosphorylation and apoptosis in cultured cerebellar granule neurons. *J. Biol. Chem.* **276**: 5129-5133.
- Yenush, L., Bellés, J.M., López-Coronado, J.M., Gil-Mascarell, R., Serrano, R. y Rodríguez, P.L. (2000) A novel target of lithium therapy. *FEBS Lett.* **467**: 321-325.
- Yim, X.M. (2000) Signal transduction mediated by Bid, a pro-death Bcl-2 family proteins, connects the death receptor and mitochondria apoptosis pathways. *Cell. Res.* **10**: 161-167.
- Yuan, P.-X., Chen, G. y Manji, H.K. (1999) Lithium activates the c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase in vitro and in the CNS in vivo. *J. Neurochem.* **73**: 2299-2309.
- Yuan, P.-X., Huong, L.-D., Jiang, Gutkind, J.S., Manji, H.K. y Chen, G. (2001) The mood-stabilizer valproic acid activates Mitogen-activated protein kinases and promotes neurite growth. *J. Biol. Chem.* **276**: 31674-31683.
- Zha, J.P., Harada, H., Yang, E., Jockel, J. y Korsmeyer, S.J. (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, Y., Yao, B., Delikat, S., Bayoumy, S., Lin, X.H., Basu, S., McGinley, M., Chan-Hui, P.Y., Lichenstein, H. y Kolesnick, R. (1997) Kinase supressor of Ras is ceramide-activated protein kinase. *Cell* **89**: 63-72.
- Zhivotovsky, B., Orrenius, S., Brustugun, O.T. y Doskeland, S.O. (1998) Injected cytochrome c induces apoptosis. *Nature* **391**: 449-450.
- Zhou, H., Summers, S.A., Birnbaum, M.J. y Pittman, R.N. (1998) Inhibition of Akt kinase by cell-permeable ceramide and its implications for ceramida-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **273**: 16568-16575.
- Zou, H., Li, Y., Liu, X. y Wang, X. (1999) An APAF cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J. Biol. Chem.* **274**: 11549-11556.



Zundel, W. y Giaccia, A. (1998) Inhibition of the anti-apoptotic PI(3)K/Akt/Bad pathway by stress. *Genes Dev.* **12**: 1941-1946.