



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**PAPEL DEL ESTRÉS RETICULAR MEDIADO POR LA VÍA DE PERK Y ACTIVACIÓN DE LA CASPASA-12 DURANTE LA MUERTE NEURONAL INDUCIDA POR LA AUSENCIA DE GLUCOSA EN NEURONAS DE HIPOCAMPO CULTIVADAS.**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**Doctor en Ciencias**

**PRESENTA:**

**M en C. SELENE GARCÍA DE LA CADENA FARFÁN**

**TUTOR PRINCIPAL**

**DRA. MARÍA DE LOURDES MASSIEU TRIGO**  
Instituto de Fisiología Celular

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR**

**DR. ROBERTO CORIA ORTEGA**  
Instituto de Fisiología Celular

**DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO**  
Facultad de Química

Ciudad de México. Mayo, 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **AGRADECIMIENTOS**

El presente trabajo se llevó a cabo bajo la dirección de la Dra. María de Lourdes Massieu Trigo en el Departamento de Neuropatología Molecular de la División de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Este trabajo se realizó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, proyecto S112179 y CB239607) y del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT, proyecto IN211710-3).

También, se contó con el apoyo de una beca otorgada por el CONACYT (221026) para mis estudios de doctorado y una beca del Programa de Becas Mixtas para Becarios CONACYT Nacionales (290749) para la realización de una estancia de investigación en el Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, Madrid, España. Para la asistencia a congresos, se contó con el apoyo del Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP).

A los miembros de mi comité tutorial: Dr. Roberto Coria Ortega y Dr. Ignacio Camacho Arroyo por sus valiosos comentarios y aportaciones al proyecto.

A los miembros del jurado de examen: Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez, Dra. Leonor Pérez Martínez, Dr. Jaime Iván Velasco Velázquez, Dra. Patricia Bertha Judith De Gortari Gallardo y Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte por su revisión y comentarios a este trabajo.

A la Dra. Laura Kawasaki Watanabe y al Dr. Roberto Coria Ortega por su ayuda en los ensayos preliminares de RT-PCR utilizados para determinar el procesamiento del mRNA de XBP1.

A la Biol. Teresa Montiel por su apoyo general en el laboratorio.

En especial quiero agradecer a la Dra. Lourdes Massieu Trigo por toda la confianza que me brindo durante todo el tiempo que estuve en el laboratorio, por el tiempo dedicado a mí formación. Gracias Lourdes, porque siempre me apoyaste a pesar de todo y tuviste el tiempo y la paciencia de escucharme cuando más lo necesitaba.

A Tere por toda su ayuda y enseñanzas en el laboratorio y a Ceci por todas esas amenas pláticas.

Quiero agradecer a todas mis amigas y compañeros del laboratorio: A Gaby, Carmén, Lucy, Susy, Marco y Cristian. Gracias chicas por todas las tardes que comimos y reímos juntas, por su amistad y su confianza.

A mis amigos de otros laboratorios: Nadia, Ari, Octavio, Martín, Daniel, Citlalli, Rafa, Rosa y Toño.

A mi amiga de toda la vida: Brenda Loaiza, gracias por todos tus consejos y enseñanzas, por compartir tantas cosas juntas y por esas interminables pláticas. Gracias, por enseñarme que a pesar de todo siempre hay una solución para los problemas. Ya pronto te veré escribiendo los agradecimientos de tu tesis!!!

*Como agradecimiento especial quiero dedicar este trabajo a mi familia:*

*A mis padres: Arturo y Ma. Guadalupe*

*A mis hermanos: Arturo y Karina.*

*En especial a ti Kar, porque siempre has creído en mí, por apoyarme en todo lo que he emprendido, pero sobre todo gracias por ser la mejor hermana y amiga que pude haber tenido.*

*A mis cuñados: Pascal y Paloma y al pequeño que viene en camino*

*A Marú por todo su amor y cariño*

## ÍNDICE

Abreviaturas	
I. Resumen	1
II. Introducción	3
1. La glucosa en el sistema nervioso central	3
2. Transportadores de glucosa	4
3. Metabolismo de glucosa	6
4. Hipoglucemia	9
4.1 Mecanismos de muerte neuronal inducidos por la hipoglucemia	11
5. El retículo endoplásmico	12
5.1 El calcio en el retículo endoplásmico	13
6. Estrés del retículo endoplásmico y respuesta a proteínas no plegadas	14
6.1 Cinasa del retículo endoplásmico similar a PKR	16
6.2 Factor activador transcripcional 6	17
6.3 Proteína 1 que requiere inositol	18
7. Estrés reticular y apoptosis	20
7.1. Activación de caspasa-12 por inducción de estrés reticular	24
8. Estrés reticular y caspasa-12 en la muerte neuronal inducida por la isquemia cerebral	25
9. Estrés reticular y caspasa-12 en la muerte neuronal inducida por la privación de oxígeno y glucosa	28
III. Planteamiento del problema	30
IV. Hipótesis	31
V. Objetivo general	32
Objetivos particulares	32
VI. Métodos	33
1. Cultivo de células	33
2. Determinación de viabilidad celular	34
3. Detección de apoptosis	34

4. Determinación de la actividad de la caspasa-3	36
5. Determinación de proteínas totales	37
6. Determinación de la actividad de la caspasa-12	37
7. Análisis por inmunoblot	38
8. Tratamientos	39
9. Análisis estadístico	40
VII. Resultados	41
1. La ausencia de glucosa induce muerte neuronal apoptótica	41
2. La actividad de la caspasa-3 es inducida después de la reintroducción de glucosa	43
3. La actividad de la caspasa-7 es inducida después de la ausencia de glucosa	44
4. La ausencia de glucosa induce la activación de la caspasa-12	46
5. La activación de la caspasa-12 sugiere inducción del estrés reticular por la ausencia de glucosa	48
6. La ausencia de glucosa induce un aumento en los niveles de p-eIF2 $\alpha$ y ATF4	50
7. La ausencia de glucosa induce un aumento en los niveles de CHOP y GRP78	52
VIII. Discusión	54
IX. Conclusiones	61
X. Referencias	63
XI. Apéndice	79

## ABREVIATURAS

Ac-ATAD-AFC	Ac-Ala-Thr-Ala-Asp-AFC
Ac-CoA	Acetil coenzima A
Ac-DEVD-AMC	Ácido N-acetil-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-metilcumarina
AG	Ausencia de glucosa
ASK1	Cinasa 1 reguladora de la señal de apoptosis
ATF4	Factor activador transcripcional 4
ATF6	Factor activador transcripcional 6
Bak	Proteína killer antagonista homóloga a Bcl-2
Bax	Proteína X asociada con Bcl-2
Bcl-2	Linfoma 2 de células B
Bcl-xL	Linfoma de células B extra grande
Bid	Agonista letal que interacciona mediante dominios BH3
Bim	Mediador de muerte celular que interactúa con Bcl-2
BSA	Albúmina de suero de bovino
CBF	Flujo sanguíneo cerebral
CHOP	Proteína homóloga de la proteína de unión al potenciador CCAAT
CRE	Elemento de respuesta a AMPc
DEVDCHO	Acetil-Asp-Glu-Val-Asp-aldehído
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
D-PBS	Buffer salino de fosfatos Dulbecco's
DR5	Receptor de muerte 5
EDEM1	Proteína 1 similar a $\alpha$ -manosidasa que aumenta la degradación del RE
eIF2	Factor de iniciación de la traducción eucariota 2
ERAD	Degradación asociada al RE
ERO1 $\alpha$	Oxidoreductasa del RE
ERp29	Proteína del RE de 29 kDa
ERp44	Proteína del RE de 44 kDa
ERp57	Proteína del RE de 57 kDa
ERp72	Proteína del RE de 72 kDa
ERSE	Elemento de respuesta a estrés del RE
GADD34	Gen 34 inducible por daño al ADN y detención del crecimiento



GDP	Guanosín difosfato
GLUT	Transportadores de glucosa independientes de sodio
GRP78	Proteína regulada por glucosa de 78 kDa
GRP94	Proteína regulada por glucosa de 94 kDa
GTP	Guanosín trifosfato
HERP	Proteína del RE inducida por homocisteína
HRD1	Proteína ubiquitina ligasa E3
I $\kappa$ B $\alpha$	Inhibidor del factor nuclear- $\kappa$ B alpha
IKK	Cinasa I $\kappa$ B
IP <sub>3</sub> R	Receptor a inositol 1,4,5-trifosfato
I/R	Isquemia/reperfusión
IRE1	Proteína 1 que requiere inositol
JNK	Cinasa N-terminal c-Jun
LDH1	Lactato deshidrogenasa 1
LDH5	Lactato deshidrogenasa 5
MCAO	Oclusión de la arteria cerebral media
MCTs	Transportadores de ácidos monocarboxílicos
MDL-28170	N-Benciloxycarbonilvalilfenilalanina
Met-tRNA	tRNA-metionina iniciador
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear- $\kappa$ B
NOX	NADPH oxidasa
OGD	Privación de oxígeno y glucosa
OGSD	Privación de oxígeno, glucosa y suero
ORF	Marco abierto de lectura
PARP-1	Poli (ADP-ribosa) polimerasa-1
PBS	Buffer salino de fosfatos
p-eIF2 $\alpha$	Forma fosforilada de eIF2 $\alpha$
PERK	Cinasa del retículo endoplásmico similar a PKR
p-JNK	JNK fosforilada
PUMA	Modulador de apoptosis sobrerregulado por p53
Q-ATAD	Q-Ala-Thr-Ala-Asp(OMe)-OPH
QVDOPH	Q-Val-Asp-OPH

RE	Retículo endoplásmico
RG	Reintroducción de glucosa
RIDD	Degradación dependiente de IRE1
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RyR	Receptor a rianodina
S1P	Proteasa de sitio-1
S2P	Proteasa de sitio-2
SERCA	ATPasa de Ca <sup>2+</sup> del retículo sarco/endoplásmico
SGLT	Transportadores de glucosa dependientes de sodio
STS	Estaurosporina
TCA	Ciclo de los ácidos tricarbóxicos
Tg	Tapsigargina
Tm	Tunicamicina
TRAF2	Factor 2 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral
TRB3	Homólogo de la proteína tribbles 3
TTBS	Buffer tris salino-Tween 20
TUNEL	TdT-mediated dUTP nick end labeling
uORFs	Marcos abiertos de lectura río arriba
UPR	Respuesta a proteínas no plegadas
UPRE	Elemento de respuesta a proteínas no plegadas
XBP1	Proteína 1 de unión a la caja X
XBP1s	XBP1 procesado
ΔF/min/mg prot	Cambio en la intensidad de fluorescencia por minuto por miligramo de proteína

## ESTRUCTURA DE LA TESIS

La presente tesis está organizada de la siguiente manera:

- ❖ **Resumen**
- ❖ **Introducción**
- ❖ **Planteamiento del problema**
- ❖ **Hipótesis**
- ❖ **Objetivos**
- ❖ **Métodos**
- ❖ **Resultados**
- ❖ **Discusión**
- ❖ **Conclusiones**
- ❖ **Referencias**
- ❖ **Apéndices:** En esta sección se incluye el artículo de investigación que contiene los resultados de esta tesis doctoral:

*Glucose deprivation induces reticulum stress by the PERK pathway and caspase-7- and calpain-mediated caspase-12 activation. García de la Cadena S, Hernández-Fonseca K, Camacho-Arroyo I, Massieu L. Apoptosis, 2014, 19:414-427*

Y un artículo de revisión en dónde se aborda el papel de las caspasas en la inflamación y la muerte neuronal isquémica, destacando el papel de la caspasa-12:

*Caspases and their role in inflammation and ischemic neuronal death. Focus on caspase-12. García de la Cadena S, Massieu L. Apoptosis, 2016*

## I. RESUMEN

El retículo endoplásmico (RE) es un compartimento subcelular que tiene un importante papel como almacén de calcio. Además de servir como depósito de calcio, una función central del RE es el plegamiento y procesamiento, tanto de proteínas de membrana como de secreción, recién sintetizadas. Éstos son procesos estrictamente dependientes de calcio que requieren de una alta concentración de este catión para su correcto funcionamiento. Cuando estas funciones se alteran, se produce un estado patológico conocido como estrés reticular, durante el cual, las proteínas mal o no plegadas se acumulan en el lumen del RE. La acumulación de proteínas no plegadas puede inducir apoptosis si el funcionamiento del RE no es restaurado. La función del RE puede alterarse a través de varios mecanismos, que incluyen, el vaciamiento de los depósitos de calcio del RE, el bloqueo de la glucosilación de proteínas, el bloqueo del proteosoma y la presencia de mutaciones en proteínas que impide que éstas sean plegadas apropiadamente. Para hacer frente a esas condiciones, las células activan una respuesta que está altamente conservada en los organismos conocida como: respuesta a proteínas no plegadas (UPR). La principal función de la UPR es restaurar las funciones del RE reduciendo la carga de proteínas que necesitan ser plegadas y procesadas en el lumen, e incrementar la capacidad para plegar y procesar proteínas. Para llevar a cabo estas funciones la UPR reduce la síntesis de proteínas, mientras que aumenta la traducción de proteínas chaperonas y la degradación de proteínas mal plegadas/no plegadas.

El objetivo del presente estudio fue evaluar la presencia del estrés reticular en neuronas de hipocampo cultivadas, después de ser expuestas a un periodo de ausencia de glucosa (AG), lo cual trae como consecuencia la muerte de las neuronas. Los mecanismos asociados a la muerte en esta condición no se conocen totalmente, pero experimentos de nuestro laboratorio sugieren que una disminución en las concentraciones de ATP y un aumento en la concentración de calcio intracelular participan en este proceso, activando a la proteasa dependiente de calcio, calpaína. Un segundo objetivo de esta investigación fue evaluar la

contribución del estrés reticular a la inducción de la muerte apoptótica inducida en esta condición. Para cumplir con estos objetivos se evaluó la presencia de algunos marcadores de estrés reticular como la proteína regulada por glucosa de 78 kDa (GRP78), el factor activador transcripcional 4 (ATF4), la proteína homóloga de la proteína de unión al potenciador CCAAT (CHOP) y la forma fosforilada de eIF2 $\alpha$  (p-eIF2 $\alpha$ ), por medio de ensayos de inmunoblot. Además, se determinó la actividad y el procesamiento de la caspasa-3, -7 y -12, utilizando ensayos fluorométricos y de inmunoblot. La presencia de apoptosis se determinó cuantificando el número de núcleos fragmentados y condensados y evaluando el corte del DNA mediante la tinción con Hoechst y el ensayo de TUNEL, respectivamente.

Los resultados indican que el estrés reticular es inducido durante la AG y que éste contribuye a la muerte neuronal a través de la activación de la vía de PERK de la UPR y de la caspasa-12. Además, los resultados demuestran que la activación de la caspasa-12 (mediada por calpaína y caspasa-7) está involucrada en la ejecución de la muerte neuronal, mientras que la vía mitocondrial dependiente de caspasas, tiene aparentemente un papel marginal.

## II. INTRODUCCIÓN

### 1. La glucosa en el sistema nervioso central

El cerebro de los mamíferos depende de la glucosa como su principal fuente de energía. En el cerebro adulto, las neuronas tienen una alta demanda energética, requiriendo un aporte continuo de glucosa a través de la circulación sanguínea. En humanos, el cerebro representa el 2% del peso corporal total, sin embargo, es el principal consumidor de glucosa (aproximadamente 5.6 mg de glucosa por 100 g de tejido cerebral por minuto) (Mergenthaler et al. 2013).

El cerebro, requiere una gran cantidad de energía para el mantenimiento de los potenciales de membrana y las funciones relacionadas con la neurotransmisión. Como comparación, el ATP consumido por gramo por minuto, que es usado para la señalización en el cerebro, equivale a la energía que utiliza el músculo de una pierna de un corredor durante un maratón, o la energía que requiere el riñón para llevar a cabo su trabajo osmótico. Aproximadamente el 75% de la energía consumida por el cerebro es utilizada en la señalización, mientras que el 25% restante se utiliza en funciones celulares esenciales, como, la síntesis y degradación de proteínas, nucleótidos y fosfolípidos, el transporte axoplásmico y para evitar la fuga de protones en la mitocondria (Attwell et al. 2001). Adicionalmente, el metabolismo de la glucosa proporciona la energía y los precursores para la biosíntesis de neurotransmisores (Mergenthaler et al. 2013).

La glucosa es el principal sustrato energético usado por el cerebro adulto (Clarke et al. 1999). Sin embargo, bajo condiciones particulares el cerebro tiene la capacidad para usar otros sustratos energéticos, tales como los cuerpos cetónicos (acetoacetato y  $\beta$ -hidroxibutirato) durante el desarrollo y el ayuno prolongado, o el lactato durante periodos de intensa actividad física (McKenna et al. 2006; Bélanger et al. 2011; Mergenthaler et al. 2013).

## 2. Transportadores de glucosa

La glucosa entra a las células mediante dos tipos de proteínas acarreadoras: los transportadores de glucosa dependientes de sodio (SGLT) y los transportadores de glucosa independientes de sodio (GLUT). Los transportadores SGLT acoplan el ingreso de  $\text{Na}^+$  y glucosa aprovechando el gradiente electroquímico a favor de la entrada del  $\text{Na}^+$ , transportando a la hexosa en contra de un gradiente de concentración. Éstos se expresan principalmente en el epitelio del intestino delgado y el epitelio tubular renal (Castrejón et al. 2007; Shah et al. 2012). Por otro lado, los GLUT que transportan la glucosa a favor de su gradiente de concentración, se expresan en todos los tejidos del organismo y constituyen el principal mecanismo de entrada de la glucosa a las células. En el cerebro la glucosa es transportada a través de la barrera hematoencefálica por difusión facilitada y los principales transportadores de glucosa en este órgano son los GLUT (Castrejón et al. 2007). Se han identificado 14 tipos de transportadores de glucosa (GLUT1–GLUT14), los cuales pueden ser dependientes o independientes de insulina. Para su estudio, se han dividido en tres subfamilias de acuerdo a las similitudes en su secuencia y a sus características funcionales. Estos transportadores son glucoproteínas cuya masa molecular fluctúa entre 55 y 45 kDa, contienen doce segmentos transmembranales conectados entre sí por asas hidrofílicas; la primera asa es externa y en algunos GLUT presenta un sitio de glucosilación. Tienen sus grupos amino y carboxilo terminales del lado citosólico de la membrana. En estos transportadores, la selectividad a la glucosa está determinada por una serie de secuencias de aminoácidos altamente conservadas (Castrejón et al. 2007; Simpson et al. 2007). En el cerebro se encuentran presentes algunos de estos transportadores, como el GLUT1, GLUT3, GLUT4 y GLUT5 (Simpson et al. 2007). El transportador GLUT1 es un transportador independiente de insulina. Hay dos isoformas de GLUT1, con pesos moleculares de 55 y 45 kDa, las cuales son codificadas por el mismo gen y difieren solo en el grado de glucosilación (Vannucci et al. 1997). La isoforma de 55 kDa, que es comparable a la que se encuentra en la membrana de los eritrocitos, se localiza

exclusivamente en la membrana luminal y abluminal de las células endoteliales que conforman la barrera hematoencefálica. La isoforma menos glucosilada de 45 kDa del GLUT1 se localiza en todas las células gliales, así como en las membranas basolateral y apical de las membranas del plexo coroide y el epéndimo (Simpson et al. 2007). El GLUT3 es un transportador independiente de insulina que presenta una alta afinidad por la glucosa. En el cerebro se expresa predominantemente en las neuronas, encontrándose en estructuras de la materia gris y en la neurohipófisis (Maher et al. 1994; Simpson et al. 2008). El GLUT4 es un transportador dependiente de insulina que se expresa en neuronas. La expresión de este transportador coincide con la presencia del receptor de insulina, sugiriendo que la translocación de GLUT4 de vesículas intracelulares a la membrana celular puede también estar regulada por insulina en el sistema nervioso central, particularmente en el hipocampo (Messari et al. 1998). En el cerebro, se ha confirmado la existencia del mRNA y de la proteína GLUT4 en células granulares del giro dentado, el cerebelo y el bulbo olfatorio (Vannucci et al. 1997). El GLUT5 se considera principalmente como un transportador de fructosa, sin embargo su expresión ha sido detectada en una variedad de tejidos incluyendo el cerebro, donde los niveles de fructosa son bajos. En el cerebro se expresa exclusivamente en la microglía. El GLUT5 es un transportador poco eficiente de glucosa y probablemente contribuye poco al metabolismo de la glucosa cerebral (Maher et al. 1994; Vannucci et al. 1998).

Los transportadores de glucosa más ampliamente expresados en el cerebro son el GLUT1 y el GLUT3 y su expresión varía durante el desarrollo. Los niveles de GLUT1 y GLUT3 se incrementan dramáticamente con la maduración cerebral y la sinaptogénesis (McKenna et al. 2006; Simpson et al. 2008).

En el cerebro, también se encuentran presentes transportadores de ácidos monocarboxílicos (MCTs), los cuales son los responsables del transporte de lactato, piruvato, y los cuerpos cetónicos (acetoacetato y  $\beta$ -hidroxibutirato). Se han identificado 14 tipos de MCTs (MCT1-MCT14). En el cerebro se encuentran presentes cuatro de estos transportadores (Simpson et al. 2007; Halestrap et al. 2012). El MCT1 se encuentra localizado en la barrera hematoencefálica y en los



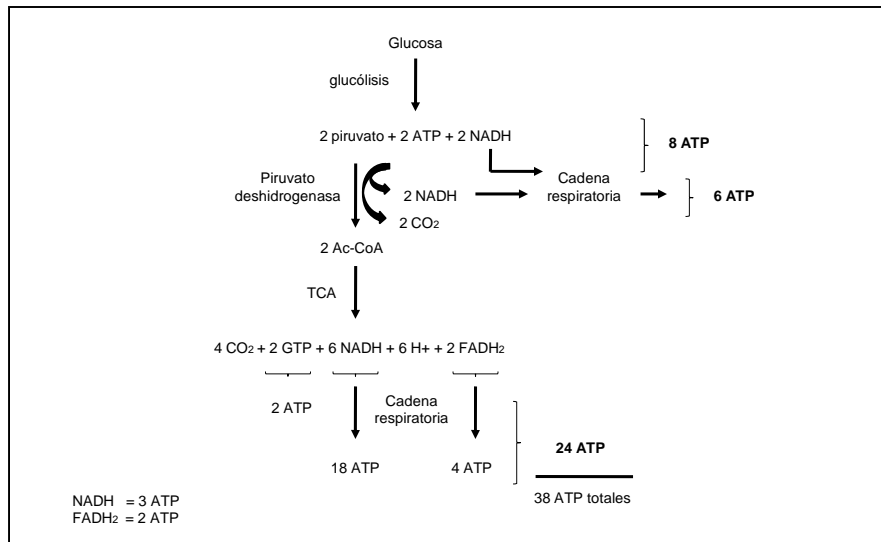
astrocitos. El MCT2 se expresa principalmente en neuronas. La expresión del MCT3 está limitada al plexo coroide. Por otro lado, el MCT4 se ha identificado en algunas células gliales (Pierre y Pellerin 2005; McKenna et al. 2006). Estos transportadores se expresan en el cerebro en desarrollo, lo cual es consistente con la importancia de los ácidos monocarboxílicos como sustratos durante el periodo de lactancia (McKenna et al. 2006).

### **3. Metabolismo de glucosa**

En el cerebro, la glucosa es usada como el principal combustible metabólico (Clarke et al. 1999). El primer paso es la entrada de la glucosa a las células a través de los transportadores de glucosa, GLUTs. A continuación, la glucosa es fosforilada por la enzima hexocinasa generando glucosa-6-fosfato (glucosa-6P). La glucosa-6P puede entrar en la vía de la glucólisis o en la vía de las pentosas fosfato, generando piruvato, ATP y NADH o produciendo equivalentes reductores en forma de NADPH y pentosas, respectivamente. Además, la glucosa-6P puede también almacenarse en forma de glucógeno (Wiesinger et al. 1997; Bélanger et al. 2011). El glucógeno, es la única reserva energética en el cerebro y se encuentra localizado exclusivamente en los astrocitos en el cerebro adulto (Bélanger et al. 2011; Mergenthaler et al. 2013).

En la glucólisis, una molécula de glucosa, es inicialmente degradada a dos moléculas de piruvato en un proceso glucolítico que ocurre en el citosol. Durante la glucólisis, cuatro moléculas de ATP son generadas por cada molécula de glucosa convertida a piruvato. Sin embargo, dos moléculas de ATP son requeridas en la vía metabólica, una de esas reacciones es la fosforilación inicial de la glucosa. Mientras que, el segundo ATP generado es utilizado en la fosforilación de la fructosa 6-fosfato. De esta forma, la glucólisis tiene un rendimiento neto de 2 ATP por molécula de glucosa (obtenidos por fosforilación a nivel de sustrato). También, durante la glucólisis se forman dos moléculas de NADH a partir de NAD<sup>+</sup> por molécula de glucosa. Bajo condiciones anóxicas, el NADH reacciona en el citosol con el piruvato, formando lactato y regenerando el NAD<sup>+</sup> (con un

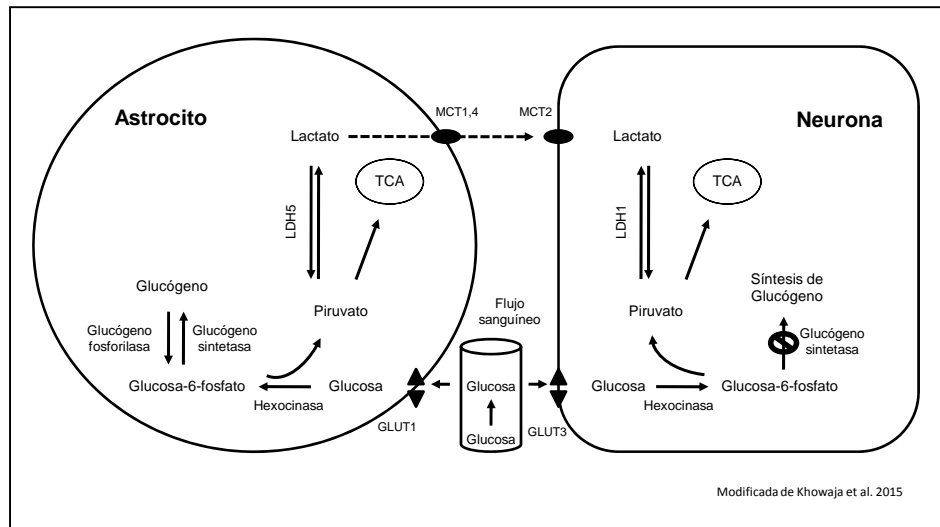
rendimiento neto de 2 ATP por molécula de glucosa) (Hertz, 2008). Sin embargo, bajo condiciones aeróbicas, las dos moléculas de NADH son transportadas del citosol a la mitocondria, a través de la lanzadera malato-aspartato. En la mitocondria, las dos moléculas de NADH son oxidadas al entrar en la cadena respiratoria, generando adicionalmente 6 moléculas de ATP (Mergenthaler et al. 2013). Por otro lado, el piruvato generado durante la glucólisis atraviesa la membrana interna mitocondrial mediante un mecanismo de simporte con protones. Dentro de la matriz mitocondrial, el piruvato sufre una descarboxilación oxidativa provocada por la enzima piruvato deshidrogenasa, generando acetil coenzima A (Ac-CoA), NADH y CO<sub>2</sub>. La Ac-CoA se condensa con el oxalacetato presente en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y durante una vuelta del ciclo, el oxalacetato es regenerado y está listo para condensarse con otra molécula de Ac-CoA. Cada molécula de glucosa produce a través de la glucólisis dos moléculas de piruvato, que a su vez producen dos moléculas de Ac-CoA, por lo tanto, el rendimiento del TCA es: 4 CO<sub>2</sub>, 2 GTP, 6 NADH, 6 H<sup>+</sup> y 2 FADH<sub>2</sub>. En todos los tipos celulares, el TCA asociado con la fosforilación oxidativa, funciona como la principal fuente de energía. Cada NADH cuando se oxida en la cadena respiratoria, genera 3 moléculas de ATP, mientras que el FADH<sub>2</sub> da lugar a 2 ATP. Por lo tanto, el rendimiento neto de ATP después de la oxidación de una molécula de glucosa en la glucólisis, el TCA y la fosforilación oxidativa es de 38 moléculas de ATP (Hertz, 2008) (Figura 1).



**Fig. 1** Oxidación de la glucosa. La glucosa es degradada durante la glucólisis a dos moléculas de piruvato, 2 ATP y 2 NADH. Posteriormente, el piruvato sufre una descarboxilación oxidativa provocada por la enzima piruvato deshidrogenasa, generando 2 Ac-CoA, 2 NADH y 2 CO<sub>2</sub>. La Ac-CoA se condensa con el oxalacetato presente en el TCA, generando 4 CO<sub>2</sub>, 2 GTP, 6 NADH, 6 H<sup>+</sup> y 2 FADH<sub>2</sub>. Finalmente, el NADH y el FADH<sub>2</sub> son oxidados en la cadena respiratoria. El rendimiento neto de ATP después de la oxidación de una molécula de glucosa en la glucólisis, el TCA y la fosforilación oxidativa es de 38 moléculas de ATP.

Como se mencionó al principio, el glucógeno es la única reserva energética en el cerebro, está presente en los astrocitos y puede ser rápidamente metabolizado sin necesidad de utilizar ATP. Aunque las neuronas expresan la enzima glucógeno sintetasa, necesaria para la síntesis de glucógeno; esta enzima se mantiene inactiva en las neuronas a través de mecanismos que dependen del proteosoma. La ruptura del glucógeno resulta en la producción de glucosa-6P, la cual es convertida a piruvato. El piruvato generado puede entrar al TCA o bien ser convertido a lactato por la enzima lactato deshidrogenasa 5 (LDH5). El lactato generado es liberado al espacio extracelular a través de los transportadores MCT1 y MCT4, presentes en los astrocitos. El lactato liberado es recapturado por las neuronas vía el transportador MCT2. En las neuronas, el lactato puede ser usado como sustrato energético después de su conversión a piruvato por la enzima lactato deshidrogenasa 1 (LDH1), la cual es expresada principalmente en neuronas (Hertz, 2008; Bélanger et al. 2011). Finalmente, el piruvato generado por la acción de la enzima LDH1, puede entrar al TCA y pasar por la cadena de

transporte de electrones para cubrir los requerimientos energéticos de las neuronas (Bélanger et al. 2011) (Figura 2). Sin embargo, los niveles de glucógeno en el cerebro (6-7  $\mu\text{mol/g}$ ), son relativamente bajos comparados con los niveles observados en el hígado (100-500  $\mu\text{mol/g}$ ) (McCall, 2004; Khowaja et al. 2015; Öz et al. 2015).



**Fig. 2** Interacciones metabólicas astrocito-neurona. La ruptura del glucógeno resulta en la producción de glucosa-6P, la cual es convertida a piruvato. El piruvato generado puede entrar al TCA o bien ser convertido a lactato por la enzima LDH5. El lactato generado es liberado al espacio extracelular a través de los transportadores MCT1 y MCT4, presentes en los astrocitos. El lactato liberado es recapturado por las neuronas vía el transportador MCT2. En las neuronas, el lactato es convertido a piruvato por la enzima LDH1. Finalmente, el piruvato generado por la acción de la LDH1, puede entrar al TCA y pasar por la cadena de transporte de electrones para cubrir los requerimientos energéticos de las neuronas.

#### 4. Hipoglucemia

La hipoglucemia se define como la disminución en los niveles normales de glucosa por debajo de 40-60 mg/dL (Saunders y Ross 2002; Languren et al. 2013). La hipoglucemia es un estado generalmente transitorio, aunque puede presentarse en forma crónica, tanto en adultos como en infantes con trastornos hormonales, como es la deficiencia de glucagón o alteraciones en la hormona del crecimiento, entre otras. Los pacientes diabéticos dependientes de insulina (diabetes tipo 1) también están expuestos a estados de hipoglucemia, ya que al administrarse la insulina pueden excederse en la dosis y provocar así una

disminución excesiva en los niveles sanguíneos de glucosa. La hipoglucemia también puede presentarse como consecuencia de un insulinoma que al sintetizar y liberar insulina de manera excesiva, produce la hipoglucemia (Haces et al. 2005; Languren et al. 2013). La concentración fisiológica de glucosa en sangre oscila entre 70-110 mg/dL (o 3.9-6.1 mM) y existen mecanismos encargados de mantener los niveles de glucosa dentro de este rango fisiológico. Cuando los niveles de glucosa en sangre disminuyen por debajo de 81 mg/dL disminuye la secreción de insulina de las células  $\beta$  pancreáticas. Una disminución por debajo de 68 mg/dL aumenta la secreción de glucagón de las células pancreáticas y de epinefrina de la médula adrenal. El glucagón incrementa los niveles de glucosa en plasma por la estimulación de la producción de glucosa hepática a través de la glucogenólisis (degradación de glucógeno a glucosa) y la gluconeogénesis (síntesis de glucosa de piruvato). La epinefrina también incrementa la glucogenólisis y la gluconeogénesis en el hígado, estimula la lipólisis en el tejido adiposo y disminuye la secreción de insulina. Si la concentración de glucosa en sangre continúa bajando hasta 54 mg/dL se activa la respuesta simpatoadrenal que causa síntomas autonómicos (neurogénicos), como son sudoración, hambre, hormigueo, palpitaciones, temblores y ansiedad. Esos síntomas son críticos para la percepción del estado hipoglucémico. Cuando se alcanza este nivel de glucosa, también se presentan síntomas neurológicos (neuroglucopénicos), que incluyen confusión, visión borrosa, mareos, irritabilidad, dificultad para hablar y pensar, debilidad y somnolencia (Cryer 2007; Languren et al. 2013). La percepción de estos síntomas, particularmente los síntomas neurogénicos, induce al organismo a la ingesta de alimentos. Si todos esos mecanismos de defensa fallan y los niveles de glucosa alcanzan los 50 mg/dL se puede presentar una disminución en la cognición, conducta aberrante y crisis epilépticas. El coma se puede presentar cuando los niveles de glucosa se encuentran en el rango de 41-49 mg/dL, así como a niveles de glucosa más bajos. Todas esas respuestas son típicamente corregidas después de que la concentración de glucosa en plasma se restaura. El daño neurológico permanente es raro. Sin embargo, la hipoglucemia profunda (20 mg/dL) y prolongada puede causar daño cerebral (Cryer 2007). La muerte

neuronal hipoglucémica es más pronunciada en poblaciones de neuronas específicas, como las neuronas de la región CA1 del hipocampo, el subículo, el giro dentado, las capas 2 y 3 de la corteza cerebral y el estriado dorso lateral. Mientras que otras áreas como el cerebelo y el tallo cerebral son más resistentes (Auer et al. 1984; Auer 1986).

#### **4.1 Mecanismos de muerte neuronal inducidos por la hipoglucemia**

Una variedad de mecanismos están involucrados en la patogénesis de la muerte neuronal inducida durante la hipoglucemia (Cryer 2007) y la isquemia cerebral (reducción transitoria o permanente del flujo sanguíneo cerebral) (Durukan y Tatlisumak 2007). Se ha propuesto que el daño neuronal asociado con esta condición puede ocurrir por un mecanismo excitotóxico, provocado por la liberación de glutamato, y particularmente de aspartato (Wieloch 1984; Sandberg et al. 1986). También, se ha sugerido que la liberación neuronal de zinc, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), la activación de la poli (ADP-ribosa) polimerasa-1 (PARP-1), la transición de la permeabilidad mitocondrial y la respuesta inflamatoria participan en la muerte neuronal hipoglucémica (Friberg et al. 1998; Suh et al. 2003, 2004, 2007, 2008; Cryer 2007; Páramo et al. 2010; Won et al. 2012). Suh y colaboradores utilizando cultivos neuronales y un modelo *in vivo* de hipoglucemia en ratones, identificaron una secuencia de eventos que conducen a la muerte neuronal después de la hipoglucemia. De acuerdo con este trabajo, la reperfusión de glucosa inicia la producción de óxido nítrico, el cual conduce a la liberación de zinc vesicular. Posteriormente, el zinc entra a las neuronas postsinápticas e induce la producción de superóxido a través de la enzima NADPH oxidasa (NOX). El superóxido producido por la NOX provoca la acumulación de zinc, activación de la PARP-1 y finalmente, la muerte neuronal (Suh et al. 2008). La mitocondria ha sido propuesta como una fuente generadora de ROS en la hipoglucemia y la isquemia-reperfusión. Sin embargo, se han identificado otras fuentes productoras de ROS. Suh y colaboradores (2007) usando cultivos neuronales de corteza y un modelo de hipoglucemia aguda

seguida de la reintroducción de glucosa, encontraron que la producción de superóxido se incrementa por la activación de la NOX durante el periodo de reperfusión de glucosa. Además, utilizando un modelo de AG en neuronas de hipocampo cultivadas, se observó que las ROS incrementan rápidamente durante la AG, de una manera dependiente de la activación de los receptores NMDA y no NMDA y de la presencia de calcio (Páramo et al. 2010). En este trabajo, se observó que la producción de superóxido depende de la activación de las enzimas, fosfolipasa A2 y xantina oxidasa, las cuales se activan por calcio y contribuyen al daño neuronal. También, se observó que la concentración de calcio intracelular se incrementa progresivamente durante el periodo de AG (Páramo et al. 2010), y que se activa la calpaína, una proteasa dependiente de calcio asociada con el daño excitotóxico (Páramo et al. 2013). Además, la salida de calcio del RE posiblemente contribuye a la activación de esta proteasa, ya que bloqueadores de los receptores a inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>R) y a rianodina (RyR), previenen su activación (Páramo et al. 2013). Por otra parte, en un modelo de inhibición glucolítica utilizando cultivos neuronales de hipocampo expuestos a yodoacetato, un inhibidor de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, se observó que la salida de calcio del RE posiblemente, participa en la producción de ROS y en la muerte neuronal. La exposición al yodoacetato, provoca una progresiva disminución en los niveles de energía y así, los mecanismos responsables de la extrusión y el almacén del calcio intracelular están alterados (Hernández-Fonseca et al. 2005). En este trabajo se observó que el quelante de calcio intracelular, BAPTA-AM, y bloqueadores de los IP<sub>3</sub>R y RyR previenen la generación de ROS y aumentan la sobrevivencia celular (Hernández-Fonseca et al. 2005).

## **5. El Retículo endoplásmico**

El RE está formado por endomembranas organizadas en un complejo sistema de microtúbulos y cisternas. En las neuronas, el RE se extiende desde el núcleo y el soma a las dendritas y a través del axón a las terminales presinápticas

(Verkhratsky 2005). De acuerdo a la presencia o ausencia de ribosomas el RE se denomina RE rugoso y liso, respectivamente. El RE juega un papel central en la biosíntesis celular. Su membrana es el lugar de producción de todas las proteínas transmembranales y lípidos de la mayoría de los organelos celulares, incluyendo el propio RE, el aparato de Golgi, los lisosomas, los endosomas, las vesículas secretoras y la membrana plasmática. La membrana del RE, también contribuye de forma importante a la formación de las membranas de las mitocondrias y de los peroxisomas, ya que produce los lípidos de estos organelos. Además, todas las proteínas que serán secretadas al exterior celular y también las que permanecen en el lumen del RE, en el aparato de Golgi o en los lisosomas, son inicialmente transportadas al lumen del RE. El RE es también un organelo que lleva a cabo importantes funciones como el procesamiento de xenobióticos. Algunas de estas reacciones de detoxificación son llevadas a cabo por enzimas de la familia de la citocromo P450, las cuales se encuentran principalmente en el RE liso (Alberts et al. 2014).

## **5.1 El calcio en el retículo endoplásmico**

El calcio es una molécula de señalización que regula una gran variedad de procesos celulares tales como: el metabolismo, la fosforilación y desfosforilación de proteínas, la proliferación y diferenciación celular, la transcripción de genes, la motilidad celular, la contracción-excitación del músculo, la muerte celular programada y la neurotransmisión. Además, el calcio es importante para la translocación, plegamiento, glucosilación y formación de enlaces disulfuro de las proteínas dentro del RE. El calcio interacciona directamente con una variedad de chaperonas moleculares residentes del RE y las funciones de estas chaperonas dependen de las concentraciones de calcio presente en el lumen del RE (Bonilla et al. 2002; Coe y Michalak 2009). Para lograr un balance del flujo de calcio dentro y fuera de la célula se requiere un elaborado sistema que incluye al intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática, la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarco/endoplásmico (SERCA) y la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática.



Estos últimos, usan ATP como fuente de energía para bombear  $\text{Ca}^{2+}$  en contra de un gradiente iónico a través de la membrana. (Krebs et al. 2015). El RE es el principal sitio para el almacenamiento de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro de la célula. La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el lumen del RE es aproximadamente de 500  $\mu\text{M}$ , mientras que, la concentración de este catión en el citoplasma es de aproximadamente 100 nM (Henderson et al. 2015). En respuesta a una variedad de estímulos, el RE libera  $\text{Ca}^{2+}$  del lumen al citosol a través de los canales de los  $\text{IP}_3\text{R}$  y  $\text{RyR}$ . Sin embargo, la mayor parte del  $\text{Ca}^{2+}$  liberado es regresado después al lumen del RE por la acción de la SERCA. El mantenimiento de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro de la célula se logra mediante la acción de chaperonas moleculares, entre las que se encuentran: la calreticulina, GRP78, la proteína regulada por glucosa de 94 kDa (GRP94), la proteína disulfuro isomerasa A6 y las proteínas del RE de 72, 57, 44 y 29 kDa (ERp72, ERp57, ERp44 y ERp29). Tan solo la calreticulina une aproximadamente el 50% del  $\text{Ca}^{2+}$  almacenado en el RE. Por otro lado, GRP94 es una de las proteínas más abundantes en el lumen del RE. Así, debido a la alta presencia y capacidad de unión del  $\text{Ca}^{2+}$ , calreticulina y GRP94 son las proteínas más importantes para el mantenimiento de la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro del lumen del RE (Halperin et al. 2014).

## **6. Estrés del retículo endoplásmico y respuesta a proteínas no plegadas**

El RE es un organelo que regula los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares y también es el principal compartimento subcelular involucrado en la síntesis y plegamiento de las proteínas transmembranales y de las que serán secretadas al exterior celular (Oyadomari y Mori 2004). Para realizar las funciones de plegamiento de proteínas el RE contiene chaperonas moleculares, las cuales facilitan el correcto plegamiento de las proteínas. Muchas de estas chaperonas son dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  y de ATP (Malhotra y Kaufman 2007). También, en el lumen del RE las proteínas son modificadas por glucosilación y por la adición de enlaces disulfuro hasta que éstas alcanzan su estructura terciaria (McCullough et al. 2001). Para que se lleve a cabo la formación de los enlaces disulfuro es necesario que exista

un medio oxidante dentro del lumen del RE (Malhotra y Kaufman 2007). La alteración de la homeostasis del RE puede ser causada por una variedad de factores, tales como: la privación de glucosa, la hipoxia, la depleción de  $\text{Ca}^{2+}$  y el estrés oxidativo (Chen y Gao 2002; Cao y Kaufman 2012). Todos esos procesos pueden inducir la acumulación de proteínas mal plegadas/no plegadas en el lumen del RE debido a que provocan la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  o modifican el medio oxidante dentro del RE o bien, disminuyen los niveles de ATP (Healy et al. 2009). La acumulación de proteínas mal plegadas/no plegadas dentro del lumen del RE es una condición conocida como estrés reticular, el cual conduce a la activación de una respuesta celular adaptativa. La UPR promueve la expansión de la membrana del RE, reduce la síntesis global de proteínas, incrementa la traducción de proteínas chaperonas y aumenta la degradación de proteínas mal plegadas/no plegadas (Paschen y Mengesdorf 2005; Xin et al. 2014). La activación de la UPR conduce principalmente al restablecimiento de las funciones del RE. Sin embargo, si el funcionamiento del RE no puede ser restaurado, la UPR puede inducir muerte celular apoptótica (Chen y Brandizzi 2013). En mamíferos la vía de señalización de la UPR es mediada por tres proteínas transmembranales residentes del RE: la cinasa del retículo endoplásmico similar a PKR (PERK), el factor activador transcripcional 6 (ATF6) y la proteína 1 que requiere inositol (IRE1) (Schröder y Kaufman 2005; Merksamer y Papa 2010). Estas proteínas transmembranales responsables de iniciar la UPR tienen un dominio N-terminal en el lumen del RE y dominio C-terminal en el citosol (Kim et al. 2008). Bajo condiciones normales, cada proteína sensor es mantenida en un estado inactivo a través de su unión, vía su dominio luminal, con la proteína chaperona del RE, GRP78. Cuando las proteínas mal plegadas/no plegadas se acumulan dentro del RE, éstas se unen y atrapan a GRP78 y por lo tanto activan a las proteínas sensores de la UPR (Wang y Kaufman 2012) (Figura 2).

## 6.1 Cinasa del retículo endoplásmico similar a PKR

PERK, es una proteína transmembranal del tipo I localizada en el RE, que tiene actividad de cinasa de serina-treonina (cataliza la fosforilación del grupo hidroxilo de la serina o treonina de ciertas proteínas) en su dominio citoplásmico. La disociación de GRP78 provoca la oligomerización, trans-autofosforilación y activación de PERK. Una vez activada, PERK fosforila la subunidad  $\alpha$  del factor eIF2 (factor de iniciación de la traducción eucariota 2). El factor eIF2 está formado por tres subunidades:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . Este factor se asocia con el guanósín trifosfato (GTP) y el tRNA-metionina iniciador (Met-tRNA) formando el complejo ternario que regula la síntesis de proteínas. Cuando el Met-tRNA es liberado al codón iniciador, el GTP unido al eIF2 es hidrolizado a GDP (guanósín difosfato). Posteriormente, el eIF2-GDP es reciclado a eIF2-GTP por una reacción catalizada por el factor eIF2B. Sin embargo, cuando la subunidad  $\alpha$  de eIF2 es fosforilada, por ejemplo por la cinasa PERK, p-eIF2 $\alpha$  inhibe la actividad de reciclamiento de eIF2B y como consecuencia, no se puede formar el complejo ternario y se inhibe la traducción de proteínas (Wek et al. 2006; Roussel et al. 2013). Existen otras tres cinasas que comparten homología con el dominio catalítico de PERK y pueden fosforilar a eIF2 $\alpha$  bajo ciertas condiciones de estrés: PKR, que se activa en presencia de RNA de doble cadena, principalmente ante las infecciones de virus; GCN2 y HRI que son activadas cuando las células son privadas de aminoácidos o por deficiencia de hierro intracelular, respectivamente (Ron 2002; Back y Kaufman 2012). La fosforilación de eIF2 $\alpha$ , causa una inhibición global de la síntesis de proteínas. Sin embargo, esta inhibición de la traducción no es absoluta, RNAs mensajeros que tienen marcos abiertos de lectura río arriba (uORFs) en su extremo 5' no traducido, pueden evitar el bloqueo de la traducción. Frecuentemente, la traducción de los uORFs inhibe la traducción del mRNA bajo condiciones normales. Sin embargo, cuando hay niveles bajos del complejo ternario, debido a la fosforilación de eIF2 $\alpha$ , el barrido ineficiente del ribosoma altera los patrones de inicio de la traducción. Así, los sitios de inicio de los uORFs son ineficientemente detectados, favoreciendo el barrido del ribosoma y el reconocimiento del codón

AUG, el cual es el inicio del marco abierto de lectura (ORF) del mRNA y de este modo, se promueve su traducción (Cullinan y Diehl 2006). El más estudiado de esos genes es ATF4, el cual codifica para un factor de transcripción que se une a genes que contienen en su promotor una secuencia conocida como “elemento de respuesta a AMPc” (CRE) (Szegezdi et al. 2006). ATF4 induce la transcripción de genes que codifican chaperonas del RE, incluyendo GRP78 y GRP94, factores de transcripción asociados con la UPR, incluyendo XBP1 (proteína 1 de unión a la caja X) (Cao y Kaufman 2012). ATF4 también regula la expresión de genes que codifican proteínas involucradas en el transporte de aminoácidos, biosíntesis de glutatión y resistencia al estrés oxidativo (Harding et al. 2003). La expresión de esos genes restaura la homeostasis del RE y promueve la supervivencia celular. Sin embargo, en condiciones de estrés reticular severo o persistente, ATF4 contribuye a la inducción de muerte celular controlando la transcripción de factores pro-apoptóticos, tales como, CHOP (Zinszner et al. 1998; Mercado et al. 2013) (Figura3). CHOP induce la transcripción de varios genes pro-apoptóticos, pero también induce la transcripción de GADD34 (gen 34 inducible por daño al ADN y detención del crecimiento), el cual codifica para la subunidad reguladora de la proteína fosfatasa 1 que desfosforila eIF2 $\alpha$ , revirtiendo la inhibición de la traducción (Novoa et al. 2001). Así, la vía de PERK primero genera respuestas de pro-supervivencia, las cuales cambian a respuestas pro-apoptóticas cuando el estrés reticular es severo o prolongado (Gardner et al. 2013).

## **6.2 Factor activador transcripcional 6**

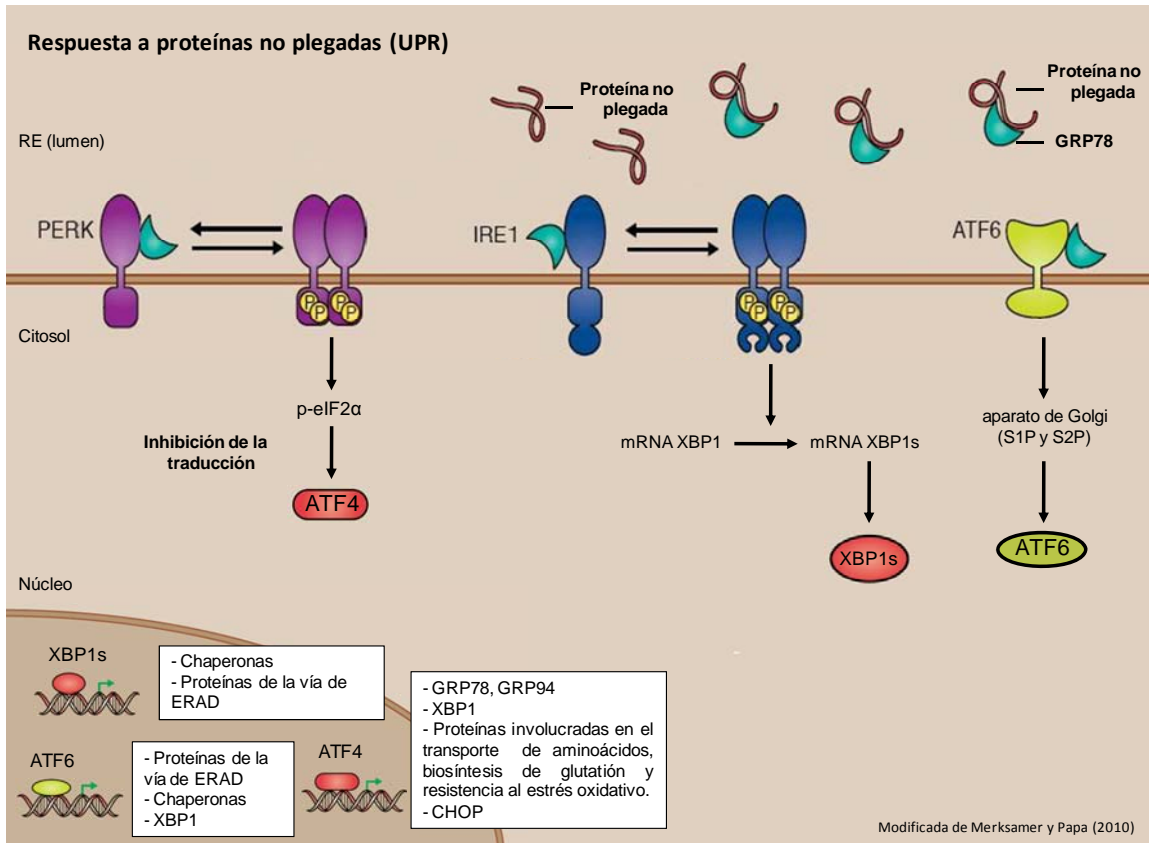
ATF6 es una proteína transmembranal del tipo II localizada en el RE. La porción citoplásmica de ATF6 tiene un dominio básico de cierre de leucina (Rasheva y Domingos 2009). Durante el estrés reticular, GRP78 se disocia del dominio luminal de ATF6 desenmascarando las secuencias de localización al Golgi, las cuales promueven su translocación y activación (Shen et al. 2005). ATF6 (90 kDa) es transportado al aparato de Golgi por vía vesicular, donde es secuencialmente cortado por las proteasas de sitio-1 y sitio-2 (S1P y S2P) a

través, de un proceso llamado proteólisis intramembrana regulado (Ye et al. 2000). Primero S1P corta en el dominio luminal de ATF6, después S2P en el dominio transmembrana, finalmente, liberando el dominio factor de transcripción citosólico (Shen et al. 2005). El fragmento citosólico activado de ATF6 (50 kDa) es transportado al núcleo donde regula la expresión de genes que contienen en su promotor secuencias CRE y ERSE (elemento de respuesta a estrés del RE). ATF6 inicia la transcripción de genes que codifican para componentes de la vía de degradación asociada al RE (ERAD), tales como, EDEM1 (proteína 1 similar a  $\alpha$ -manosidasa que aumenta la degradación del RE), HERP (proteína del RE inducida por homocisteína) y HRD1 (proteína ubiquitina ligasa E3); proteínas chaperonas, tales como GRP78, GRP94, proteína disulfuro isomerasa, calnexina y el factor de transcripción XBP1 (Oyadomari y Mori 2004; Chakrabarti et al. 2011; Cao y Kaufman 2012) (Figura 3). ATF6 regula la expresión de genes involucrados principalmente en la adaptación al estrés reticular y genes relacionados con pro-supervivencia. Sin embargo, si la célula es incapaz de restaurar la homeostasis del RE y su habilidad para plegar proteínas; esta vía puede también inducir genes pro-apoptóticos (Carrara et al. 2013). Por ejemplo ATF6 incrementa los niveles de CHOP durante el estrés reticular sostenido (Logue et al. 2013).

### **6.3 Proteína 1 que requiere inositol**

IRE1 es una proteína transmembranal del tipo I que tiene un dominio cinasa de serina-treonina y un dominio de endoribonucleasa (RNAsa) en su porción citosólica. Dos modelos han sido propuestos para explicar la activación de IRE1. El primero es un modelo de unión competitiva que propone que las proteínas no plegadas/mal plegadas en el lumen del RE compiten con IRE1 para unirse a la chaperona GRP78. El otro modelo, propone que las proteínas no plegadas/mal plegadas directamente se unen al dominio de unión a péptidos presente en el dominio luminal de IRE1 para inducir su dimerización, oligomerización y trans-autofosforilación, lo cual conduce a un cambio conformacional que activa su dominio de RNAsa (Cao y Kaufman 2012). IRE1 activado procesa el mRNA que

codifica el factor de transcripción XBP1, cortando un intrón de 26 nucleótidos que cambia el marco de lectura de este mRNA. Esto resulta en la expresión de un factor de transcripción estable y activo, llamado XBP1s (XBP1 procesado) (Hertz 2012). XBP1s se transloca al núcleo y se une a secuencias ERSE y UPRE (elemento de respuesta a proteínas no plegadas), para activar la expresión de genes que codifican chaperonas moleculares residentes del RE, componentes de la vía de ERAD y genes para la biosíntesis de fosfolípidos (Yoshida et al. 2001, Calfon et al. 2002; Lee et al. 2002; Parmar y Schröder 2012) (Figura 3). IRE1 también degrada RNAs mensajeros específicos que codifican para proteínas de la vía secretora, en un proceso llamado degradación dependiente de IRE1 (RIDD). RIDD puede servir como un mecanismo adicional a la UPR para limitar la traducción de proteínas previniendo la sobrecarga del RE (Carrara et al. 2013). Así, las señales iniciadas desde el dominio cinasa citosólico de IRE1 son en gran parte pro-apoptóticas involucrando la vía de la cinasa N-terminal c-Jun (JNK) y la activación de caspasa-12 (Chakrabarti et al. 2011).



**Fig. 3** UPR. Cuando las proteínas mal plegadas/no plegadas se acumulan dentro del RE, éstas se unen y atrapan a GRP78, de esta forma activando a las proteínas sensores de la UPR: PERK, IRE1 y ATF6. PERK activado bloquea la síntesis de proteínas por fosforilación de la subunidad  $\alpha$  del factor eIF2. Sin embargo, esta fosforilación también permite la traducción del RNAs mensajeros que contienen uORFs en su extremo 5' no traducido, entre los que se encuentran ATF4. ATF4 es un factor de transcripción que se transloca al núcleo e induce la transcripción de genes que codifican chaperonas del RE, incluyendo GRP78 y GRP94, factores de transcripción asociados con la UPR, incluyendo XBP1. ATF4 también regula la transcripción de proteínas involucradas en el transporte de aminoácidos, biosíntesis de glutatión, resistencia al estrés oxidativo y factores pro-apoptóticos, tales como, CHOP. IRE1 activado procesa el mRNA que codifica el factor de transcripción XBP1. XBP1s controla la transcripción de chaperonas y proteínas de la vía de ERAD. Después de la disociación de GRP78, ATF6 es transportado al aparato de Golgi donde es cortado y activado por S1P y S2P. ATF6 es un factor de transcripción que regula la expresión de proteínas de la vía de ERAD, proteínas chaperonas y del factor de transcripción XBP1.

## 7. Estrés reticular y apoptosis

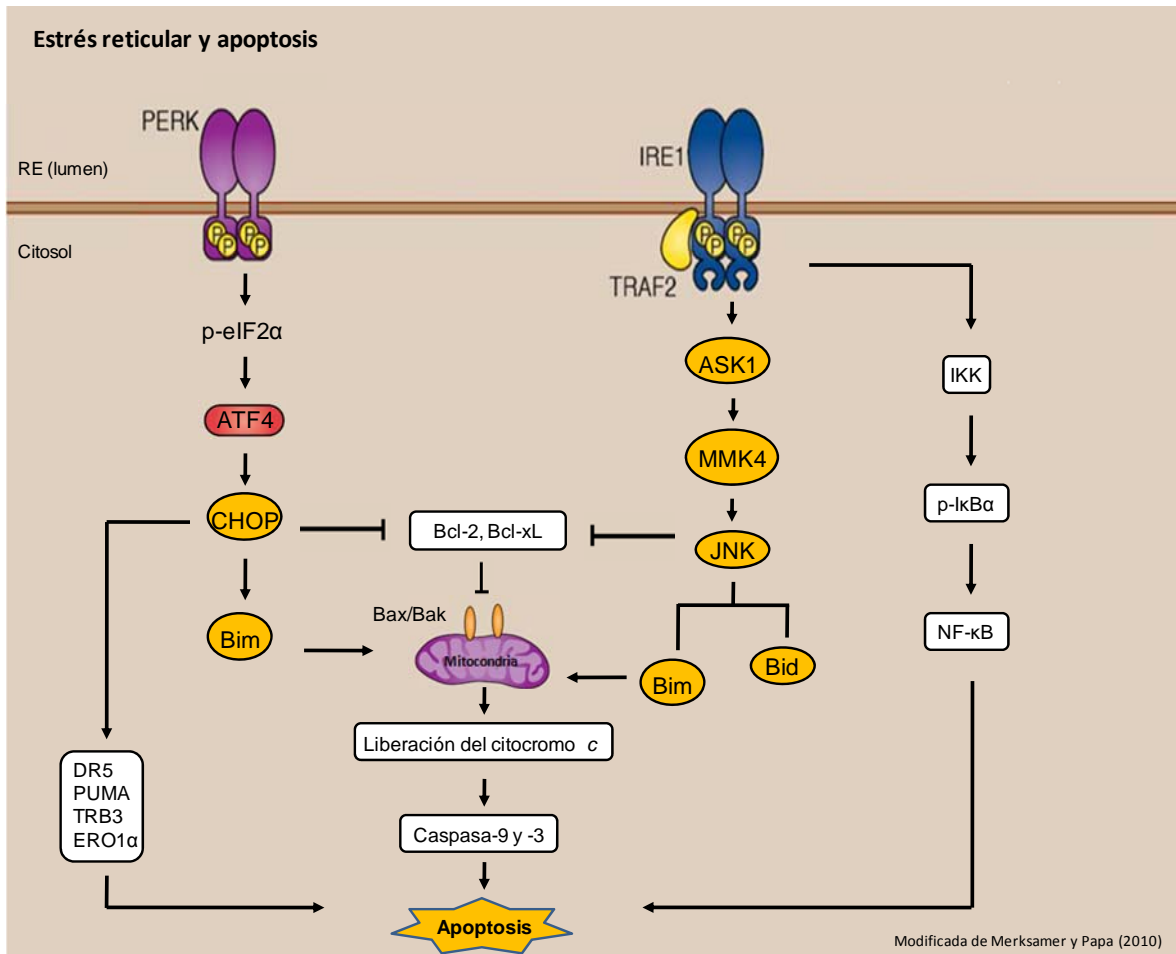
La apoptosis es una forma de muerte celular evolutivamente conservada, presente desde nemátodos hasta mamíferos. La apoptosis involucra el desmantelamiento controlado de componentes intracelulares, mientras que las células son rápidamente fagocitadas y eliminadas sin la iniciación de una

respuesta inflamatoria (Thornberry y Lazebnik 1998; McIlwain et al. 2013; Creagh 2014). El proceso de apoptosis involucra la activación secuencial de caspasas. Las caspasas son un grupo de proteínas que pertenecen al grupo de las cisteín-proteasas, caracterizadas por presentar un residuo de cisteína en su centro catalítico. Las caspasas cortan específicamente después de un residuo de ácido aspártico (Jordán et al. 2000; Parrish et al. 2013). Estas proteasas son sintetizadas dentro de la célula como zimógenos inactivos conocidos como procaspasas. Las procaspasas son sintetizadas como una cadena polipeptídica sencilla de 32-55 kDa (Chowdhury et al. 2008). Las caspasas apoptóticas han sido subdivididas en caspasas iniciadoras y efectoras, considerando su secuencia de activación, su papel en la apoptosis y la longitud de sus prodominios (Shalini et al. 2014). Las caspasas iniciadoras (caspasa-2, -8, -9 y -10) tienen prodominios N-terminal largos y son, en su mayoría monómeros. Este grupo de enzimas es activado a través de proximidad inducida, cuando las proteínas adaptadoras interactúan con su prodominio y promueven la dimerización de caspasas por reclutamiento dentro de complejos de señalización oligoméricos (Park 2012; Parrish et al. 2013). En contraste, las caspasas efectoras (caspasa-3, -6 y -7) tienen prodominios cortos y existen en la célula como homodímeros preformados, pero inactivos, los cuales son usualmente convertidos en enzimas activas después del procesamiento proteolítico realizado por una caspasa iniciadora (Thornberry et al. 1998). Hay dos vías para la activación de caspasas iniciadoras: la vía mediada por receptores de muerte (vía extrínseca) y la vía mediada por la mitocondria (vía intrínseca) (Chowdhury et al. 2008). Esta última vía, se ha relacionado directamente con la muerte inducida por estrés reticular. Las tres vías de la UPR contribuyen a inducir apoptosis cuando los cambios generados en la célula son insuficientes para restaurar el funcionamiento del RE. La proteína CHOP, la cinasa JNK y las caspasas han sido involucradas en la activación de la apoptosis en respuesta al estrés reticular (Lai et al. 2007). CHOP es un factor de transcripción que pertenece a la familia de proteínas que se unen al potenciador CCAAT. CHOP fue originalmente identificado en respuesta al daño al ADN, pero su inducción es más sensible a condiciones de estrés reticular (Zinszner et al. 1998). Durante el



estrés reticular prolongado, las tres vías de señalización de la UPR inducen la transcripción de CHOP. Sin embargo, la vía de PERK-eIF2 $\alpha$ -ATF4 es esencial (Oyadomari y Mori 2004; Szegezdi et al. 2006; Lai et al. 2007). CHOP promueve la apoptosis por regulación a la baja de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 (linfoma 2 de células B), mientras que incrementa la expresión de factores pro-apoptóticos, tales como DR5 (receptor de muerte 5), PUMA (modulador de apoptosis sobrerregulado por p53), TRB3 (homólogo de la proteína tribbles 3), ERO1 $\alpha$  (oxidoreductasa del RE) y Bim (mediador de muerte celular que interactúa con Bcl-2) (McCullough et al. 2001; Reimertz et al. 2003; Cao y Kaufman 2012; Logue et al. 2013) (Figura 4). Otra vía de señalización que opera en paralelo con CHOP está mediada por la cinasa JNK. La señalización de JNK incrementa durante el estrés reticular de una manera que depende de la activación de IRE1 (Merksamer y Papa 2010). La fosforilación de IRE1 en el dominio citosólico estimula su interacción con el factor 2 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral (TRAF2). El complejo IRE1-TRAF2 recluta y activa a la cinasa 1 reguladora de la señal de apoptosis (ASK1) (Cao y Kaufman 2012). ASK1 fosforila y activa dos cinasas río abajo MMK4 y MMK3, que a su vez, activan JNK y MAP cinasa p38, respectivamente. Una vez activada, JNK modula por fosforilación la función de varios miembros de la familia Bcl-2. JNK inhibe la actividad de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-xL (linfoma de células B extra grande), mientras que activa proteínas pro-apoptóticas tales como, Bid (agonista letal que interacciona mediante dominios BH3) y Bim. Después de la fosforilación mediada por JNK, Bim se transloca a la membrana mitocondrial externa, donde promueve la liberación de citocromo c y la activación de caspasas. Finalmente, la inhibición de Bcl-2 y la activación de Bim conducen a la apoptosis dependiente de Bax (proteína X asociada con Bcl-2)/Bak (proteína killer antagonista homóloga a Bcl-2) (Figura 4). Además, el complejo IRE1-TRAF2 también recluta a la cinasa I $\kappa$ B (IKK) donde es fosforilada y activada. IKK activada fosforila al inhibidor del factor nuclear- $\kappa$ B alpha (I $\kappa$ B $\alpha$ ) que resulta en la disociación de I $\kappa$ B $\alpha$  de NF- $\kappa$ B (factor nuclear- $\kappa$ B) por lo tanto activando la vía de NF- $\kappa$ B, lo cual conduce a muerte celular (Urra et al. 2013) (Figura 4). Además de la inducción de CHOP y la activación de la cinasa JNK; uno de los mecanismos por

los cuales el estrés reticular contribuye a la muerte celular es a través, de la activación de la caspasa-12 (Rao et al. 2004; Kosuge et al. 2008).



**Fig. 4** El estrés reticular y la inducción de apoptosis. La activación de PERK induce la fosforilación de eIF2 $\alpha$ , provocando una inhibición de la síntesis de proteínas. Sin embargo, bajo estas condiciones se promueve la traducción de ATF4. Este factor de transcripción induce la expresión de CHOP. CHOP promueve la apoptosis por regulación a la baja de la proteína anti-apoptótica Bcl-2, mientras que incrementa la expresión de factores pro-apoptóticos, tales como DR5, PUMA, TRB3, ERO1 $\alpha$  y Bim. Por otro lado, la fosforilación de IRE1 estimula su interacción con TRAF2. El complejo IRE1-TRAF2 activa ASK1. ASK1 fosforila y activa a la cinasa MMK4, que a su vez, activa JNK. Una vez activada, JNK fosforila e inhibe la actividad de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-xL, mientras que fosforila y activa proteínas pro-apoptóticas tales como, Bid y Bim. Después de la fosforilación mediada por JNK, Bim se transloca a la membrana mitocondrial externa y junto con Bax/Bak promueven la liberación de citocromo c y la activación de la caspasa-9 y -3 promoviendo la muerte celular apoptótica. El complejo IRE1-TRAF2 también recluta a IKK donde es fosforilada y activada. IKK activada fosforila a I $\kappa$ B $\alpha$  que resulta en la activación de la vía de NF- $\kappa$ B, lo que finalmente provoca muerte neuronal apoptótica.

## 7.1 Activación de caspasa-12 por inducción de estrés reticular

La caspasa-12 (~55 kDa), se localiza principalmente en el lado citoplásmico RE y es activada específicamente durante el estrés reticular, y no por señales apoptóticas mediadas por la mitocondria o por los receptores de muerte (Szegezdi et al. 2006; Lai et al. 2007). El estrés reticular induce el corte y la translocación de la caspasa-12 activa (42 kDa) del RE al citoplasma (Nagata et al. 2007). En el citoplasma, la caspasa-12 activa, puede activar a la caspasa-9 y -3 (Morishima et al. 2002). La caspasa-12 es convertida en una enzima activa después del corte por otras proteasas, tales como la calpaína y la caspasa-7. La calpaína, es una proteasa citoplásmica activada en respuesta al calcio liberado del RE durante el estrés reticular, que corta a la caspasa-12 en sus fragmentos activos (Nakagawa y Yuan 2000; Martínez et al. 2010; García de la Cadena et al. 2014). Además, la caspasa-12 puede ser cortada por caspasa-7 (Rao et al. 2001; Martínez et al. 2010; García de la Cadena et al. 2014). El estrés reticular conduce al reclutamiento de la caspasa-7 a la superficie del RE. La caspasa-7, forma un complejo con caspasa-12 y GRP78, y esta interacción resulta en el corte de caspasa-12 mediado por caspasa-7 (Rao et al. 2001; Heath-Engel et al. 2008). GRP78 existe como una proteína del lumen del RE, pero también, se encuentra en el citosol unida a caspasa-7, en un complejo que suprime la activación de esta caspasa (Reddy et al. 2003). Sin embargo, el mecanismo por el cual la caspasa-7 es reclutada al RE y activada durante el estrés reticular continúa sin ser determinado. Por otro lado, la caspasa-12 es capaz de procesarse autolíticamente después de su homodimerización, una actividad promovida por la activación de IRE1 (Roy et al. 2008). Bajo condiciones basales, TRAF2 forma un complejo estable con la caspasa-12. Sin embargo, el estrés reticular induce la disociación de la caspasa-12 de TRAF2, promoviendo la dimerización de esta caspasa, que eventualmente provoca su activación (Yoneda et al. 2001). La caspasa-12 activa funciona como una caspasa inductora, iniciando el reclutamiento secuencial de la caspasa-9 y -3 de una manera independiente de Apaf-1/citocromo c (Morishima et al. 2002), aunque ha sido también sugerido, que la actividad catalítica de la

caspa-12 es limitada a su autoprocesamiento (Fujita et al. 2002; Roy et al. 2008). La apoptosis inducida después del estrés reticular y la activación de caspa-12 ha sido sugerida como uno de los mecanismos involucrados en la muerte neuronal inducida por enfermedades neurodegenerativas crónicas y agudas, incluyendo: esclerosis lateral amiotrófica (Wootz et al. 2004; Oh et al. 2008; Vijayalakshmi et al. 2011), enfermedad de Alzheimer (Nakagawa et al. 2000; Fonseca et al. 2013; Kang et al. 2013), enfermedad de Huntington (Kouroku et al. 2002; Reijonen et al. 2008, Jiang et al. 2012) y enfermedad de Parkinson (Chun et al. 2001; Zeng et al. 2014). Además, el estrés reticular y la activación de la caspa-12 tienen un importante papel en la patogénesis del daño neuronal provocado por la isquemia cerebral (DeGracia et al. 2002).

## **8. Estrés reticular y caspa-12 en la muerte neuronal inducida por la isquemia cerebral**

La isquemia cerebral es la consecuencia de una reducción transitoria o permanente en el flujo sanguíneo cerebral (CBF) que es restringido al territorio de una arteria cerebral principal. La reducción en el flujo, es en la mayoría de los casos, causado por la oclusión de una arteria cerebral provocada por un émbolo o por una trombosis local (Dirnagl et al. 1999). Cuando el CBF disminuye, dos áreas de daño neuronal son generadas: el núcleo isquémico, donde el flujo sanguíneo es más severamente restringido y las neuronas mueren principalmente por necrosis, y la zona de penumbra, adyacente al núcleo isquémico, donde la irrigación colateral existe y las células pueden permanecer viables por un periodo de tiempo variable. Sin embargo, si el flujo sanguíneo no es restaurado, la muerte celular ocurre vía mecanismos tales como la apoptosis y la inflamación (Camacho y Massieu 2006; Doyle et al. 2008). El daño cerebral isquémico depende de la severidad y duración de la reducción del CBF. Los principales mecanismos involucrados en el daño cerebral isquémico incluyen: excitotoxicidad inducida por la estimulación de los receptores de glutamato, despolarizaciones peri-infarto, estrés oxidativo y apoptosis (Dirnagl et al. 1999; Durukan y Tatlisumak 2007;

Doyle et al. 2008). El papel de la vía intrínseca de la apoptosis en la muerte neuronal isquémica es bien conocido. La translocación del citocromo *c* de la mitocondria al citosol y la activación de la caspasa-3 han sido observados después de la isquemia cerebral focal o global en ratas (Broughton et al. 2009; Peng et al. 2011; Espinosa-García et al. 2013; Wen et al. 2015).

Por otro lado, varios estudios han mostrado que la caspasa-12 es cortada después de la isquemia cerebral focal permanente o transitoria. Además, la activación de esta caspasa, correlaciona con un incremento en la expresión de marcadores de la vía de PERK e IRE1 de la UPR durante la reperfusión isquémica. En un estudio en ratas sujetas a la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) permanente, se observó un incremento en la expresión del mRNA de la procaspasa-12. Además, se detectó el fragmento activo de la caspasa-12 en el núcleo isquémico 24 h después de la isquemia (Mouw et al. 2003). De igual forma, en el modelo de isquemia/reperfusión (I/R) de MCAO, se observó un marcado incremento en la expresión de GRP78, ATF4 y CHOP desde las 3 y hasta las 24 h después de la reperfusión. En este trabajo, también se observó un incremento en el procesamiento del mRNA de *xbp1* después de la I/R en las regiones del cerebro afectadas, estriado y corteza (Nakka et al. 2010). El incremento en los marcadores de estrés reticular correlacionó con la expresión aumentada del mRNA de la caspasa-12 en el núcleo isquémico 24 h después de la isquemia (Nakka et al. 2010).

Por otro lado, el salubrinal, un compuesto que inhibe la desfosforilación de eIF2 $\alpha$  y mantiene la supresión de la síntesis de proteínas contrarrestando el estrés reticular (Boyce et al. 2005), reduce el volumen del infarto isquémico, soportando el papel de la vía de PERK de la UPR en la muerte neuronal isquémica (Nakka et al. 2010). El efecto del salubrinal en la sobreexpresión o procesamiento de la caspasa-12 no fue reportado en el estudio de Nakka y colaboradores (2010). Sin embargo, se ha observado que el tratamiento con salubrinal reduce el corte de la caspasa-12 y reduce el daño neuronal inducido por el agonista del receptor de glutamato ácido kaínico en neuronas de hipocampo *in vivo* y *in vitro*. El efecto del

salubrinal es mediado vía la inhibición de estrés reticular, como se sugirió por su efecto en la caspasa-12, caspasa-3 y GRP78 (Sokka et al. 2007).

Shibata y colaboradores (2003) también reportaron en el modelo de MCAO transitoria en ratones, el corte de la caspasa-12 en su fragmento activo desde las 5 y hasta las 23 h después de la reperusión seguida de 1 h de isquemia. El procesamiento de caspasa-12 correlacionó con la sobreexpresión de GRP78 y la presencia de células apoptóticas. Similares resultados fueron reportados en el cerebro de conejos 6 h y 3 días después de 2 h de MCAO transitoria (Liu et al. 2009). Por otro lado, Zhu y colaboradores (2012) observaron en el mismo modelo expresión incrementada de JNK fosforilada (p-JNK), CHOP y caspasa-12 desde las 6 y hasta las 72 h después de la reperusión. Además, la administración de un inhibidor de la fosforilación de JNK reduce los niveles de p-JNK y caspasa-12 sugiriendo la contribución de la vía de IRE1 a la activación de la caspasa-12. La expresión incrementada y el corte de la caspasa-12 han sido también observados después del daño traumático al cerebro en el hipocampo y la corteza de rata, lo cual correlaciona con el daño neuronal (Larner et al. 2004).

Otros estudios han demostrado únicamente el incremento en los marcadores de la UPR después de la isquemia cerebral focal o global, aunque la activación de la caspasa-12 no ha sido determinada. La expresión incrementada del mRNA de CHOP ha sido observada en el hipocampo de ratas después de la isquemia cerebral global usando el modelo de oclusión de los cuatro vasos (Paschen et al. 1998), así como también en el estriado e hipocampo de ratones después de la oclusión de la arteria carótida común bilateral (Tajiri et al. 2004). También se ha observado un aumento en los niveles del p-eIF2 $\alpha$  después de la oclusión de la arteria carótida común bilateral en ratones (Kumar et al. 2001). Además, niveles incrementados de ATF4 y CHOP fueron observados en el hipocampo de ratas después de la isquemia global transitoria y en el estriado de ratones después de la isquemia focal (Hayashi et al. 2005). Asimismo, marcadores de la vía de PERK de la UPR se mantuvieron elevados en la corteza después de la isquemia permanente en ratones (Morimoto et al. 2007). En conjunto, los estudios descritos arriba sugieren la inducción de la UPR como un mecanismo de

daño cerebral isquémico, e indican que una expresión y procesamiento incrementado de la caspasa-12 correlaciona con el estrés reticular y la muerte neuronal subsecuente a la isquemia. Sin embargo, no existe evidencia *in vivo* que demuestre la reducción del infarto isquémico por una inhibición directa de la caspasa-12.

## **9. Estrés reticular y caspasa-12 en la muerte neuronal inducida por la privación de oxígeno y glucosa**

La activación de la caspasa-12 y la inducción de apoptosis han sido observadas en modelos de isquemia celular usando neuronas cultivadas expuestas a la privación de oxígeno y glucosa (OGD). Un estudio pionero de Nakagawa y Yuan (2000) reportó el corte de la caspasa-12 en células gliales cultivadas expuestas a OGD, lo cual fue acompañado por la sobreexpresión de GRP78 y GRP94, sugiriendo que la activación de la caspasa-12 es una consecuencia del estrés reticular. Además, los autores reportaron que la calpaína, pero no las caspasas, median el procesamiento de la caspasa-12. También, observaron que la inhibición de la calpaína rescata a las células del daño inducido por OGD. Por otra parte, estos autores demostraron que el fragmento de 35 kDa de la caspasa-12, producto de la ruptura mediada por la calpaína, es activo. Este fragmento de 35 kDa da lugar por autoprosesamiento a dos fragmentos más pequeños. Además, la transfección del fragmento de 35 kDa de la caspasa-12 promovió la muerte celular en una línea celular de fibroblastos de rata sugiriendo su contribución a la apoptosis. El procesamiento de caspasa-12 mediado por calpaína fue también observado después de la exposición a taspigargina, sugiriendo que el estrés reticular provocado por la alteración de la homeostasis de calcio conduce a la activación de calpaína y el subsecuente corte de la caspasa-12 (Nakagawa y Yuan 2000).

Niveles elevados de los marcadores de estrés reticular de la vía de PERK e IRE1 han sido observados en neuronas y astrocitos cultivados expuestos a OGD. Badiola y colaboradores (2011) reportan en neuronas corticales cultivadas el corte

de caspasa-12 después de 12 a 24 h de reintroducción de oxígeno y glucosa. El corte de la caspasa-12 correlaciona con los niveles incrementados de marcadores de la vía de PERK y de IRE1, y en concordancia con Nakagawa y Yuan (2000), el procesamiento de caspasa-12 es dependiente de la actividad de calpaína provocada después de la estimulación de los receptores NMDA (Badiola et al. 2011). Similarmente, Chen y colaboradores (2008) utilizando neuronas corticales cultivadas, reportaron un incremento en p-eIF2 $\alpha$  y en el procesamiento de caspasa-12 después de la liberación de calcio del RE por la estimulación del IP<sub>3</sub>R inmediatamente después de la OGD. La activación de la vía de PERK y el subsecuente corte de caspasa-12 fue también observado en astrocitos de la médula espinal después de la exposición a la privación de oxígeno, glucosa y suero (OGSD) (Zhang et al. 2010). En células gliales cultivadas expuestas a OGD el procesamiento de la caspasa-12 fue demostrado, en contraste a la privación de oxígeno, la cual no induce la activación de la caspasa-12 (Nakagawa y Yuan 2000).

En conjunto, las observaciones descritas arriba demuestran que las vías de PERK e IRE1 de la UPR son activadas durante la OGD en neuronas y células gliales cultivadas y en modelos *in vivo* de isquemia. Sin embargo, el papel de la activación de la caspasa-12 y el estrés reticular en el daño hipoglucémico no ha sido reportado. Por lo tanto, en este estudio investigamos si la AG en neuronas hipocampales cultivadas, un modelo celular de daño hipoglucémico, conduce a estrés reticular y apoptosis dependiente de caspasa-12.



### **III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Datos previos de nuestro laboratorio sugieren que el aumento en la concentración de calcio intracelular contribuye a la muerte neuronal inducida por la AG, y que este catión participa en la producción de ROS y en la activación de proteasas como la calpaína (Páramo et al. 2010, 2013). Sin embargo, se desconoce si en el modelo de AG la salida de calcio del RE contribuye a la pérdida de la homeostasis de dicho organelo y si el estrés reticular que desencadena puede contribuir a la muerte neuronal apoptótica inducida en estas condiciones. La tesis se centró en la identificación de la vía de PERK de la UPR.

#### **IV. HIPÓTESIS**

La AG inducida en neuronas de hipocampo cultivadas producirá un incremento en la concentración intracelular de calcio desencadenando estrés reticular y activación de la vía de PERK de la UPR y de la caspasa-12 y esto contribuirá a la muerte neuronal apoptótica inducida en esta condición.

## **V. OBJETIVO GENERAL**

- Definir si el estrés reticular y la activación de la caspasa-12 participan en la muerte neuronal inducida por la AG en neuronas de hipocampo cultivadas.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Demostrar que la AG induce muerte apoptótica de las neuronas cultivadas de hipocampo.
- Evaluar la presencia del estrés reticular iniciado por la activación de la vía de PERK, a través del monitoreo de los marcadores: p-eIF2 $\alpha$ , ATF4, CHOP y GRP78 durante la AG en neuronas hipocampales cultivadas.
- Evaluar la participación de la caspasa-12 en la muerte neuronal inducida por la AG en neuronas cultivadas de hipocampo.
- Evaluar si el procesamiento y la activación de caspasa-12 está mediado por la caspasa-7 o la calpaína, durante la AG en neuronas de hipocampo cultivadas.

## VI. MÉTODOS

### 1. Cultivo de células

Los cultivos primarios de neuronas de hipocampo fueron preparados a partir de embriones de ratas Wistar de 17-18 días de gestación. Después de la disección de 10-12 fetos, los hipocampos de ambos hemisferios cerebrales fueron obtenidos y cortados en cubos de 300  $\mu\text{m}$  en un Chopper, incubados en una solución de tripsina al 0.25 % y dispersados por trituración en una solución con DNAsa e inhibidor de tripsina (7000 unidades BAEE/mg) al 0.08 % y 0.52 %, respectivamente. Las células fueron suspendidas en un medio de cultivo Neurobasal (Gibco, Rockville, MD, USA) suplementado con B27 (Gibco, Rockville, MD, USA), L-glutamina 0.5 mM y gentamicina 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Sigma RBI, St. Louis, MO, USA). Los ensayos de viabilidad celular, determinación de actividad de la caspasa-3 y detección de células apoptóticas (tinción con Hoechst), se realizaron en células sembradas a una densidad de  $1.5 \times 10^6$  células/ml en cajas Costar de 24 pozos (Cambridge, MA, USA). El ensayo de TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) se llevó a cabo en células sembradas en cajas Costar de 12 pozos (Cambridge, MA, USA). La actividad de la caspasa-12 y la detección de proteínas por inmunoblot se evaluaron en células sembradas a la misma densidad, pero en cajas Corning de 35 mm (Corning, NY, USA). En todos los casos las cajas fueron previamente cubiertas con poli-L-lisina 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Sigma RBI, St. Louis, MO, USA). Las células fueron cultivadas por 7 días *in vitro* a 37°C en una incubadora con 5 %  $\text{CO}_2$ /95 % aire. Cuatro días después de sembrar las células, se agregó medio Neurobasal fresco, glucosa 5 mM y citosina arabinosa (10  $\mu\text{M}$ , Sigma RBI, St. Louis, MO, USA). La citosina se agregó para inhibir la proliferación de las células gliales.

## **2. Determinación de viabilidad celular**

Los cultivos fueron expuestos a un medio sin glucosa (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM, Gibco, Rockville, MD, USA) durante 2 h. Inmediatamente después, el medio DMEM fue sustituido por el medio que contenía glucosa (reintroducción de glucosa, RG) que previamente se había retirado de cada pozo y las células se dejaron recuperar por 22 h. La viabilidad celular fue evaluada por el ensayo de reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Sigma RBI, St. Louis, MO, USA). La reducción del MTT es un método comúnmente usado como un índice del estado funcional de la cadena respiratoria, a partir de la formación de la sal de formazán. Esta reducción ocurre por las deshidrogenasas mitocondriales activas, es decir, en las células viables. La disminución en la formación de formazán es un índice de la pérdida de la actividad mitocondrial y por lo tanto del daño celular. La sal de formazán generada se cuantifica espectrofotométricamente utilizando un solvente orgánico para su extracción. Después de la recuperación, las células fueron incubadas con MTT 150  $\mu$ M durante 1 h a 37°C en una incubadora con 5 % CO<sub>2</sub>/95 % aire. El medio fue aspirado y el formazán precipitado fue solubilizado en 800  $\mu$ l de isopropanol ácido y cuantificado espectrofotométricamente a una longitud de onda de 570 nm en un espectrofotómetro DU730 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Los resultados son expresados como el porcentaje de reducción de MTT relativo al control.

## **3. Detección de apoptosis**

La morfología nuclear se analizó por la tinción con Hoechst y se contó el número de núcleos condensados y fragmentados. Por otro lado, la presencia de extremos 3'OH libres, característicos del corte del DNA durante la apoptosis fueron detectados por el ensayo de TUNEL, 22 h después de exponer los cultivos a un medio sin glucosa durante 2 h. Para la tinción con Hoechst, las células se lavaron dos veces con 500  $\mu$ l de buffer salino de fosfatos Dulbecco's (D-PBS) y se

agregaron 250  $\mu$ l/pozo de Hoechst 33258 (0.018 mM, Sigma RBI, St. Louis, MO, USA) durante 15 min protegiendo de la luz. Después de retirar el Hoechst, las células fueron lavadas nuevamente con D-PBS, fijadas con 300  $\mu$ l de formaldehído frío al 3.7 % durante 10 min y colocadas en portaobjetos. Para el ensayo de TUNEL (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), las células se lavaron dos veces con 1 ml de buffer salino de fosfatos (PBS) y se fijaron con 500  $\mu$ l de paraformaldehído frío al 4 % durante 1 h a temperatura ambiente. Después, las células fueron lavadas con PBS e incubadas en 500  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3 % en metanol durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se lavaron nuevamente con PBS y se permeabilizaron con 300  $\mu$ l de triton X-100 al 0.1 % y citrato de sodio al 0.1 % por 2 min a 4°C. Después de dos lavados más con PBS, las células se incubaron con 20  $\mu$ l de la mezcla de reacción de TUNEL que contenía: la enzima deoxinucleotidil transferasa terminal y los desoxirribonucleótidos marcados con fluoresceína. Las células y la mezcla de reacción se incubaron durante 1 h a 37°C y protegiendo de la luz en una incubadora con 5 % CO<sub>2</sub>/95 % aire. Finalmente, las células fueron lavadas con PBS y montadas en portaobjetos. Las células fueron observadas en un microscopio con una lámpara de fluorescencia usando un filtro UV-2A DM400 para la detección de la tinción con Hoechst y un filtro U-MNB2 para fluoresceína para la detección de la reacción de TUNEL. El número de núcleos brillantes, condensados y fragmentados y el número de células positivas a TUNEL fueron contados con ayuda de un analizador de imagen (Macintosh NIH Image 1.6). Se contaron diez campos diferentes, conteniendo aproximadamente 30-40 células (con un objetivo de 60x) y un cubreobjetos se contó por condición y por experimento. Los resultados se expresan como porcentaje de núcleos condensados y fragmentados con respecto al número total de núcleos contados en cada condición experimental (Hoechst) o como el número de células positivas a TUNEL presentes en cada condición experimental. Células tratadas con estaurosporina (STS) (500 nM, Sigma RBI, St. Louis, MO, USA) durante 24 h fueron usadas como control positivo de apoptosis.

#### 4. Determinación de la actividad de la caspasa-3

Para determinar la actividad de la caspasa-3 las células fueron expuestas a diferentes periodos de AG (1, 2 y 4 h) y colectadas inmediatamente después, o expuestas a la AG durante 2 h y después a diferentes periodos de RG (2, 4 y 6 h). Brevemente, después de la AG o de la RG las células fueron lavadas dos veces con 500  $\mu$ l de D-PBS y después homogenizadas en 150  $\mu$ l de buffer de lisis (HEPES 100 mM pH 7.5, EDTA 1 mM, EGTA 20  $\mu$ M, sacarosa 10 %, DTT 10 mM, CHAPS 1.62 mM y una mezcla de inhibidores de proteasas sin EDTA (2 mg/ml). Todos los reactivos fueron obtenidos de Sigma RBI (St. Louis, MO, USA), con excepción de la mezcla de inhibidores de proteasas obtenida de Roche Diagnostics (Mannheim, Germany). Los homogenados fueron diluidos 1:1 con glicerol, se tomó una alícuota para cuantificar proteínas por el método de Lowry et al. (1951) y el resto de las muestras se guardaron a  $-70^{\circ}\text{C}$ . La actividad de la caspasa-3 fue determinada usando el sustrato fluorogénico ácido N-acetil-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-metilcumarina (Ac-DEVD-AMC) (Peptides International, Osaka, Japan). Este sustrato es cortado por la caspasa-3 y genera 7-amino-4-metilcumarina. Al liberarse la 7-amino-4-metilcumarina emite fluorescencia; de este modo, la fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de sustrato procesado y por tanto, a la actividad de la caspasa-3 presente en la muestra. La reacción inició después de la adición del sustrato (25  $\mu$ M) al homogenado celular (30  $\mu$ g de proteína) en un volumen final de 200  $\mu$ l de buffer de lisis. La reacción fue seguida durante 30 min, verificando previamente la linealidad del cambio de fluorescencia. Las muestras se colocaron en placas de 96 pozos con fondo oscuro y se leyó la emisión de fluorescencia (excitación 360 nm, emisión 460 nm) en un lector de placa Synergy HT (Biotek Instruments, Winooski, VT, USA). Los resultados se expresan como cambio en la intensidad de fluorescencia por minuto por miligramo de proteína ( $\Delta F/\text{min}/\text{mg prot}$ ). Como control de activación de caspasa-3 se utilizaron células incubadas con STS 500 nM durante 8 h. La actividad de la caspasa-9 fue también evaluada como se mencionó arriba, pero

monitoreando el corte del tetrapéptido Ac-LEHD-MCA (Peptides International, Osaka, Japan).

## **5. Determinación de proteínas**

Se utilizó el método de Lowry et al. (1951). Se realizó una curva patrón utilizando un estándar de albúmina de suero de bovino (BSA) con concentraciones de 1 a 8 mg/ml. La absorbancia se determinó a 750 nm en un lector de placa Synergy HT (Biotek Instruments, Winooski, VT, USA).

## **6. Determinación de la actividad de la caspasa-12**

La actividad de la caspasa-12 fue monitoreada después de 1, 2 y 4 h de AG, usando el sustrato fluorogénico Ac-Ala-Thr-Ala-Asp-AFC (Ac-ATAD-AFC). Las células se lavaron dos veces con 1 ml de D-PBS y se homogenizaron en 190  $\mu$ l de buffer de lisis (BioVision, Mountain View, CA, USA). Después de determinar la concentración de proteínas por el método de Lowry et al. (1951), se agregaron 50  $\mu$ l del homogenado (conteniendo 250  $\mu$ g de proteínas y considerando los  $\mu$ g/ $\mu$ l de proteína presente en cada muestra), 45  $\mu$ l del buffer de reacción 2x (BioVision, Mountain View, CA, USA) suplementado con DTT 10 mM y 5  $\mu$ l del sustrato Ac-ATAD-AFC (50  $\mu$ M, BioVision, Mountain View, CA, USA) en una placa de 96 pozos con fondo oscuro. La mezcla de reacción se incubó en la oscuridad durante 1 h a 37°C en una incubadora con 5 % CO<sub>2</sub>/95 % aire y la emisión de fluorescencia se determinó durante 30 min en un lector de placa Synergy HT (Biotek Instruments, Winooski, VT, USA) seleccionando una excitación de 400 nm y una emisión de 505 nm. Los resultados se expresan como  $\Delta F$ /min/mg prot. Como control de activación de caspasa-12 se utilizaron células tratadas con el inhibidor de la N-glicosilación de proteínas, tunicamicina (Tm) (5  $\mu$ M, Sigma RBI, St. Louis, MO, USA) y el inhibidor de la SERCA, tapsigargina (Tg) (5  $\mu$ M, Sigma RBI, St. Louis, MO, USA) durante 48 h.



## 7. Análisis por inmunoblot

El procesamiento de la caspasa-3 fue determinado por inmunoblot después de exponer las células a 2 h de AG y diferentes tiempos de RG (2, 4 y 6 h). Las células fueron lavadas dos veces con 1 ml de D-PBS y resuspendidas en 150  $\mu$ l de buffer de lisis que contenía: Tris-HCl 25 mM pH 7.4, NaCl 50 mM, Nonidet P-40 2 %, SDS 0.2 % y una mezcla de inhibidores de proteasas sin EDTA (2 mg/ml). Para la detección del procesamiento de la caspasa-7 y -12 los cultivos fueron expuestos a la AG por diferentes periodos de tiempo (0.25, 0.5, 1, 2 y 4 h) y homogenizados en 150  $\mu$ l de un buffer de lisis que contenía: Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 150 mM, deoxicolato de sodio 0.5 %, Tritón X-100 1 %, SDS 1 % y un cóctel de inhibidores de proteasas con EDTA (2 mg/ml). Todos los reactivos fueron obtenidos de Sigma RBI (St. Louis, MO, USA) excepto, el cóctel de inhibidores de proteasas que fue de Roche Diagnostics (Mannheim, Germany). Después de la incubación en hielo durante 10 min, los homogenizados fueron centrifugados a 14000 rpm por 20 min a 4°C y congelados a -70°C. El sobrenadante (60  $\mu$ g de proteína) fue separado por electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) al 12 % y transferido a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) de 0.45  $\mu$ m (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). Las membranas fueron bloqueadas con una solución de leche descremada al 5 % en buffer tris salino-Tween 20 (TTBS) (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM y Tween 20 al 0.1 %) durante 1 h a temperatura ambiente y con agitación. Los anticuerpos primarios se incubaron durante 48 h a 4°C en el buffer de bloqueo. Los siguientes anticuerpos primarios y sus diluciones fueron usados: caspasa-3 (1:200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), caspasa-7 (1:250, Abcam, Cambridge, MA, USA), caspasa-12 (1:500, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Como control positivo del procesamiento de caspasa-3 se usaron células incubadas con STS (500 nM) durante 8 h y como control de activación de caspasa-7 y -12, las células fueron expuestas durante 48 h a Tg (5  $\mu$ M) y Tm (5  $\mu$ M).

La detección de los marcadores de la vía de PERK (p-eIF2 $\alpha$ , ATF4, CHOP y GRP78) se realizó después de exponer las células a diferentes periodos de AG

(0.25, 0.5, 1, 2 y 4 h). Las células se homogenizaron en el mismo buffer de lisis usado para caspasa-7 y -12 y fueron procesadas como se mencionó antes. En este caso, 25 µg de proteína fueron usados. Los anticuerpos primarios se incubaron durante 48 h a 4°C en el buffer de bloqueo, con excepción del anti-ATF4 que se diluyó en BSA al 5 % en PBS. Los siguientes anticuerpos primarios y sus diluciones fueron usados: p-eIF2α (1:1000, Abcam, Cambridge, MA, USA), ATF4 (1:250, Abcam, Cambridge, MA, USA), CHOP (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), GRP78 (1:1000, Abcam, Cambridge, MA, USA) y β-actina (1:5000, Millipore, Temecula, CA, USA) éste último, incubado únicamente durante 24 h a 4°C en el buffer de bloqueo . Posteriormente, se realizaron tres lavados con TTBS durante 10 min, a temperatura ambiente y con agitación. Los anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo y de ratón, ambos conjugados a peroxidasa de rábano (1:5000, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA) se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente, con excepción, del anticuerpo secundario usado para la actina, el cual se incubó únicamente durante 30 min. Las membranas se lavaron tres veces con TTBS durante 10 min, a temperatura ambiente y con agitación. Los anticuerpos unidos a la membrana se observaron usando un sistema de detección que emplea quimioluminiscencia (ECL, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). La densidad óptica de las bandas fue cuantificada usando el programa Image J (NIH Image versión 1.46).

## **8. Tratamientos**

Se utilizaron los siguientes compuestos: el inhibidor general de caspasas, Q-Val-Asp-OPH (QVDOPH) (20 µM, MP Biomedicals, Solon, OH, USA), el inhibidor de caspasa-3/7, acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-aldehído (DEVDCHO) (25 µM, Peptide Institute, Osaka, Japan), el inhibidor de la calpaína, N-Benciloxycarbonilvalilfenilalanina (MDL-28170) (50 µM, Enzo Life Sciences, Ann Arbor, MI, USA), el inhibidor de la caspasa-12, Q-Ala-Thr-Ala-Asp(OMe)-OPH (Q-ATAD) (40 µM, MP Biomedicals, Solon, OH, USA) y el inhibidor del estrés reticular, salubrinal (50 µM, Tocris Bioscience, Ellisville, MO, USA).

Para descartar un posible efecto de los inhibidores por si solos y antes de realizar los experimentos de AG, las células de hipocampo fueron incubadas con los inhibidores agregándolos directamente al medio de cultivo en el que fueron sembradas las células. Después de 22 h, la viabilidad celular fue evaluada con el ensayo de reducción del MTT. Por otro lado, cuando se evaluó el efecto de los distintos inhibidores en las células incubadas en el medio carente de glucosa, éstos se añadieron únicamente durante el periodo de AG.

## **9. Análisis estadístico**

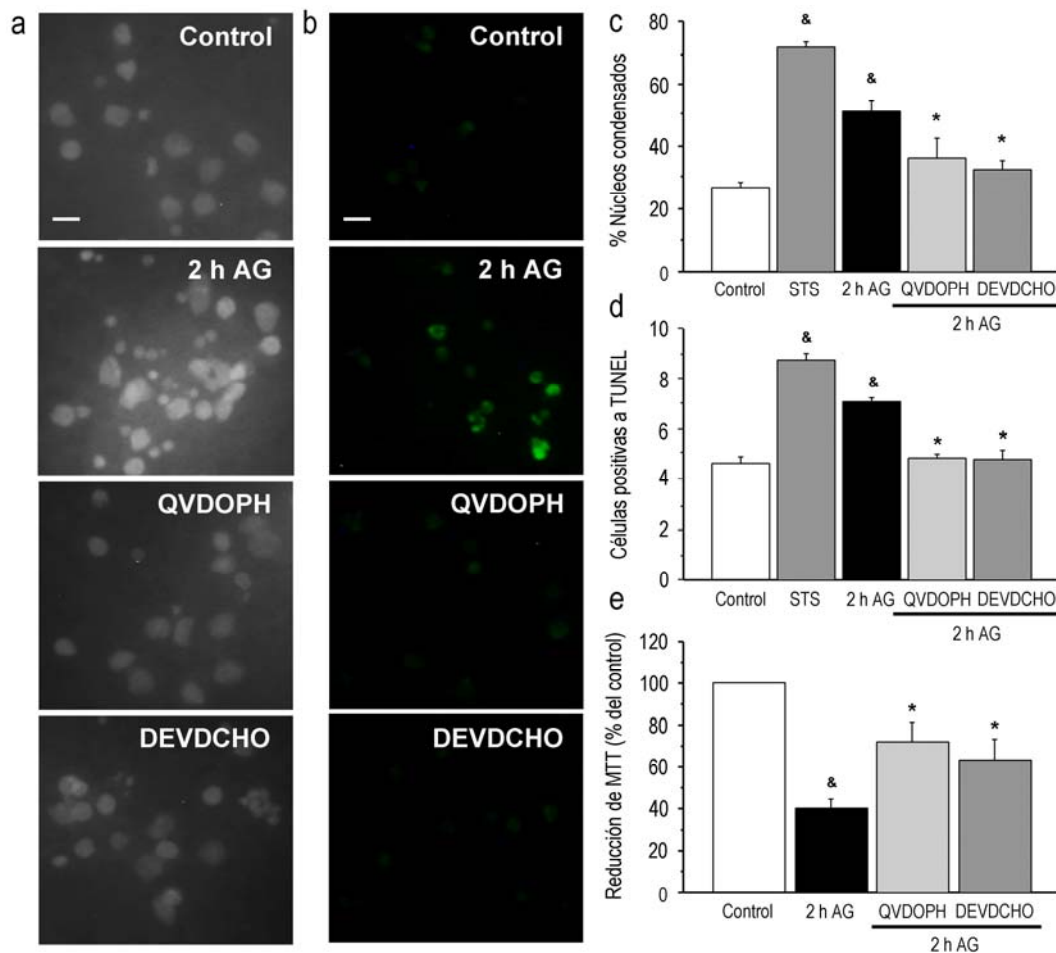
Los resultados fueron analizados con una prueba de ANOVA de una vía seguida de una prueba de Fisher de comparación múltiple, utilizando el programa de estadística Statview 4.5. Todos los resultados se presentaron como promedio  $\pm$  error estándar (ES). Los valores de  $P < 0.05$  se consideraron significativamente diferentes.

## VII. RESULTADOS

### 1. La ausencia de glucosa induce muerte neuronal apoptótica

La figura 5a muestra imágenes representativas de núcleos teñidos con Hoechst; en los cultivos control, la mayoría de los núcleos se observan grandes y redondos mientras que en los cultivos expuestos al medio sin glucosa hay muchos núcleos brillantes, condensados y fragmentados. Como se puede observar, cuando las células fueron incubadas en presencia de los inhibidores de caspasas, muchos núcleos muestran una apariencia normal, similar a aquellos observados en la condición control (Fig. 5a). Resultados similares fueron obtenidos cuando la apoptosis fue monitoreada por el ensayo de TUNEL. Las imágenes de un experimento representativo muestran un incremento en el número de células positivas a TUNEL en cultivos expuestos a la AG con respecto a los cultivos control (Fig. 5b). El número de células positivas a TUNEL se reduce en presencia de los inhibidores de caspasas, QVDOPH y DEVDCHO (Fig. 5b). La gráfica en la figura 5c muestra que el porcentaje de núcleos condensados y fragmentados aumenta cuando las células son expuestas a la AG comparado con las células control. En los cultivos control el 26.5 % de las células mostraron núcleos condensados y fragmentados, representando un nivel basal de apoptosis y este número incremento a 51.2 % cuando las células fueron privadas de glucosa. En presencia de STS (500 nM), usada como un control positivo de apoptosis, un 71.5 % de núcleos apoptóticos fueron observados (Fig. 5c). El incremento en el número de núcleos condensados y fragmentados inducido por 2 h de AG fue reducido eficientemente en presencia del inhibidor de amplio espectro de caspasas, QVDOPH (20  $\mu$ M) y el inhibidor de caspasa-3/-7, DEVDCHO (25  $\mu$ M) (Fig. 5c). La gráfica en la figura 5d muestra el número de células positivas a TUNEL. En concordancia con la tinción con Hoechst, pocas células positivas a TUNEL fueron observadas en la condición control, mientras que este número incremento en presencia de STS. Los cultivos expuestos a 2 h de AG y observados 22 h después mostraron significativamente más células positivas a TUNEL con respecto a la

condición control (Fig. 5d). Como se esperaba, el número de células positivas a TUNEL fue reducido significativamente en presencia de los inhibidores de caspasas (Fig. 5d). La viabilidad celular fue determinada por el ensayo de reducción del MTT. Como se indica en la Figura 5e, la viabilidad celular disminuyó significativamente hasta un 40 % con respecto al control cuando las células fueron expuestas a la AG durante 2 h. Los inhibidores de caspasas tuvieron un efecto protector contra la muerte inducida por la AG. En presencia del QVDOPH y del DEVDCHO la reducción de MTT se restauró hasta un 72 y 63 %, respectivamente, de los niveles control (Fig. 5e). Esos resultados demuestran que 2 h de AG inducen muerte neuronal y que ésta es mediada, al menos en parte por apoptosis.



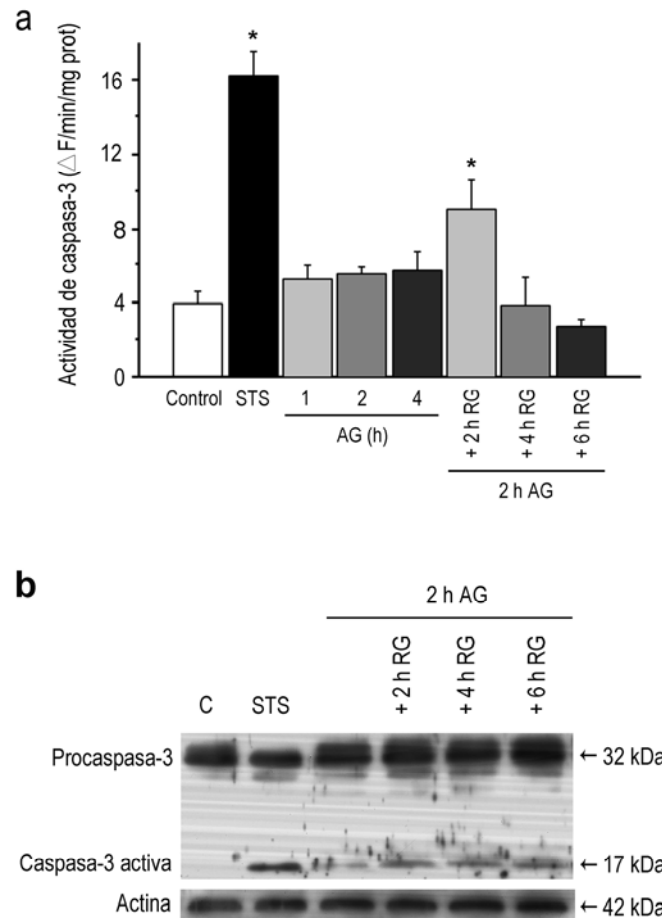
**FIG. 5** La muerte celular apoptótica es inducida por la ausencia de glucosa. Las neuronas fueron expuestas a la AG durante 2 h en presencia o ausencia de QVDOPH (20  $\mu$ M) ó DEVDCHO (25  $\mu$ M) y 22 h después la condensación y fragmentación nuclear (a, c), el corte del DNA (b, d) y la viabilidad celular (e) fueron determinados por la tinción con Hoechst, el ensayo de

TUNEL y la reducción de MTT, respectivamente. La STS fue usada como un control positivo de apoptosis. Diez campos diferentes fueron contados (con un objetivo de 60x) y un cubreobjetos fue contado por condición por experimento. Los resultados se expresan como porcentaje de núcleos condensados y fragmentados con respecto al número total de núcleos contados en cada condición experimental (c) ó como el número de células positivas a TUNEL (d) presentes en cada condición experimental. Los datos son expresados como el promedio  $\pm$  ES de 3 a 6 (c), 4 (d) y 3-7 (e) experimentos independientes y fueron analizados con una prueba de ANOVA de una vía seguida de una prueba de Fisher de comparación múltiple.  $^{\circ}P < 0.05$  respecto al control y  $^{\circ}P < 0.05$  respecto a 2 h de AG. Las micrografías muestran la presencia de núcleos condensados y fragmentados (a) y células positivas a TUNEL (b) y el efecto protector del QVDOPH (20  $\mu$ M) y el DEVDCHO (25  $\mu$ M). Las micrografías mostradas de la tinción con Hoechst y el ensayo de TUNEL corresponden a campos diferentes. Barra de escala 10  $\mu$ m.

## **2. La actividad de la caspasa-3 es inducida después de la reintroducción de glucosa**

El curso temporal de activación de la caspasa-3 se muestra en la Figura 6a. Cuando las células fueron expuestas a un medio sin glucosa por 1, 2 ó 4 h la actividad de la caspasa-3 incrementó discretamente, sin llegar a ser significativo este aumento. Un incremento transitorio y significativo en la actividad de la caspasa-3 fue observado solo después de 2 h de RG (cambio en la intensidad de fluorescencia/min/mg de proteína, control =  $3.92 \pm 0.70$ ; AG =  $8.97 \pm 1.63$ ) y disminuyó después de 4 y 6 h de recuperación en el medio que contenía glucosa (Fig. 6a). La actividad de caspasa-3 fue también medida a tiempos cortos de AG y un leve incremento fue observado a 0.25 y 0.5 h de AG (datos no mostrados). Las células expuestas a STS durante 8 h mostraron un incremento significativo en la fluorescencia (datos no mostrados, control =  $3.92 \pm 0.70$ ; STS =  $16.24 \pm 1.32$ , n = 4). Para confirmar la activación de la caspasa-3 usamos ensayos de inmunoblot para evaluar la generación del fragmento activo de la caspasa-3 en homogenados de células expuestas a la AG durante 2 h y después a la RG por 2, 4 ó 6 h (Fig. 6b). El fragmento activo de 17 kDa fue detectado después de 2, 4 y 6 h de RG en células previamente expuestas a 2 h de AG. Como control positivo se utilizó STS (500 nM), la cual promueve el corte de la procaspasa-3 a su fragmento activo de 17 kDa después de 8 h de incubación. Como la caspasa-9 es un activador común de la caspasa-3, la actividad de esta caspasa fue también evaluada usando el sustrato Ac-LEHD-MCA. Se observó un incremento pero no significativo del 33 %

en la actividad enzimática después de 0.25 h de AG, pero no a periodos más largos de AG o durante la RG (datos no mostrados).



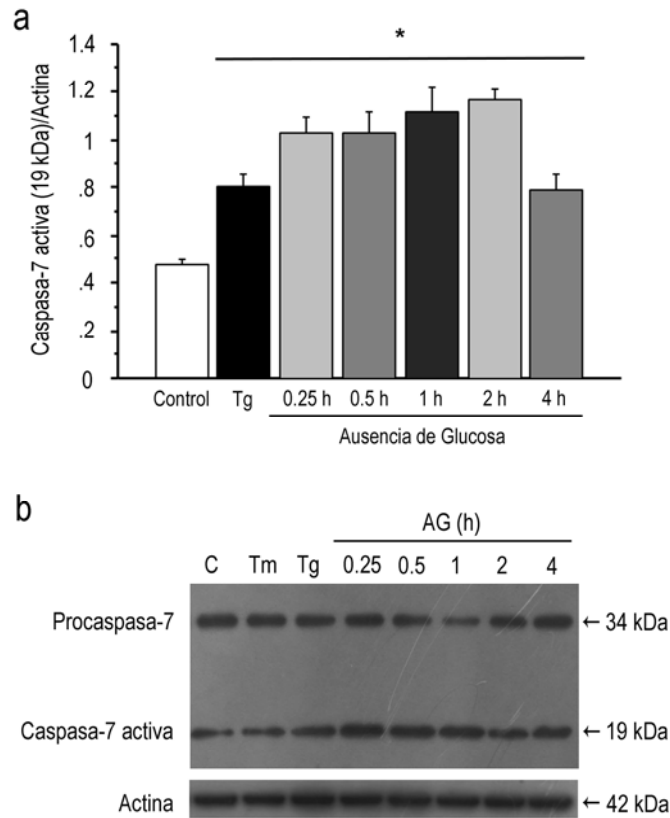
**Fig. 6** Efecto de la reintroducción de glucosa en la actividad y procesamiento de la caspasa-3. La actividad de la caspasa-3 fue determinada a diferentes tiempos después de la AG (1, 2 y 4 h) o después de la RG (2, 4 ó 6 h) usando el sustrato fluorogénico, Ac-DEVD-MCA. Los resultados son expresados como  $\Delta F/\text{min}/\text{mg prot}$  (a). El procesamiento de la procaspasa-3 (32 kDa) a su fragmento activo (17 kDa) fue determinado por inmunoblot y es mostrado en (b).  $\beta$ -actina fue usada como control de carga. La STS fue usada como control positivo de activación de la caspasa-3. Los resultados son expresados como el promedio  $\pm$  ES de 3 a 5 experimentos independientes. Los datos fueron analizados con una prueba de ANOVA de una vía seguida de una prueba de Fisher de comparación múltiple. \* $P < 0.05$  respecto al control

### 3. La actividad de la caspasa-7 es inducida después de la ausencia de glucosa

Los resultados descritos arriba sugieren que la vía mitocondrial no está involucrada en la muerte neuronal apoptótica inducida por la AG, debido a que la

actividad de la caspasa-9 y la caspasa-3 fueron solo marginalmente activadas. Sin embargo, se observó un efecto protector significativo del DEVDCHO en contra de la muerte neuronal inducida por la AG (Fig. 5). Debido a que el DEVDCHO también inhibe la actividad de la caspasa-7, nos enfocamos en evaluar el curso temporal del procesamiento de esta caspasa mediante ensayos de inmunoblot, usando un anticuerpo que reconoce la procaspasa-7 (34 kDa) y su fragmento activo (19 kDa). La gráfica en la Figura 7a muestra el análisis densitométrico del cociente de la banda de 19 kDa/ $\beta$ -actina. La densidad óptica de esta banda incrementó rápidamente después de 0.25 h de AG y se mantuvo significativamente elevada hasta las 2 h, disminuyendo a las 4 h. Un inmunoblot representativo del curso temporal de activación de la caspasa-7 se muestra en la Figura 7b. Como se observa, el fragmento activo de la caspasa-7 incrementó rápidamente desde 0.25 h de AG. Como controles positivos se incubaron las células durante 48 h con Tm (5  $\mu$ M) y con Tg (5  $\mu$ M), los cuales se sabe que inducen activación de caspasa-7. Un incremento en el procesamiento de la caspasa-7 fue observado después del tratamiento con Tg (Fig 7a y b). Esos resultados sugieren que la muerte neuronal apoptótica inducida por la AG es dependiente de caspasas y que la caspasa-7 es rápidamente activada después de la AG y contribuye a la muerte neuronal.



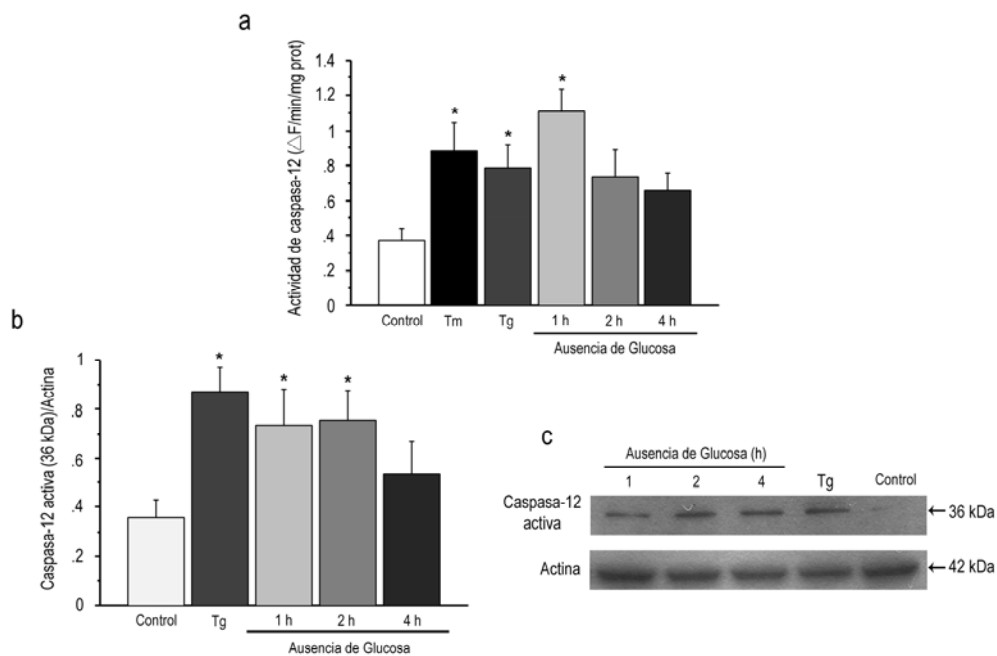


**Fig. 7** Efecto de la ausencia de glucosa en la actividad de la caspasa-7. Las células fueron expuestas a la AG durante los tiempos indicados y la proteólisis de la caspasa-7 fue analizada por inmunoblot. Los datos en (a) representan la densidad óptica de la banda del fragmento activo de la caspasa-7 (19 kDa)/ $\beta$ -actina (42 kDa). Un inmunoblot representativo muestra la presencia de la procaspasa-7 (34 kDa) y su fragmento activo (19 kDa).  $\beta$ -actina fue usada como control de carga (b). Tm (5  $\mu$ M) y Tg (5  $\mu$ M) fueron usadas como control positivo de activación de la caspasa-7. Los resultados son expresados como el promedio  $\pm$  ES de 3 a 5 experimentos independientes. Los datos fueron analizados con una prueba de ANOVA de una vía seguida de una prueba de Fisher de comparación múltiple. \* $P < 0.05$  respecto al control.

#### 4. La ausencia de glucosa induce la activación de la caspasa-12

Basados en los resultados arriba descritos que sugieren que la caspasa-7 es activada de manera significativa durante la AG, nos enfocamos en investigar si la muerte neuronal apoptótica provocada por la AG es resultado del estrés reticular. La caspasa-12 es una caspasa residente del RE, la cual ha sido propuesta como un mediador clave de la apoptosis inducida por estrés reticular. La caspasa-12 es específicamente activada por estrés reticular (Nakagawa et al. 2000) y su activación puede resultar entre otros mecanismos del corte mediado por la caspasa-7 (Rao et al. 2001; Martínez et al. 2010; Tan et al. 2006). Ésto nos

llevó a evaluar la actividad de la caspasa-12 usando el sustrato fluorogénico Ac-ATAD-AFC. La Figura 8a muestra que 1 h de AG induce un incremento significativo en la actividad de la caspasa-12 comparado con los cultivos controles mantenidos en un medio con glucosa (cambio en la intensidad de fluorescencia/min/mg de proteína, control =  $0.37 \pm 0.006$ ; AG =  $1.10 \pm 0.12$ ), el cual disminuyó después de 2 y 4 h a valores similares al control. La actividad de la caspasa-12 fue también significativamente estimulada cuando los cultivos se incubaron durante 48 h en presencia de Tm (5  $\mu$ M) y Tg (5  $\mu$ M), usadas como controles positivos de activación de dicha caspasa en presencia de glucosa. El análisis densitométrico del cociente del fragmento activo de la caspasa-12 (36 kDa) relativo a la banda de  $\beta$ -actina se muestra en la Figura 8b. La Figura 8c muestra un inmunoblot representativo del curso temporal del procesamiento de la caspasa-12, usando un anticuerpo que solo reconoce el fragmento activo de 36 kDa (Barbero-Camps et al. 2014). Como se puede observar, el fragmento activo se detectó desde 1 hasta 4 h de AG, así como también después de 48 h de incubación con Tg (5  $\mu$ M), pero no en los cultivos controles.



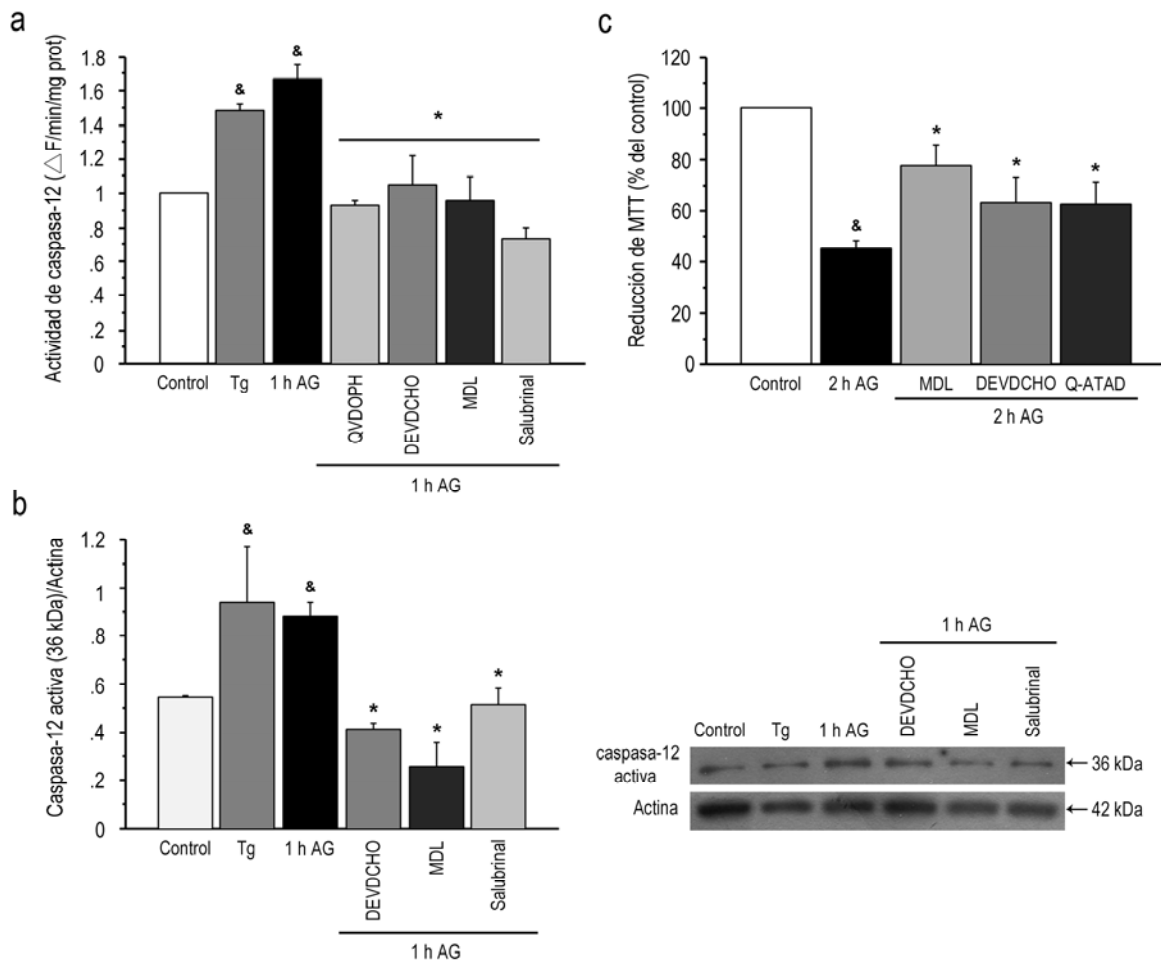
**Fig. 8** Efecto de la ausencia de glucosa en la actividad de la caspasa-12. Las neuronas fueron expuestas a la AG por 1, 2 ó 4 h y la actividad de la caspasa-12 fue medida usando el sustrato fluorogénico, Ac-ATAD-AFC. Los resultados se expresan

como  $\Delta F/\text{min}/\text{mg}$  prot. Como controles positivos de activación de caspasa-12 se usaron Tm (5  $\mu\text{M}$ ) y Tg (5  $\mu\text{M}$ ) (a). El curso temporal de la proteólisis de la caspasa-12 fue determinado por inmunoblot. Los resultados son expresados como la densidad óptica de la banda del fragmento activo de la caspasa-12 (36 kDa)/ $\beta$ -actina (42 kDa) (b). Los resultados son expresados como el promedio  $\pm$  ES de 4-7 (a) y 3-5 (b) experimentos independientes. Los datos fueron analizados con una prueba de ANOVA de una vía seguida de una prueba de Fisher de comparación múltiple. \* $P < 0.05$  respecto al control (a, b). Un inmunoblot representativo es mostrado en (c).

## **5. La activación de la caspasa-12 sugiere inducción del estrés reticular por la ausencia de glucosa**

Ha sido demostrado que la caspasa-12 puede ser activada por la caspasa-7 (Rao et al. 2001), así como también, por la proteasa de cisteína dependiente de calcio calpaína, en respuesta al calcio liberado del RE durante el estrés reticular (Nakagawa y Yuan 2000). Para determinar la contribución relativa de la calpaína y la caspasa-7 a la activación de la caspasa-12 las células fueron expuestas a un medio sin glucosa durante 1 h e incubadas en presencia o ausencia del DEVDCHO (25  $\mu\text{M}$ ) y el inhibidor de calpaína MDL-28170 (50  $\mu\text{M}$ ). Como se observa en la Figura 9a, el incremento en la actividad de caspasa-12 inducido después de 1 h de AG fue inhibido significativamente por el DEVDCHO y por el MDL-28170. Como se esperaba, el inhibidor de amplio espectro de caspasas, el QVDOPH (20  $\mu\text{M}$ ) también inhibió la actividad de esta caspasa. Para corroborar el efecto inhibitorio del DEVDCHO y del MDL-28170 en la actividad de la caspasa-12, también probamos el efecto de esos inhibidores en el procesamiento de dicha caspasa. Como se observa en la Figura 9b, la producción del fragmento activo de la caspasa-12 (36 kDa) fue inhibido significativamente en las células incubadas con MDL-28170 y con DEVDCHO, sugiriendo la participación de la calpaína y la caspasa-7 en la activación de la caspasa-12. Los resultados que muestran la activación de la caspasa-12 durante la ausencia de glucosa (Fig. 8) y la evidencia de que esta caspasa es activada únicamente durante un estímulo inductor de estrés reticular, nos llevó a evaluar el efecto del salubrinal. El salubrinal protege a las células contra la apoptosis inducida por estrés reticular, debido a que inhibe selectivamente la desfosforilación de eIF2 $\alpha$  (Boyce et al. 2005). Como se observa en la Figura 9a y b, el salubrinal inhibió la activación y el procesamiento de la

caspasa-12 después de la exposición de los cultivos a un medio carente de glucosa durante 1 h. Además, la inhibición de la calpaína, la caspasa-7 y la caspasa-12 (por el Q-ATAD) previno la muerte neuronal inducida por la AG, evaluada por el ensayo de reducción del MTT (Fig. 9c). Estos resultados sugieren que la caspasa-12 es activada durante la AG y que ésta contribuye a la muerte neuronal apoptótica inducida por el estrés reticular. Además, la caspasa-7 y la calpaína contribuyen a la activación de la caspasa-12.



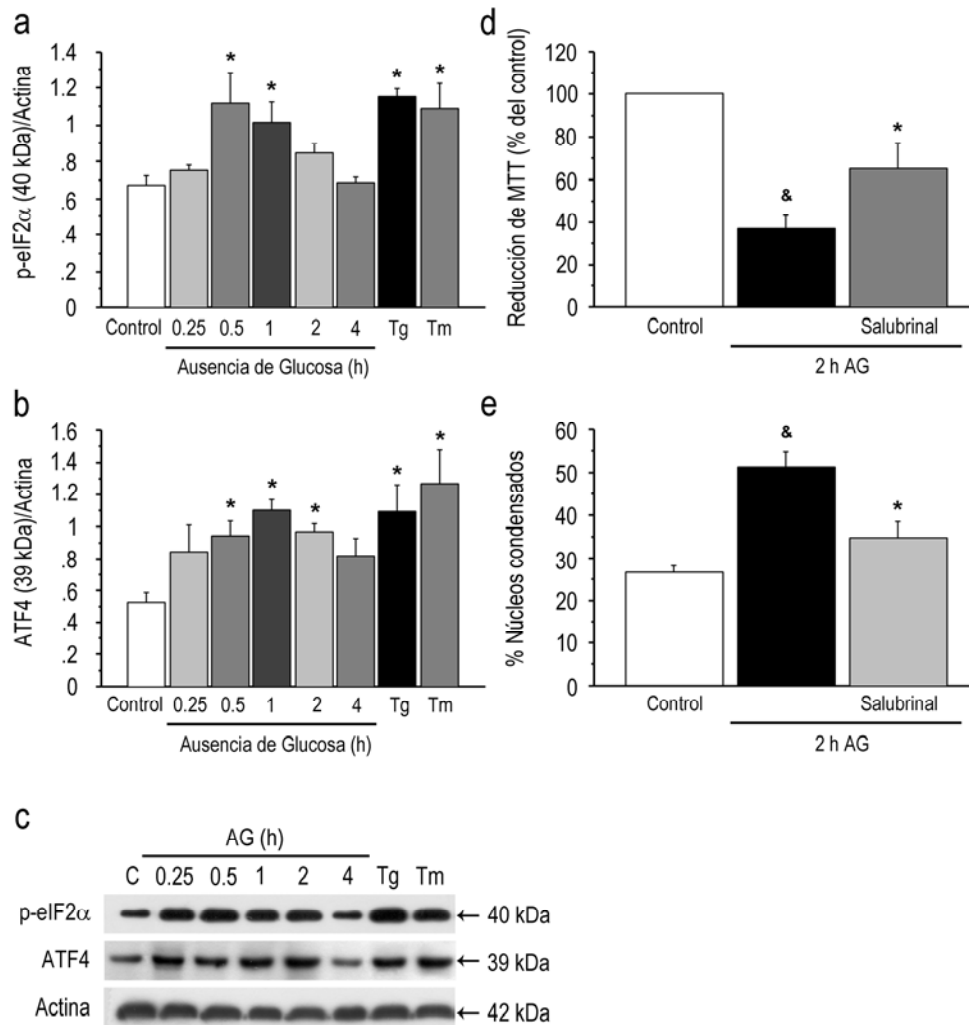
**Fig. 9** La caspasa-7 y la calpaína median la actividad de la caspasa-12 inducida por la ausencia de glucosa. Las células fueron expuestas a la AG durante 1 h en presencia o ausencia de QVDOPH (20  $\mu\text{M}$ ), DEVDCHO (25  $\mu\text{M}$ ), MDL-28170 (50  $\mu\text{M}$ ) o salubrinal (50  $\mu\text{M}$ ) y la actividad de la caspasa-12 fue determinada. Los resultados son expresados como  $\Delta F/\text{min}/\text{mg prot}$  (a). El procesamiento de la caspasa-12 en su fragmento activo (36 kDa) fue determinado por inmunoblot después de la exposición de los cultivos durante 1 h a la AG y en presencia o ausencia de los distintos inhibidores. Los resultados son expresados como la densidad óptica de la banda del fragmento activo de la caspasa-12 (36 kDa)/ $\beta$ -actina (42 kDa) (b, panel izquierdo). Un inmunoblot representativo es mostrado en (b, panel derecho). Como control positivo de activación de

caspasa-12 se usó Tg (5  $\mu$ M). Las neuronas fueron expuestas a la AG durante 2 h en presencia o ausencia de MDL-28170 (50  $\mu$ M), DEVDCHO (25  $\mu$ M) ó Q-ATAD (40  $\mu$ M) y la reducción del MTT fue medida 22 h después de la AG (c). Los resultados son expresados como el promedio  $\pm$  ES de 4-6 (a), 3 (b) y 4 (c) experimentos independientes. Los datos fueron analizados con una prueba de ANOVA de una vía seguida de una prueba de Fisher de comparación múltiple. <sup>a</sup>P < 0.05 respecto al control (a, b y c) y <sup>b</sup>P < 0.05 respecto a 1 h de AG (a, b) ó 2 h de AG (c).

## **6. La ausencia de glucosa induce un aumento en los niveles de p-eIF2 $\alpha$ y ATF4**

Para estudiar si el estrés reticular es inducido después de la exposición a la AG, se evaluaron los niveles de diferentes marcadores de la vía de PERK por ensayos de inmunoblot. Los resultados en la Figura 10a y 10c muestran que la exposición al medio sin glucosa induce un rápido y significativo incremento en los niveles de p-eIF2 $\alpha$  de 0.5 a 1 h, el cual progresivamente disminuye después de 2-4 h. Acorde a lo reportado, el tratamiento de los cultivos durante 48 h con Tg (5  $\mu$ M) y Tm (5  $\mu$ M) incrementó significativamente los niveles de p-eIF2 $\alpha$  (Fig. 10a y c). La fosforilación de eIF2 $\alpha$  causa una inhibición global de la síntesis de proteínas. Sin embargo, RNAs mensajeros que tienen uORFs en su extremo 5' pueden evitar el bloqueo de la traducción; el más estudiado de esos genes es ATF4 (Wek et al. 2006). La Figura 10b muestra el análisis densitométrico de la banda de 39 kDa que corresponde a ATF4. Cuando los cultivos fueron privados de glucosa un rápido incremento en los niveles de la proteína ATF4 fueron observados desde 0.5 y hasta las 2 h, disminuyendo a las 4 h. Un inmunoblot representativo en la Figura 10c muestra el incremento en los niveles de las proteínas p-eIF2 $\alpha$  (40 kDa) y ATF4 (39 kDa) después de que las células fueron expuestas a un medio sin glucosa. La exposición a Tg y Tm también indujo un incremento significativo en los niveles de ambas proteínas. Después, decidimos evaluar el efecto del salubrinal, una molécula que inhibe a GADD34, una subunidad reguladora de la fosfatasa responsable de la desfosforilación de p-eIF2 $\alpha$ , de esta forma, previniendo el estrés reticular (Boyce et al. 2005). Como se indica en la Figura 10d, la viabilidad celular se incrementó significativamente cuando los cultivos fueron expuestos a la AG en presencia del salubrinal (50  $\mu$ M),

restaurando parcialmente la reducción del MTT hasta un 65.2 % de los niveles control. De igual forma, el salubrinal redujo significativamente hasta un 34.7 % el número de núcleos fragmentados y condensados cuando estuvo presente en el medio carente de glucosa (Fig. 10e). Estos resultados concuerdan con la disminución observada en la actividad y el procesamiento de la caspasa-12 en presencia del salubrinal (Fig. 9a, b).



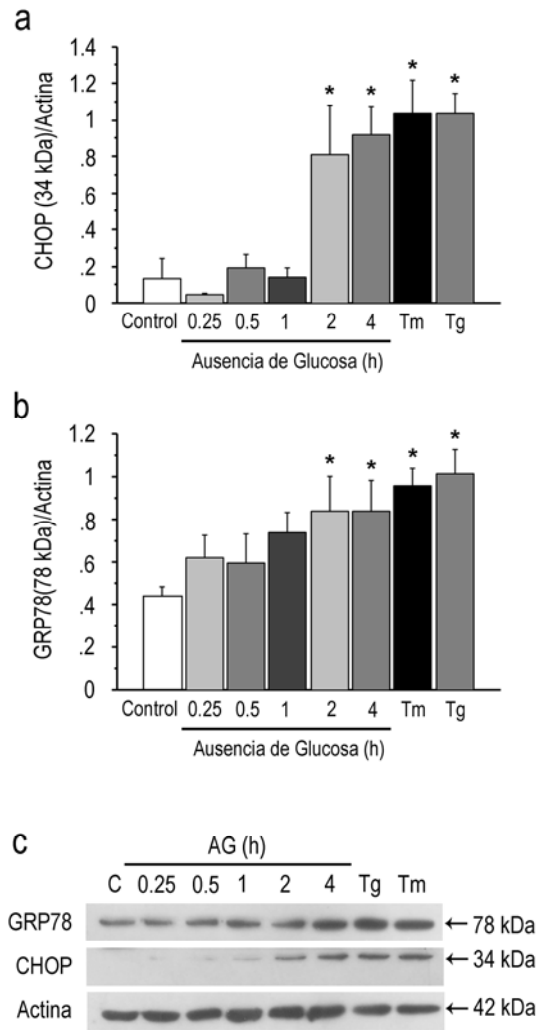
**Fig. 10** La ausencia de glucosa induce estrés reticular e incrementa los niveles de p-eIF2 $\alpha$  y ATF4. Las células fueron expuestas a la AG durante el periodo de tiempo indicado y el contenido de las proteínas p-eIF2 $\alpha$  y ATF4 fue analizado por inmunoblot (a, b). Los datos representan la densidad óptica de la banda de p-eIF2 $\alpha$  (40 kDa) ó ATF4 (39 kDa)/ $\beta$ -actina (42 kDa). Tg (5  $\mu$ M) y Tm (5  $\mu$ M) fueron usados como control positivo de inducción de estrés reticular. Un inmunoblot representativo muestra los cambios en el contenido de p-eIF2 $\alpha$  (40 kDa) y ATF4 (39 kDa) después de la AG.  $\beta$ -actina fue usada como control de carga (c). Las neuronas fueron expuestas durante 2 h a la AG en presencia o ausencia del inhibidor

del estrés reticular, salubrinal (50  $\mu$ M) y la reducción del MTT fue medida 22 h después (d). Los resultados se expresan como el porcentaje de reducción del MTT con respecto al control. Las células fueron expuestas a 2 h de AG en presencia o ausencia del salubrinal (50  $\mu$ M) y 22 h después el número de núcleos condensados y fragmentados fue evaluado con la tinción con Hoechst. Los resultados son expresados como el porcentaje de núcleos fragmentados y condensados (e). Los datos son expresados como el promedio  $\pm$  ES de 3-6 (a), 3-4 (b), 4 (d) y 3-6 (e) experimentos independientes. Los datos fueron analizados con una prueba de ANOVA de una vía seguida de una prueba de Fisher de comparación múltiple. \*P < 0.05 respecto al control (a, b) y respecto a 2 h de AG (d, e), <sup>§</sup>P < 0.05 respecto al control (d, e).

## **7. La ausencia de glucosa induce un aumento en los niveles de CHOP y GRP78**

Durante el estrés reticular prolongado, las tres vías de señalización de la UPR pueden inducir la expresión de CHOP, un factor de transcripción que participa en la inducción de apoptosis mediada por estrés reticular. La transcripción de CHOP está río abajo de ATF4 y es esencial para la inducción de apoptosis a través de la vía de PERK-eIF2 $\alpha$ -ATF4 (Oyadomari y Mori 2004). Así, se evaluaron los niveles de la proteína CHOP después de la exposición continua a la AG por 0.25-4 h. Como se observa en la figura 11a los niveles de CHOP se elevaron significativamente después de 2 h de AG y se mantuvieron incrementados hasta las 4 h. El tratamiento con Tm (5  $\mu$ M) y con Tg (5  $\mu$ M) durante 48 h produjo incrementos similares en los niveles de CHOP (Fig. 11a, c). Uno de los marcadores de estrés reticular es la inducción de las proteínas chaperonas GRP78 y GRP94. El estrés reticular incrementa la transcripción de esas chaperonas residentes del RE para controlar el estrés reticular y facilitar el plegamiento de proteínas (Raghubir et al. 2011). Los niveles de GRP78 fueron examinados a diferentes periodos de tiempo después de la exposición al medio carente de glucosa (0.25, 0.5, 1, 2 y 4 h). De forma similar a CHOP, los niveles de la proteína GRP78 incrementaron significativamente después de 2 h de AG y se mantuvieron elevados hasta las 4 h (Fig. 11b, c). El tratamiento con Tm y con Tg también indujo un incremento significativo en los niveles de la proteína GRP78. Un inmunoblot representativo que muestra un incremento en la densidad de las bandas correspondientes a GRP78 (78 kDa) y CHOP (34 kDa) después de la AG se muestra en la figura 11c. En conjunto, estos resultados demuestran que la vía

de PERK de la UPR es activada durante la AG y sugieren que esta vía contribuye a la muerte neuronal, debido a que la inhibición del estrés reticular por el salubrinal incremento la sobrevivencia neuronal.



**Fig. 11** La ausencia de glucosa induce la expresión de CHOP y GRP78. Las células fueron expuestas a la AG durante los periodos de tiempo indicados y el contenido de las proteínas CHOP y GRP78 fue analizado por inmunoblot (a, b). Los datos representan la densidad óptica de la banda de CHOP (34 kDa) ó GRP78 (78 kDa)/ $\beta$ -actina (42 kDa). Tm (5  $\mu$ M) y Tg (5  $\mu$ M) fueron usados como control positivo de inducción de estrés reticular. Los resultados son expresados como el promedio  $\pm$  ES de 3 (a) ó 5-6 (b) experimentos independientes. Los datos fueron analizados con una prueba de ANOVA de una vía seguida de una prueba de Fisher de comparación múltiple.  $P < 0.05$  respecto al control. Un inmunoblot representativo muestra los cambios en el contenido de GRP78 (78 kDa) y CHOP (34 kDa) después de la AG.  $\beta$ -actina fue usada como un control de carga (c).



## VIII. DISCUSIÓN

La hipoglucemia severa es comúnmente el resultado de la administración excesiva de insulina en los pacientes diabéticos tipo I (Cryer 2006). Los mecanismos de muerte neuronal asociados con el daño neuronal hipoglucémico no han sido completamente elucidados. Estudios pioneros sugirieron la participación de un mecanismo de muerte necrótica por excitotoxicidad con base en la observación de un aumento en la liberación de glutamato y aspartato durante el periodo isoeléctrico y en el efecto protector de los antagonistas de los receptores al glutamato (Wieloch 1985, Sandberg et al. 1986). Algunos estudios sugirieron el papel de la cascada apoptótica mitocondrial en la muerte neuronal hipoglucémica (Ferrand-Drake et al. 2003). El papel del estrés reticular y la muerte apoptótica que resulta de éste no han sido previamente reportados en modelos de hipoglucemia, por lo tanto en este estudio se utilizó un modelo *in vitro* de AG para mimetizar la condición hipoglucémica e investigar la inducción del estrés reticular y su papel en la muerte neuronal apoptótica.

Los presentes resultados demuestran que la AG durante 2 h conduce a la muerte neuronal la cual ocurre al menos en parte, a través de un mecanismo de apoptosis. El inhibidor de caspasas de amplio espectro QVDOPH y el inhibidor de las caspasas-3 y -7 DEVDCHO, incrementaron parcial pero significativamente la viabilidad neuronal y redujeron las células positivas a TUNEL y los núcleos condensados y fragmentados, sugiriendo la participación de una vía apoptótica dependiente de caspasas. Sin embargo, de acuerdo a las determinaciones de actividad de caspasas y los ensayos de inmunoblot, la caspasa-3 es activada ligera y transitoriamente durante el periodo de RG, y la actividad de la caspasa-9 no se estimuló significativamente durante la AG. Por lo tanto, la protección por el QVDOPH y el DEVDCHO puede estar relacionada con la activación de otras caspasas. Debido a que el DEVDCHO es también un inhibidor de la caspasa-7, determinamos la actividad de esta caspasa a diferentes periodos de tiempo de AG, a través del procesamiento de la procaspasa y la producción de su fragmento activo de 19 kDa. Se observó una rápida y sostenida activación de esta caspasa

desde los 15 min y hasta las 2 h de AG. Así, el efecto protector del DEVDCHO contra la muerte celular puede ser atribuible a la actividad de la caspasa-7, en lugar de la caspasa-3. Esos resultados están en concordancia con aquellos de Martínez y colaboradores (2010) que muestran que la activación de la caspasa-7 precede a la de la caspasa-3 después de la exposición de células PC12 a Tg.

Las caspasas también juegan un papel crítico en la apoptosis inducida por estrés reticular. Después de la activación de la vía de PERK, la expresión incrementada del factor de transcripción CHOP regula hacia abajo los niveles de la proteína Bcl-2, induciendo la activación de la caspasa-9 y la caspasa-3, dando como resultado la muerte apoptótica (Rao et al. 2001; McCullough et al. 2001; Rao et al. 2002; Morishima et al. 2002; Mao et al. 2006). Sin embargo, en las presentes condiciones experimentales la participación de la vía citocromo *c*/Apaf-1 dependiente de la mitocondria pareció poco probable, debido a la falta de actividad de la caspasa-9 y la caspasa-3. De acuerdo con los resultados, la caspasa-3 no es activada durante la AG. Únicamente se observó un incremento modesto y transitorio después de 2 h de RG, el cual disminuyó después. La falta de activación de la caspasa-3 durante la AG puede ser explicada por la falta de energía necesaria para la formación del apoptosoma y la subsecuente activación de la caspasa-9 y -3, ya que una rápida disminución en los niveles de ATP es observada después de retirar la glucosa (Páramo et al. 2010). La actividad de la caspasa-3 después de 2 h de RG podría resultar de una recuperación parcial del ATP durante este periodo (Martínez-Sánchez et al. 2004). De hecho, el fragmento activo de 17 kDa de la caspasa-3 es detectable a periodos de tiempo largos después de la RG (4-6 h), aunque no fue posible detectar la actividad catalítica, sugiriendo una activación marginal de esta caspasa bajo las presentes condiciones experimentales.

En este sentido, existe una diferencia importante entre los resultados observados y los ensayos usados para detectar la actividad de la caspasa-3. Como se mencionó antes, únicamente observamos actividad de la caspasa-3 después de 2 h de RG (usando un ensayo fluorométrico). Sin embargo, cuando la activación de dicha caspasa fue evaluada utilizando un ensayo de inmunoblot fue

posible observar la generación del fragmento activo después de 2, 4 y 6 h de RG. Esta discrepancia resulta difícil de explicar debido a que se sabe que el método más directo y cuantitativo para medir la actividad de una caspasa es el uso de ensayos fluorométricos con péptidos sintéticos usados como sustratos. También, cabe mencionar que en el presente trabajo usamos la técnica de inmunoblot para la detección de la actividad de la caspasa-3 como un método cualitativo, mostrando únicamente un inmunoblot representativo sin realizar un análisis densitométrico de dichas bandas. Además, es importante mencionar que los extractos celulares usados normalmente en los ensayos fluorométricos contienen muchas caspasas y algunas veces no es posible distinguir cuales caspasas contribuyen a la actividad usando los sustratos, debido a que la mayoría de los sustratos de caspasas usados comúnmente pueden ser cortados por más de una caspasa, aunque con eficiencias diferentes. Además, la abundancia de caspasas individuales en un tipo celular puede variar enormemente, por lo tanto, la relativa contribución de una sola caspasa para cortar un sustrato es siempre difícil de evaluar (Kumar 2004).

Otros estudios han reportado un leve o nulo incremento en la actividad de la caspasa-3 durante la OGD y la OGSD, mientras que el pico de activación es observado durante el periodo de recuperación (Zhang et al. 2010; Malagelada et al. 2005). Además, en un estudio *in vivo* de hipoglucemia, un modesto incremento en la actividad de la caspasa-3 es transitoriamente observado después de la reperusión de glucosa, mientras que no se detecta ninguna actividad durante el episodio hipoglucémico, presumiblemente debido a la falta de energía (Ferrand-Drake et al. 2003). Por otro lado, la caspasa-12, una caspasa murina asociada con la membrana del RE, es activada por apoptosis inducida por estrés reticular pero no por apoptosis mediada por receptores de muerte o por la mitocondria (Nakagawa et al. 2000; Rao et al. 2002). En el presente estudio, observamos un incremento en la actividad de la caspasa-12 desde 1 y hasta 2 h después de la AG. Esos resultados coinciden con observaciones previas que muestran el corte de la caspasa-12 en varios modelos de falla energética incluyendo OGD en neuronas corticales cultivadas (Badiola et al. 2011), OGSD en astrocitos de

médula espinal (Zhang et al. 2010), hipoxia-isquemia en ratas (Badiola et al. 2011) e isquemia *in vivo* (Mouw et al. 2003; Shibata et al. 2003; Liu et al. 2009). Además, una rápida activación de la caspasa-12 ha sido observada después del daño excitotóxico elucidado por la exposición al kainato en neuronas hipocampales cultivadas (Sokka et al. 2007).

La activación de la caspasa-12 por estrés reticular puede ser el resultado de diversos procesos: corte por la proteasa dependiente de calcio, calpaína (Nakagawa y Yuan 2000; Badiola et al. 2011; Martínez et al. 2010); dimerización y activación seguida de la formación del complejo IRE1-TRAF2 (Yoneda et al. 2001); y el corte por la caspasa-7 (Rao et al. 2001; Martínez et al. 2010; Tan et al. 2006). Los presentes resultados muestran que la actividad de la caspasa-12 es inducida por la AG y es inhibida significativamente en presencia del inhibidor de la caspasa-3/7, DEVDCHO, sugiriendo procesamiento y activación de la caspasa-12 por caspasa-7, en concordancia con los resultados reportados por otros autores (Martínez et al. 2010). Además, la activación de la caspasa-12 puede resultar del procesamiento mediado por calpaína. Previamente reportamos que la concentración de calcio intracelular incrementa rápida y progresivamente después de retirar la glucosa a las neuronas de hipocampo cultivadas (Páramo et al. 2010), lo cual provoca una rápida activación de la calpaína (Páramo et al. 2013). Por lo tanto, en las presentes condiciones experimentales, la calpaína y la caspasa-7 contribuyen a la activación de la caspasa-12. Martínez y colaboradores (2010) reportaron que la actividad de la caspasa-12 en células PC12 en respuesta a la exposición a Tg resulta del procesamiento mediado por calpaína y caspasa-7, y que el corte mediado por calpaína precede al mediado por caspasa-7. En contraste, en el presente estudio observamos una rápida activación de caspasa-7 y de acuerdo a nuestras recientes observaciones, la activación de la calpaína es también rápidamente inducida después de retirar la glucosa (Páramo et al. 2013). Ésto sugiere que el procesamiento de la caspasa-12 por esas dos proteasas ocurre rápida y simultáneamente después de la AG. En consecuencia, observamos que el DEVDCHO y el MDL-28170, inhibieron eficientemente el procesamiento de la procaspasa-12 en su fragmento activo y la actividad catalítica

de dicha caspasa, como se evaluó por el corte del sustrato fluorogénico Ac-ATAD-AFC 1 h después de la AG. Además, el DEVDCHO, el MDL-28170 y el inhibidor de la caspasa-12, Q-ATAD, previnieron eficientemente la muerte neuronal, sugiriendo que la caspasa-12 es activada por la caspasa-7 y/o por la calpaína, y es un importante ejecutor del daño inducido por la AG.

Las alteraciones en la homeostasis de calcio y la acumulación de proteínas mal plegadas/no plegadas dentro del lumen del RE causan estrés reticular y conducen a la muerte celular. La activación de la UPR ha sido ampliamente reportada durante la isquemia cerebral focal o global transitoria (Kumar et al. 2001; Paschen et al. 2003; Shibata et al. 2003; Tajiri et al. 2004; Hayashi et al. 2005; Morimoto et al. 2007; Nakka et al. 2010), el trauma cerebral (Larner et al. 2004, 2005) y en modelos *in vitro* de OGD (Benavides et al. 2005; Zhang et al. 2010; Badiola et al. 2011). Sin embargo, el papel del estrés reticular en el daño hipoglucémico no ha sido elucidado. En este trabajo, observamos una rápida fosforilación de eIF2 $\alpha$  después de 0.5 h de AG. El grado de fosforilación de eIF2 $\alpha$  se evalúa normalmente por inmunoblot usando anticuerpos específicos que reconocen a eIF2 $\alpha$  fosforilado en la serina 51 y en algunas ocasiones también se reportan los niveles de eIF2 $\alpha$  total (fosforilado y no fosforilado). En este caso, se espera que los niveles de eIF2 $\alpha$  total se mantengan sin cambios durante los distintos tratamientos y únicamente se altere el estatus de fosforilación de la proteína. En concordancia con otros autores (Hong et al. 2011; Torres-Peraza et al. 2013), en este trabajo mostramos solamente el incremento en los niveles de p-eIF2 $\alpha$  después de exponer los cultivos a la AG durante diferentes periodos de tiempo. La fosforilación de eIF2 $\alpha$  conduce a una inhibición global de la síntesis de proteínas. No obstante, algunos RNAs mensajeros que contienen uORFs en su extremo 5' pueden escapar del bloqueo de la traducción, tal es el caso de ATF4. Observamos también, un incremento en los niveles de ATF4 después de 0.5 h de AG. En concordancia con esas observaciones, en un modelo de oclusión de la arteria carótida bilateral y en un modelo de OGD en neuronas corticales, se ha observado una rápida fosforilación de eIF2 $\alpha$  y de PERK (Kumar et al. 2001; Badiola et al. 2011). Asimismo, se ha observado la inducción de ATF4 después de

la isquemia cerebral global, la oclusión permanente de la arteria cerebral media, la OGD y la OGSD (Hayashi et al. 2005; Morimoto et al. 2007; Zhang et al. 2010; Badiola et al. 2011).

CHOP es un factor de transcripción pro-apoptótico expresado a niveles muy bajos en condiciones fisiológicas, pero que es inducido fuertemente en respuesta al estrés reticular provocado por la isquemia cerebral y los modelos *in vitro* de OGD (Benavides et al. 2005). Estudios previos muestran que el mRNA de CHOP es inducido en el cerebro de ratones expuestos a la oclusión de la arteria carótida común bilateral (Tajiri et al. 2004). En nuestro modelo de AG no evaluamos la expresión del mRNA de CHOP, pero los resultados aquí presentados muestran claramente un incremento significativo en los niveles de la proteína CHOP después de 2 y 4 h de AG. Estos resultados están en concordancia con un estudio previo en donde utilizaron cultivos primarios de astrocitos y observaron un incremento en los niveles de la proteína CHOP, así como una sobrerregulación de su mRNA, los cuales fueron detectados inmediatamente después de exponer los cultivos de astrocitos a la OGD durante 4 h (Benavides et al. 2005). El incremento de CHOP que observamos seguido del aumento en los niveles de p-eIF2 $\alpha$  y ATF4, es consistente con la regulación hacia arriba de la expresión de CHOP por el factor de transcripción ATF4.

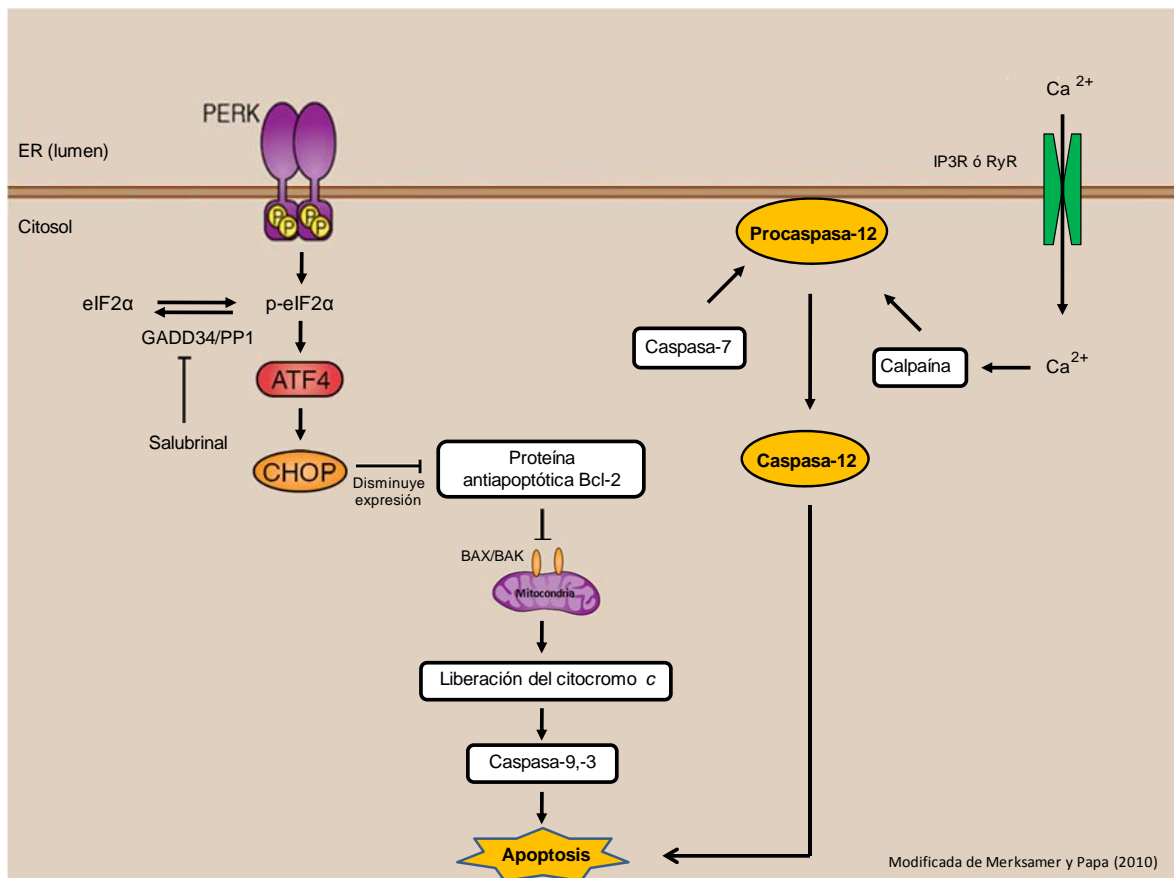
Por otro lado, niveles incrementados de la chaperona GRP78 fueron también observados en las presentes condiciones experimentales después de 2 y 4 h de AG, en concordancia con estudios previos que muestran inducción de chaperonas después de la MCAO y de la OGD (Shibata et al. 2003; Badiola et al. 2011). La regulación transcripcional de esta chaperona es mediada por la unión de factores de transcripción a secuencias ERSE presentes en su promotor. XBP1 y ATF6 son factores de transcripción relacionados con la UPR que pueden unirse a las secuencias ERSE y mediar la sobrerregulación de GRP78. Por lo tanto, en nuestras condiciones experimentales las vías de IRE1 y de ATF6 podrían también ser activadas. Ha sido demostrado que la vía de IRE1 de la UPR se induce en neuronas de corteza y de hipocampo cultivadas expuestas a OGD, ya que se ha observado el corte de XBP1 durante el periodo de recuperación (Badiola et al.

2011; Ibuki et al. 2012). El estudio de Ibuki y colaboradores (2012) demostró un corte rápido y transitorio de XBP1 inmediatamente después de la OGD, el cual es suprimido durante las primeras horas de reoxigenación y restaurado de nuevo después de 20-28 h de recuperación. Este segundo pico de corte de XBP1 está relacionado con la sobrevivencia neuronal, debido a que las células que sobre expresan XBP1 cortado fueron más resistentes a la OGD, posiblemente debido a la sobrerregulación de las chaperonas del RE y la transcripción de genes involucrados en la degradación de proteínas no plegadas. De acuerdo con esto, una activación rápida y transitoria de la vía de PERK después de la OGD ha sido reportada (Badiola et al. 2011), mientras que el corte de XBP1 fue observado a tiempos posteriores después de la recuperación, sugiriendo que la activación de la vía de IRE1 es una respuesta tardía a la OGD. Sin embargo, más experimentos son necesarios para determinar si la vía de IRE1 es activada en las presentes condiciones experimentales durante la AG o la RG.

Los datos presentados en este trabajo indican que la activación rápida de la vía de la UPR mediada por PERK participa en la muerte neuronal inducida por la AG, debido a que el salubrinal efectivamente incrementa la sobrevivencia celular. El salubrinal inhibe a GADD34, una subunidad de la fosfatasa responsable de la desfosforilación de eIF2 $\alpha$ , manteniendo abatida la síntesis de proteínas y mitigando el estrés reticular (Boyce et al. 2005). Además, el salubrinal también inhibió el procesamiento y la actividad de la caspasa-12 sugiriendo la activación de esta caspasa después del estrés reticular. El efecto protector del salubrinal ha sido previamente observado en diferentes condiciones asociadas con estrés reticular, tales como, la acumulación de la huntingtina mutante en la enfermedad de Huntington (Reijonen et al. 2008), la acumulación de superóxido dismutasa en un modelo de esclerosis lateral amiotrófica (Saxena et al. 2009) y la exposición al ácido kaínico (Sokka et al. 2007). En las presentes condiciones experimentales, el estrés reticular podría resultar de la falla energética y la pérdida de la homeostasis de calcio, ya que previamente demostramos una importante disminución en los niveles de ATP, así como, un incremento en las concentraciones intracelulares de calcio después de la AG (Páramo et al. 2010).

## IX. CONCLUSIONES

En conjunto, las presentes observaciones sugieren que el estrés reticular es inducido durante la AG y contribuye a la muerte neuronal a través de la activación de la vía de PERK de la UPR y de la caspasa-12. Además, los resultados demuestran que la activación de la caspasa-12 mediada por la calpaína y la caspasa-7 participa en la ejecución de la muerte neuronal, mientras que la vía mitocondrial dependiente de caspasas tendría un papel marginal. En la Figura 12 se resumen las vías propuestas identificadas en este estudio que llevarían a la inducción de la apoptosis. Estos resultados contribuyen al conocimiento de los mecanismos responsables de la muerte neuronal asociada con la hipoglucemia.



**Fig. 12** La activación de la vía de PERK de la UPR y la caspasa-12 contribuyen a la muerte neuronal durante la ausencia de glucosa. PERK activada induce la fosforilación de eIF2 $\alpha$  provocando una inhibición de la síntesis de proteínas. No obstante, bajo estas condiciones ATF4 puede ser traducido. Esta inhibición en la síntesis de proteínas puede ser mantenida por el salubrinal, el cual inhibe a GADD34, una subunidad de la fosfatasa PP1 responsable de la desfosforilación de p-eIF2 $\alpha$ .



ATF4 induce la expresión de CHOP y éste promueve la apoptosis por regulación a la baja de la proteína anti-apoptótica Bcl-2. Esto induce la salida del citocromo *c* a través de Bax/Bak provocando activación de la caspasa-9 y -3 y apoptosis. Por otro lado, la salida de calcio del RE provoca un incremento en la concentración de este catión y la activación de la proteasa calpaína. La calpaína corta y activa a la procaspasa-12. La procaspasa-12 puede también ser cortada y activada por acción de la caspasa-7. La caspasa-12 activada puede inducir muerte apoptótica sin activación de la vía mitocondrial

## X. REFERENCIAS

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P (2014) Intracellular compartments and protein sorting. *Molecular biology of the cell*, 6th edn. Garland Science, New York, pp 723-745
- Attwell D, Laughlin SB (2001) An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:1133–1145
- Auer RN (1986) Progress review: hypoglycemic brain damage. *Stroke* 17:699–70
- Auer RN, Wieloch T, Olsson Y, Siesjö BK (1984) The distribution of hypoglycemic brain damage. *Acta Neuropathol* 64:177–191
- Back SH, Kaufman RJ (2012) Endoplasmic reticulum stress and type 2 diabetes. *Annu Rev Biochem* 81:767–793
- Badiola N, Penas C, Miñano-Molina A, Barneda-Zahonero B, Fadó R, Sánchez-Opazo G, Comella JX, Sabriá J, Zhu C, Blomgren K, Casas C, Rodríguez-Alvarez J (2011) Induction of ER stress in response to oxygen-glucose deprivation of cortical cultures involves the activation of the PERK and IRE-1 pathways and of caspase-12. *Cell Death Dis* 2:1-8
- Barbero-Camps E, Fernández A, Baulies A, Martinez L, Fernández-Checa JC, Colell A (2014) Endoplasmic reticulum stress mediates amyloid  $\beta$  neurotoxicity via mitochondrial cholesterol trafficking. *Am J Pathol* 184:2066-2081
- Bélanger M, Allaman I, Magistretti PJ (2011) Brain energy metabolism: Focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metab* 14:724-738
- Benavides A, Pastor D, Santos P, Tranque P, Calvo S (2005) CHOP plays a pivotal role in the astrocyte death induced by oxygen and glucose deprivation. *Glia* 52:261–275
- Bonilla M, Nastase KK, Cunningham KW (2002) Essential role of calcineurin in response to endoplasmic reticulum stress. *EMBO J* 21:2343-2353

- Boyce M, Bryant KF, Jousse C, Long K, Harding HP, Scheuner D, Kaufman RJ, Ma D, Coen DM, Ron D, Yuan J (2005) A Selective inhibitor of eIF2 $\alpha$  dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science* 307:935-939
- Broughton BR, Reutens DC, Sobey CG (2009) Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke* 40:331-339
- Calfon M, Zeng H, Urano F, Till JH, Hubbard SR, Harding HP, Clark SG, Ron D (2002) IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* 415:92-96
- Camacho A, Massieu L (2006) Role of glutamate transporters in the clearance and release of glutamate during ischemia and its relation to neuronal death. *Arch Med Res* 37:11–18
- Cao SS, Kaufman RJ (2012) Unfolded protein response. *Curr Biol* 22:622-626
- Carrara M, Prischi F, Ali MU (2013) UPR signal activation by luminal sensor domains. *Int J Mol Sci* 14:6454-6466
- Castrejón V, Carbó S, Martínez M (2007) Mecanismos moleculares que intervienen en el transporte de la glucosa. *REB* 26:49-57
- Chakrabarti A, Chen AW, Varner JD (2011) A review of the mammalian unfolded protein response. *Biotechnol Bioeng* 108:2777-2793
- Chen L, Gao X (2002) Neuronal apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Neurochem Res* 27:891–898
- Chen X, Kintner DB, Luo J, Baba A, Matsuda T, Sun D (2008) Endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> dysregulation and endoplasmic reticulum stress following *in vitro* neuronal ischemia: role of Na<sup>+</sup> -K<sup>+</sup> -Cl<sup>-</sup> cotransporter. *J Neurochem* 106:1563-1576
- Chen Y, Brandizzi F (2013) IRE1: ER stress sensor and cell fate executor. *Trends Cell Biol* 23:547-555

- Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK (2008) Caspases - An update. *Comp Biochem Physiol B* 151:10–27
- Chun HS, Lee H, Son JH (2001) Manganese induces endoplasmic reticulum (ER) stress and activates multiple caspases in nigral dopaminergic neuronal cells, SN4741. *Neurosci Lett* 316:5–8
- Clarke DD, Sokoloff L (1999) Circulation and energy metabolism of the brain. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK (eds) *Basic Neurochemistry: Molecular, cellular, and medical aspects*, 6th edn. Lippincott-Raven, Philadelphia, pp 637–669
- Coe H, Michalak M (2009) Calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *Gen Physiol Biophys* 28:96-103
- Creagh EM (2014) Caspase crosstalk: integration of apoptotic and innate immune signalling pathways. *Trends Immunol* 35:631-640
- Cullinan SB, Diehl JA (2006) Coordination of ER and oxidative stress signaling: The PERK/Nrf2 signaling pathway. *Int J Biochem Cell Biol* 38:317–332
- Cryer PE (2006) Mechanisms of sympathoadrenal failure and hypoglycemia in diabetes. *J Clin Invest* 116:1470–1473
- Cryer PE (2007) Hypoglycemia, functional brain failure, and brain death. *J Clin Invest* 117:868-870
- DeGracia DJ, Kumar R, Owen CR, Krause GS, White BC (2002) Molecular pathways of protein synthesis inhibition during brain reperfusion: implications for neuronal survival or death. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:127-141
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22:391–397
- Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP (2008) Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacol* 55:310-318

- Durukan A, Tatlisumak T (2007) Acute ischemic stroke: Overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol Biochem Behav* 87:179–197
- Espinosa-García C, Viguera-Villaseñor RM, Rojas-Castañeda JC, Aguilar-Hernández A, Monfil T, Cervantes M, Morali G (2013) Post-ischemic administration of progesterone reduces caspase-3 activation and DNA fragmentation in the hippocampus following global cerebral ischemia. *Neurosci Lett* 550:98–103
- Ferrand-Drake M, Zhu C, Gidö G, Hansen AJ, Karlsson JO, Bahr BA, Zamzami N, Kroemer G, Chan PH, Wieloch T, Blomgren K (2003) Cyclosporin A prevents calpain activation despite increased intracellular calcium concentrations, as well as translocation of apoptosis-inducing factor, cytochrome c and caspase-3 activation in neurons exposed to transient hypoglycemia. *J Neurochem* 85:1431–1442
- Friberg H, Ferrand-Drake M, Bengtsson F, Halestrap AP, Wieloch T (1998) Cyclosporin A, but not FK 506 protects mitochondria and neurons against hypoglycemic damage and implicates the mitochondrial permeability transition in cell death. *J Neurosci* 18:5151-5159
- Fonseca AC, Ferreira E, Oliveira CR, Cardoso SM, Pereira CF (2013) Activation of the endoplasmic reticulum stress response by the amyloid-beta 1–40 peptide in brain endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1832:2191–2203
- Fujita E, Kouroku Y, Jimbo A, Isoai A, Maruyama K, Momoi T (2002) Caspase-12 processing and fragment translocation into nuclei of tunicamycin-treated cells. *Cell Death Differ* 9:1108-1114
- García de la Cadena S, Hernández-Fonseca K, Camacho-Arroyo I, Massieu L (2014) Glucose deprivation induces reticulum stress by the PERK pathway and caspase-7- and calpain-mediated caspase-12 activation. *Apoptosis* 19:414-427
- Gardner BM, Pincus D, Gotthardt K, Gallagher CM, Walter P (2013) Endoplasmic reticulum stress sensing in the unfolded protein response. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5:1-15

- Haces ML, Massieu-Trigo L (2005) Mecanismos de muerte neuronal asociados a la hipoglucemia. *Arch Neurocién Mex* 10:83-91
- Halestrap AP, Wilson MC (2012) The Monocarboxylate transporter family—role and regulation. *IUBMB Life* 64:109–119
- Halperin L, Jung J, Michalak M (2014) The many functions of the endoplasmic reticulum chaperones and folding enzymes. *Biochem Mol Biol Int* 66:318–326
- Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calton M, Sadri N, Yun C, Popko B, Paules R, Stojdl DF, Bell JC, Hettmann T, Leiden JM, Ron D (2003) An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell* 11:619–633
- Hayashi T, Saito A, Okuno S, Ferrand-Drake M, Dodd RL, Chan PH (2005) Damage to the endoplasmic reticulum and activation of apoptotic machinery by oxidative stress in ischemic neurons. *J Cereb Blood Flow Metab* 25:41–53
- Healy SJ, Gorman AM, Mousavi-Shafaei P, Gupta S, Samali A (2009) Targeting the endoplasmic reticulum-stress response as an anticancer strategy. *Eur J Pharmacol* 625:234–246
- Heath-Engel HM, Chang NC, Shore GC (2008) The endoplasmic reticulum in apoptosis and autophagy: role of the BCL-2 protein family. *Oncogene* 27:6419–6433
- Henderson MJ, Baldwin HA, Werley CA, Boccardo S, Whitaker LR, Yan X, Holt GT, Schreiter ER, Looger LL, Cohen AE, Kim DS, Harvey BK (2015) A low affinity GCaMP3 variant (GCaMP<sub>er</sub>) for imaging the endoplasmic reticulum calcium store. *PLoS One* 10:1-17
- Hernández-Fonseca K, Massieu L (2005) Disruption of endoplasmic reticulum calcium stores is involved in neuronal death induced by glycolysis inhibition in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci Res* 82:196–205

- Hertz L (2008) Bioenergetics of cerebral ischemia: A cellular perspective. *Neuropharmacol* 55:289–309
- Hetz C (2012) The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Mol Cell Biol* 32:362–372
- Hong DY, Kwon K, Lee KR, Choi YJ, Goo TW, Yu K, Kim SW, Kwon OY (2011) Lidocaine induces endoplasmic reticulum stress-associated apoptosis in vitro and in vivo. *Int J Mol Sci* 12:7652-7661
- Ibuki T, Yamasaki Y, Mizuguchi H, Sokabe M (2012) Protective effects of XBP1 against oxygen and glucose deprivation/reoxygenation injury in rat primary hippocampal neurons. *Neurosci Lett* 518:45-48
- Jiang Y, Lv H, Liao M, Xu X, Huang S, Tan H, Peng T, Zhang Y, Li H (2012) GRP78 counteracts cell death and protein aggregation caused by mutant huntingtin proteins. *Neurosci Lett* 516:182–187
- Jordán J, Galindo MF, Ceña V, González-García C (2000) Cisteína proteasas y neurodegeneración. *Rev Neurol* 31:333-340
- Kang EB, Kwon IS, Koo JH, Kim EJ, Kim CH, Lee J, Yang CH, Lee YI, Cho IH, Cho JY (2013) Treadmill exercise represses neuronal cell death and inflammation during A $\beta$ -induced ER stress by regulating unfolded protein response in aged presenilin 2 mutant mice. *Apoptosis* 18:1332-1347
- Khowaja A, Choi IY, Seaquist ER, Öz G (2015) In vivo Magnetic Resonance Spectroscopy of cerebral glycogen metabolism in animals and humans. *Metab Brain Dis* 30:255–261
- Kim I, Xu W, Reed JC (2008) Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 7:1013-1030
- Kosuge Y, Imai T, Kawaguchi M, Kihara T, Ishige K, Ito Y (2008) Subregion-specific vulnerability to endoplasmic reticulum stress-induced neurotoxicity in rat hippocampal neurons. *Neurochem Int* 52:1204–1211

- Kouroku Y, Fujita E, Jimbo A, Kikuchi T, Yamagata T, Momoi MY, Kominami E, Kuida K, Sakamaki K, Yonehara S, Momoi T (2002) Polyglutamine aggregates stimulate ER stress signals and caspase-12 activation. *Hum Mol Genet* 11:1505–1515
- Krebs J, Agellon LB, Michalak M (2015) Ca<sup>2+</sup> homeostasis and endoplasmic reticulum (ER) stress: An integrated view of calcium signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 460:114-121
- Kumar R, Azam S, Sullivan JM, Owen C, Cavener DR, Zhang P, Ron D, Harding HP, Chen JJ, Han A, White BC, Krause GS, DeGracia DJ (2001) Brain ischemia and reperfusion activates the eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$  kinase, PERK. *J Neurochem* 77:1418-1421
- Kumar S (2004) Measurement of caspase activity in cells undergoing apoptosis. *Methods Mol Biol* 282:19-30
- Lai E, Teodoro T, Volchuk A (2007) Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response. *Physiology* 22:193–201
- Languren G, Montiel T, Julio-Amilpas A, Massieu L (2013) Neuronal damage and cognitive impairment associated with hypoglycemia: An integrated view. *Neurochem Int* 63:331-343
- Larner SF, Hayes RL, McKinsey DM, Pike BR, Wang KKW (2004) Increased expression and processing of caspase-12 after traumatic brain injury in rats. *J Neurochem* 88:78–90
- Larner SF, McKinsey DM, Hayes RL, Wang KKW (2005) Caspase-7: increased expression and activation after traumatic brain injury in rats. *J Neurochem* 94:97–108
- Lee K, Tirasophon W, Shen X (2002) IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. *Genes Dev* 16:452-466
- Liu HJ, Yang JP, Wang CH, Liu RC, Li Y, Li CY (2009) Endoplasmic reticulum in the penumbra following middle cerebral artery occlusion in the rabbit. *Neurol Sci* 30:227–232



- Logue SE, Cleary P, Saveljeva S, Samali A (2013) New directions in ER stress-induced cell death. *Apoptosis* 18:537-546
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J Biol Chem* 193:265-275
- Maher F, Vannucci SJ, Simpson IA (1994) Glucose transporter proteins in brain. *FASEB J* 8:1003-1011
- Malagelada C, Xifró X, Miñano A, Sabriá J, Rodríguez-Alvarez J (2005) Contribution of caspase-mediated apoptosis to cell death caused by oxygen-glucose deprivation in cortical cell cultures. *Neurobiol Dis* 20:27–37
- Malhotra JD, Kaufman RJ (2007) The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Semin Cell Dev Biol* 18:716–731
- Mao W, Iwai C, Keng PC, Vulapalli R, Liang C (2006) Norepinephrine-induced oxidative stress causes PC-12 cell apoptosis by both endoplasmic reticulum stress and mitochondrial intrinsic pathway: inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase survival pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* 290:1373-1384
- Martinez JA, Zhang Z, Svetlov SI, Hayes RL, Wang KK, Larner SF (2010) Calpain and caspase processing of caspase-12 contribute to the ER stress-induced cell death pathway in differentiated PC12 cells. *Apoptosis* 15:1480–1493
- Martínez-Sánchez M, Striggow F, Schröder UH, Kahlert S, Reymann KG, Reiser G (2004) Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> homeostasis pathways, cell death and protection after oxygen–glucose-deprivation in organotypic hippocampal slice cultures. *Neuroscience* 128:729-740
- McCall AL (2004) Cerebral glucose metabolism in diabetes mellitus. *Eur J Pharmacol* 490:147–158
- McCullough KD, Martindale JL, Klotz L, Aw T, Holbrook NJ (2001) Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol* 21:1249–1259

- McKenna MC, Gruetter R, Sonnewald U, Waagepetersen HS, Schousboe A (2006) Energy metabolism of the brain. In: Siegel GJ, Albers RW, Brady ST, Price DL (ed) *Basic Neurochemistry. Molecular, cellular and medical aspects*, 7th edn. Academic Press, Massachusetts, pp 531-557
- McIlwain DR, Berger T, Mak TW (2013) Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5:1-28
- Mercado G, Valdés P, Hetz C (2013) An ERcentric view of Parkinson's disease. *Trends Mol Med* 19:165-175
- Mergenthaler P, Lindauer U, Dienel GA, Meisel A (2013) Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends Neurosci* 36:587-597
- Merksamer PI, Papa FR (2010) The UPR and cell fate at a glance. *J Cell Sci* 123:1003-1006
- Messari SE, Leloup C, Quignon M, Brisorgueil MJ, Penicaud L, Arluison M (1998) Immunocytochemical localization of the insulin-responsive glucose transporter 4 (glut4) in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 399:492–512
- Morimoto N, Oida Y, Shimazawa M, Miura M, Kudo T, Imaizumi K, Hara H (2007) Involvement of endoplasmic reticulum stress after middle cerebral artery occlusion in mice. *Neuroscience* 147:957–967
- Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T, Yasuhiko Y (2002) An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome *c*-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem* 277:34287–34294
- Mouw G, Zechel JL, Gamboa J, Lust WD, Selman WR, Ratcheson RA (2003) Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum resident caspase, after permanent focal ischemia in rat. *Neuroreport* 14:183-186
- Nagata T, Ilieva H, Murakami T, Shiote M, Narai H, Ohta Y, Hayashi T, Shoji M, Abe K (2007) Increased ER stress during motor neuron degeneration in

a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Res* 29:767-771

- Nakagawa T, Yuan J (2000) Cross-talk between two cysteine protease families: activation of Caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol* 150:887–894
- Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J (2000) Caspase-12 mediates endoplasmic reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- $\beta$ . *Nature* 403:98-103
- Nakka VP, Gusain A, Raghubir R (2010) Endoplasmic reticulum stress plays critical role in brain damage after cerebral ischemia/reperfusion in rats. *Neurotox Res* 17:189-202
- Novoa I, Zeng H, Harding HP, Ron D (2001) Feedback inhibition of the unfolded protein response by *GADD34*-mediated dephosphorylation of eIF2 $\alpha$ . *J Cell Biol* 153:1011–1021
- Oh Yk, Shin KS, Yuan J, Kang SJ (2008) Superoxide dismutase 1 mutants related to amyotrophic lateral sclerosis induce endoplasmic stress in neuro2a cells. *J Neurochem* 104:993-1005
- Oyadomari S, Mori M (2004) Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ* 11:381–389
- Öz G, DiNuzzo M, Kumar A, Moheet A, Seaquist ER (2015) Revisiting Glycogen Content in the Human Brain. *Neurochem Res* 40:2473-2481
- Páramo B, Hernández-Fonseca K, Estrada-Sánchez AM, Jiménez N, Hernández-Cruz A, Massieu L (2010) Pathways involved in the generation of reactive oxygen and nitrogen species during glucose deprivation and its role on the death of cultured hippocampal neurons. *Neuroscience* 167:1057–1069
- Páramo B, Montiel T, Hernández-Espinosa DR, Rivera-Martínez M, Morán J, Massieu L (2013) Calpain activation induced by glucose deprivation is mediated by oxidative stress and contributes to neuronal damage. *Int J Biochem Cell Biol* 45:2596–2604

- Park HH (2012) Structural features of caspase-activating complexes. *Int J Mol Sci* 13:4807-4818
- Parmar VM, Schröder M (2012) Sensing endoplasmic reticulum stress. *Adv Exp Med Biol* 738:153-168
- Parrish AB, Freel CD, Kornbluth S (2013) Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harbor Perspect Biol* 5:1-24
- Paschen W, Aufenberg C, Hotop S, Mengesdorf T (2003) Transient cerebral ischemia activates processing of xbp1 messenger RNA indicative of endoplasmic reticulum stress. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:449–461
- Paschen W, Gissel C, Linden T, Althausen S, Doutheil J (1998) Activation of gadd153 expression through transient cerebral ischemia: evidence that ischemia causes endoplasmic reticulum dysfunction. *Mol Brain Res* 60:115–122
- Paschen W, Mengesdorf T (2005) Endoplasmic reticulum stress response and neurodegeneration. *Cell Calcium* 38:409–415
- Peng S, Kuang Z, Zhang Y, Xu H, Cheng Q (2011) The protective effects and potential mechanism of calpain inhibitor calpeptin against focal cerebral ischemia–reperfusion injury in rats. *Mol Biol Rep* 38:905–912
- Pierre K, Pellerin L (2005) Monocarboxylate transporters in the central nervous system: distribution, regulation and function. *J Neurochem* 94:1–14
- Raghubir R, Nakka VP, Mehta SL (2011) Endoplasmic reticulum stress in brain damage. *Methods Enzymol* 489:259–275
- Rasheva VI, Domingos P (2009) Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis* 8:996-1007
- Rao RV, Castro-Obregon S, Frankowski H, Schuler M, Stoka V, del Rio G, Bredesen DE, Ellerby HM (2002) Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. An Apaf-1-independent intrinsic pathway. *J Biol Chem* 277:21836–21842

- Rao RV, Ellerby HM, Bredesen DE (2004) Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death Differ* 11:372–380
- Rao RV, Hermel E, Castro-Obregon S, Del Rio G, Ellerby LM, Ellerby HM, Bredesen DE (2001) Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation. *J Biol Chem* 276:33869–33874
- Reddy RK, Mao C, Baumeister P, Austin RC, Kaufman RJ, Lee AS (2003) Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors. *J Biol Chem* 278:20915–20924
- Reijonen S, Putkonen N, Nørremølle A, Lindholm D, Korhonen L (2008) Inhibition of endoplasmic reticulum stress counteracts neuronal cell death and protein aggregation caused by N-terminal mutant huntingtin proteins. *Exp Cell Res* 314:950-960
- Reimertz C, Kögel D, Rami A, Chittenden T, Prehn JHM (2003) Gene expression during ER stress-induced apoptosis in neurons: induction of the BH3-only protein Bbc3/PUMA and activation of the mitochondrial apoptosis pathway. *J Cell Biol* 162:587–597
- Ron D (2002) Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. *J Clin Invest* 110:1383–1388
- Roussel BD, Kruppa AJ, Miranda E, Crowther DC, Lomas DA, Marciniak SJ (2013) Endoplasmic reticulum dysfunction in neurological disease. *Lancet Neurol* 12:105-118
- Roy S, Sharom JR, Houde C, Loisel TP, Vaillancourt JP, Shao W, Saleh M, Nicholson DW (2008) Confinement of caspase-12 proteolytic activity to autoprocessing. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:4133–4138
- Sandberg M, Butcher ST, Hagberg H (1986) Extracellular overflow of neuroactive amino acids during severe insulin-induced hypoglycemia: in vivo dialysis of the rat hippocampus. *J Neurochem* 47:178–184

- Saunders J, Ross HM (2002) Hypoglycemia. The classic healthcare handbook. Kensington, New York
- Saxena S, Cabuy E, Caroni P (2009) A role for motoneuron subtype-selective ER stress in disease manifestations of FALS mice. *Nature Neurosci* 12:627–636
- Schröder M, Kaufman RJ (2005) ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res* 569:29–63
- Shah K, DeSilva S, Abbruscato T (2012) The Role of Glucose Transporters in Brain Disease: Diabetes and Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci* 13: 12629-12655
- Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, Kumar S (2014) Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ* 21:1–14
- Shen J, Prywes R (2005) ER stress signaling by regulated proteolysis of ATF6. *Methods* 35:382–389
- Shibata M, Hattori H, Sasaki T, Gotoh J, Hamada J, Fukuuchi Y (2003) Activation of caspase-12 by endoplasmic reticulum stress induced by transient middle cerebral artery occlusion in mice. *Neuroscience* 118:491–499
- Simpson IA, Carruthers A, Vannucci SJ (2007) Supply and demand in cerebral energy metabolism: the role of nutrient transporters. *J Cereb Blood Flow Metab* 27:1766–1791
- Simpson IA, Dwyer D, Malide D, Moley KH, Travis A, Vannucci SJ (2008) The facilitative glucose transporter GLUT3: 20 years of distinction. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295: E242–E253
- Sokka AL, Putkonen N, Mudo G, Pryazhnikov E, Reijonen S, Khiroug L, Belluardo N, Lindholm D, Korhonen L (2007) Endoplasmic reticulum stress inhibition protects against excitotoxic neuronal injury in the rat brain. *J Neurosci* 27:901–908

- Suh, SW, Aoyama K., Chen Y, Garnier P, Matsumori Y, Gum E, Liu J, Swanson RA (2003) Hypoglycemic neuronal death and cognitive impairment are prevented by poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors administered after hypoglycemia. *J Neurosci* 23:10681–10690
- Suh SW, Garnier P, Aoyama K, Chen Y, Swanson RA (2004) Zinc release contributes to hypoglycemia-induced neuronal death. *Neurobiol Dis* 16:538–545
- Suh SW, Gum E, Hamby AM, Chan PH, Swanson RA (2007) Hypoglycemic neuronal death is triggered by glucose reperfusion and activation of neuronal NADPH oxidase. *J Clin Invest* 117:910–918
- Suh SW, Hamby AM, Gum ET, Shin BS, Won SJ, Sheline CT, Chan PH, Swanson RA (2008) Sequential release of nitric oxide, zinc, and superoxide in hypoglycemic neuronal death. *J Cereb Blood Flow Metab* 28:1697–1706
- Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM and Samali A (2006) Mediators of endoplasmic reticulum stress induced apoptosis. *EMBO rep* 7:880-885
- Tan Y, Dourdin N, Wu C, De Veyra T, Elce JS, Greer PA (2006) Ubiquitous calpains promote caspase-12 and JNK activation during endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J Biol Chem* 281:16016–16024
- Tajiri S, Oyadomari S, Yano S, Morioka M, Gotoh T, Hamada J-I, Ushio Y, Mori M (2004) Ischemia-induced neuronal cell death is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway involving CHOP. *Cell Death Differ* 11:403–415
- Thornberry NA, Lazebnik Y (1998) Caspases: enemies within. *Science* 281:1312-1316
- Torres-Peraza JF, Engel T, Martín-Ibáñez R, Sanz-Rodríguez A, Fernández-Fernández MR, Esgleas M, Canals JM, Henshall DC, Lucas JJ (2013) Protective neuronal induction of ATF5 in endoplasmic reticulum stress induced by status epilepticus. *Brain* 136:1161-1176
- Urra H, Dufey E, Lisbona F, Rojas-Rivera D, Hetz C (2013) When ER stress reaches a dead end. *Biochim Biophys Acta* 1833:3507–3517

- Vannucci SJ, Clark RR, Koehler-Stec E, Li K, Smith CB, Davies P, Maher F, Simpson IA (1998) Glucose transporter expression in brain: Relationship to cerebral glucose utilization. *Dev Neurosci* 20:369-379
- Vannucci SJ, Maher F, Simpson IA (1997) Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. *Glia* 21:2-21
- Verkhratsky A (2005). Physiology and pathophysiology of the calcium store in the endoplasmic reticulum of neurons. *Physiol Rev* 85:201-279
- Vijayalakshmi K, Alladi PA, Ghosh S, Prasanna VK, Sagar BC, Nalini A, Sathyaprabha TN, Raju TR (2011) Evidence of endoplasmic reticular stress in the spinal motor neurons exposed to CSF from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurobiol Dis* 41:695-705
- Wang S, Kaufman RJ (2012) The impact of the unfolded protein response on human disease. *J Cell Biol* 197:857-867
- Wek RC, Jiang HY, Anthony TG (2006) Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem Soc Trans* 34:7-11
- Wen XR, Fu YY, Liu HZ, Wu J, Shao XP, Zhang XB, Tang M, Shi Y, Ma K, Zhang F, Wang YW, Tang H, Han D, Zhang P, Wang SL, Xu Z, Song YJ (2015) Neuroprotection of sevoflurane against ischemia/reperfusion-induced brain injury through inhibiting JNK3/Caspase-3 by enhancing Akt signaling pathway. *Mol Neurobiol* 51:1-11
- Wieloch T (1985) Hypoglycemia-induced neuronal damage prevented by an N-methyl-D-aspartate antagonist. *Science* 230:681–683
- Wiesinger H, Hamprecht B, Dringen R (1997) Metabolic pathways for glucose in astrocytes. *Glia* 21:22-34
- Won SJ, Yoo BH, Kauppinen TM, Choi BY, Kim JH, Jang BG, Lee MW, Sohn M, Liu J, Swanson RA, Suh SW (2012) Recurrent/moderate hypoglycemia induces hippocampal dendritic injury, microglial activation, and cognitive impairment in diabetic rats. *J Neuroinflammation* 9:1–45



- Wootz H, Hansson I, Korhonen L, Näpänkangas U, Lindholm D (2004) Caspase-12 cleavage and increased oxidative stress during motoneuron degeneration in transgenic mouse model of ALS. *Biochem Biophys Res Commun* 322:281–286
- Xin Q, Ji B, Cheg B, Wang C, Liu H, Chen X, Chen J, Bai B (2014) Endoplasmic reticulum stress in cerebral ischemia. *Neurochem Int* 68:18-27
- Ye J, Rawson RB, Komuro R, Chen X, Davé UP, Prywes R, Brown MS, Goldstein JL (2000) ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell* 6:1355–1364
- Yoneda T, Imaizumi K, Oono K, Yui D, Gomi F, Katayama T, Tohyama M (2001) Activation of Caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *J Biol Chem* 276:13935–13940
- Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K (2001) XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 107:881–891
- Zeng XS, Jia JJ, Kwon Y, Wang SD, Bai J (2014) The role of thioredoxin-1 in suppression of endoplasmic reticulum stress in Parkinson disease. *Free Rad Biol Med* 67:10-18
- Zhang A, Zhang J, Sun P, Yao C, Su C, Sui T, Huang H, Cao X, Ge Y (2010) EIF2 $\alpha$  and caspase-12 activation are involved in oxygen–glucose–serum deprivation/restoration-induced apoptosis of spinal cord astrocytes. *Neurosci Lett* 478:32-36
- Zhu H, Zhu H, Xiao S, Sun H, Xie C, Ma Y (2012) Activation and crosstalk between the endoplasmic reticulum road and JNK pathway in ischemia-reperfusion brain injury. *Acta Neurochir* 154:1197–1203
- Zinszner H, Kuroda M, Wang XZ, Batchvarova N, Lightfoot RT, Remotti H, Stevens JL, Ron D (1998) CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev* 12:982–995

## XI. APÉNDICES

### Apéndice 1

**“Glucose deprivation induces reticulum stress by the PERK pathway and caspase-7- and calpain-mediated caspase-12 activation”.**

# Glucose deprivation induces reticulum stress by the PERK pathway and caspase-7- and calpain-mediated caspase-12 activation

Selene García de la Cadena · Karla Hernández-Fonseca · Ignacio Camacho-Arroyo · Lourdes Massieu

Published online: 2 November 2013  
© Springer Science+Business Media New York 2013

**Abstract** Glucose is the main energy source in brain and it is critical for correct brain functioning. Type 1 diabetic patients might suffer from severe hypoglycemia if exceeding insulin administration, which can lead to acute brain injury if not opportunely corrected. The mechanisms leading to hypoglycemic brain damage are not completely understood and the role of endoplasmic reticulum (ER) stress has not been studied. ER stress resulting from the accumulation of unfolded or misfolded proteins in the ER is counteracted by the unfolded protein response (UPR). When the UPR is sustained, apoptotic death might take place. We have examined UPR activation during glucose deprivation (GD) in hippocampal cultured neurons and its role in the induction of apoptosis. Activation of the PERK pathway of the UPR was observed, as increased phosphorylation of eIF2 $\alpha$  and elevated levels of the transcription factor ATF4, occurred 30 min after GD and the levels of the chaperone protein, GRP78 and the transcription factor CHOP, increased after

2 h of GD. In addition, we observed an early activation of caspase-7 and 12 during GD, while caspase-3 activity increased only transiently during glucose reintroduction. Inhibition of caspase-3/7 and the calcium-dependent protease, calpain, significantly decreased caspase-12 activity. The ER stress inhibitor, salubrinal prevented neuronal death and caspase-12 activity. Results suggest that the PERK pathway of the UPR is involved in GD-induced apoptotic neuronal death through the activation of caspase-12, rather than the mitochondrial-dependent caspase pathway. In addition, we show that calpain and caspase-7 are soon activated after GD and mediate caspase-12 activation and neuronal death.

**Keywords** Glucose deprivation · ER stress · PERK pathway · Caspase-12 · Caspase-7 · Calpain

## Abbreviations

ER	Endoplasmic reticulum
UPR	Unfolded protein response
GD	Glucose deprivation
GR	Glucose reintroduction,
GRP78	78-kDa Glucose-regulated protein
eIF2 $\alpha$	Eukaryotic translation initiation factor-2
ATF4	Activating transcription factor 4
CHOP	C/EBP homologous protein
QVDOPH	Q-Val-Asp-OPH
DEVCHO	Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-aldehyde
MDL-28170	<i>N</i> -Benzoyloxycarbonylvalylphenylalaninal
Q-ATAD	Q-Ala-Thr-Ala-Asp(OMe)-OPH
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide
STS	Staurosporine
Tg	Thapsigargin
Tm	Tunicamycin

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s10495-013-0930-7) contains supplementary material, which is available to authorized users.

S. G. de la Cadena · L. Massieu (✉)  
División de Neurociencias, Departamento de Neuropatología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70-253, Mexico, DF 04510, Mexico  
e-mail: lmassieu@ifc.unam.mx

K. Hernández-Fonseca  
Departamento de Neuroquímica, Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz”, Mexico, DF, Mexico

I. Camacho-Arroyo  
Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico, DF, Mexico

## Introduction

Glucose is the main fuel for brain. When blood glucose falls below 20 mg/dl for a period of 30 min or more massive neuronal death takes place in vulnerable regions such as the cortex and the hippocampus [1, 2]. Hypoglycemia is the main consequence of insulin treatment in type 1 diabetic patients with an intense glycemic control. These patients frequently experience periods of moderate hypoglycemia or even of severe hypoglycemia leading to coma, if exceeding the insulin dose, which can cause brain injury. The mechanisms leading to hypoglycemic neuronal death have not been completely elucidated but several factors have been implicated. Excitotoxicity was initially suggested as a mechanism involved in delayed neuronal death following the hypoglycemic coma, based on the protective effect of NMDA and non-NMDA receptor antagonists [3, 4]. Recent studies have suggested the contribution of other factors such as nitric oxide production, zinc release from nerve terminals and the activation of poly-(ADP ribose) polymerase-1 (PARP-1) [5–7]. The role of apoptosis has been little explored but some studies have suggested the participation of the caspase-dependent and independent mitochondrial apoptotic pathways, based on the increased activity of caspase-3, and the release of cytochrome c and the apoptosis inducing factor (AIF) from mitochondria, observed in the hippocampus of hypoglycemic rats after the coma [8, 9]. In vitro studies in cultured cells have also suggested the contribution of the mitochondrial-dependent apoptotic cascade in glucose deprivation (GD)-induced neuronal death [10, 11].

Apoptotic cell death can be the consequence of reticular stress. The endoplasmic reticulum (ER) is the main site for the biosynthesis of proteins and where post-translational modifications, folding and assembly of newly synthesized secretory proteins takes place [12]. In addition, the ER is a dynamic compartment with a substantial capacity to store and release calcium [13, 14]. Conditions such as GD, altered calcium homeostasis and free radical exposure lead to the accumulation of unfolded proteins in the ER, causing ER stress [15]. To cope with this adverse situation cells have evolved the unfolded protein response (UPR), which might induce apoptosis involving mitochondrial-dependent or—independent mechanisms if not opportunely corrected [16]. Mammalian UPR is initiated by three ER-resident transmembrane proteins: inositol-requiring enzyme 1 (IRE1), activating transcription factor 6 (ATF6) and RNA-dependent protein kinase-like ER kinase (PERK). Dissociation of the 78-kDa glucose-regulated protein (GRP78) triggers oligomerization, autophosphorylation and activation of IRE1 [17]. Activated IRE1 cleaves a 26-nucleotide intron from the X-box binding protein 1 (XBP1) mRNA, which is translated into a transcription factor that binds the

ER stress response element (ERSE) located in the promoter of target genes, including Grp78 and Grp94 [18]. Activated IRE1 also associates with tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 (TRAF2), leading to the activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1), which phosphorylates and activates c-Jun kinase (JNK) [19], promoting apoptosis by phosphorylating the anti-apoptotic proteins Bcl-2, Bcl-XL and Mcl-1. Furthermore, JNK can also phosphorylate and activate Bid and Bim to promote apoptosis [20]. After dissociation from GRP78, ATF6 is transported to the golgi apparatus, where it is cleaved by S1P (site 1) and S2P (site 2) proteases [21], releasing a transcriptional factor which induces genes containing ERSE such as Grp78, Grp94, protein disulphide isomerase, and the transcription factors CHOP and XBP1 [18]. PERK dissociation from GRP78 leads to the dimerization and autophosphorylation of its cytosolic domain [22]. PERK phosphorylates the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2 $\alpha$ ) leading to inhibition of global protein synthesis. However, phosphorylated eIF2 $\alpha$  (p-eIF2 $\alpha$ ) also initiates the translation of a small subpopulation of mRNAs that contain small upstream open reading frames (uORFs) in its 5' leader region [23], including activating transcription factor 4 (ATF4), which transcribes genes encoding proteins involved in amino acid transport, glutathione biosynthesis and resistance to oxidative stress [24]. However, ATF4 induces the transcription factor C/EBP homologous protein (CHOP), which promotes apoptotic cell death [25], through the transcription of genes involved in apoptosis and down regulation of Bcl-2 expression [15]. In addition to CHOP and JNK, activation of caspases is involved in the execution of ER stress-induced apoptosis [22]. In mice, procaspase-12 is located on the cytoplasmic side of the ER and is cleaved and specifically activated during ER stress [26, 27]. Several mechanisms have been proposed for caspase-12 activation. The cytoplasmic calcium-activated protease calpain can cleave and activate caspase-12 in response to calcium release from the ER during ER stress [27]; also the processing of procaspase-12 by caspase-7 has been reported. It is suggested that, caspase-7 translocates from the cytosol to the cytoplasmic side of the ER cleaving and activating caspase-12 [28]. Caspase-12 activation might also result from its dissociation from TRAF2 during ER stress, which leads to its dimerization and auto processing [29].

Previous studies have suggested the role of ER stress in the induction of apoptosis in in vivo models of ischemia [30–34] and during oxygen-glucose deprivation (OGD) in cultured neurons and astrocytes [35, 36]. These studies have demonstrated that the PERK and the IRE pathways are involved in apoptosis. Furthermore, caspase-12 activation has been shown to result from ER stress-induced apoptosis in in vivo models of ischemia [37–39] and during

OGD in cultured neurons [36]. However, the role of caspase-12 activation and reticular stress in hypoglycemic injury has not been reported.

As an *in vitro* model of hypoglycemia we have used hippocampal neurons exposed to glucose-free medium. Results indicate the presence of caspase-dependent apoptosis after exposing cells to GD. In addition, there is an increase in the levels of the reticular stress markers, p-eIF2 $\alpha$ , ATF4, CHOP and GRP78. Results suggest that apoptosis mainly results from ER stress and caspase-12 activation rather than from the activation of the mitochondrial apoptotic pathway. In addition, the present findings indicate that caspase-7 and calpain mediate caspase-12 activation.

## Experimental procedures

### Cell culture

Primary cultures of hippocampal neurons were prepared from Wistar rat embryos of 17–18 days of gestation as previously described [40]. Animals were handled and cared according to the NIH guide for care and use of laboratory animals (NIH Publications No. 80–23, revised in 1996) and with the local Animal Care Committee approval. All efforts were made in order to minimize animal suffering. Cells were suspended in Neurobasal culture medium [41] supplemented with B27 (Gibco, Rockville, MD, USA), 0.5 mM L-glutamine and 20  $\mu$ g/ml gentamicin (Sigma RBI, St. Louis, MO, USA), and plated at a density of 260–290  $\times 10^3$ /cm<sup>2</sup> in Costar 24-well plates (Cambridge, MA, USA) or in 35 mm dishes (Corning, NY, USA), precoated with poly-L-lysine (5  $\mu$ g/ml, Sigma RBI, St. Louis, MO, USA). Cells were cultured for 7 days *in vitro* (DIV) at 37 °C in a humidified 5 % CO<sub>2</sub>/95 % air atmosphere. Four days after plating, glucose (5 mM) and cytosine arabinoside (10  $\mu$ M, Sigma RBI, St. Louis, MO, USA) and fresh Neurobasal medium were added. After 7 DIV neurons were exposed to glucose-free medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM, Gibco, Rockville, MD, USA) for different periods of time.

### Neuronal survival

Cultures were exposed to glucose-free medium (DMEM) for 2 h. Immediately after, DMEM medium was substituted for the glucose containing medium (glucose reintroduction, GR) previously withdrawn from each well and cells were left to recover for 22 h. When the effect of the broad spectrum caspase inhibitor, Q-Val-Asp-OPH (QVDOPH, 20  $\mu$ M, MP Biomedicals, Solon, OH, USA), the caspase-3/7 inhibitor, acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-aldehyde (DEVDCO,

25  $\mu$ M, Peptide Institute, Osaka, Japan), the calpain inhibitor, N-Benzoyloxycarbonylvalylphenylalaninal (MDL-28170, 50  $\mu$ M, Enzo Life Sciences, Ann Arbor, MI, USA), the caspase-12 inhibitor, Q-Ala-Thr-Ala-Asp(OMe)-OPH (Q-ATAD, 40  $\mu$ M, MP Biomedicals, Solon, OH, USA) and the ER stress inhibitor, salubrinal (50  $\mu$ M, Tocris Bioscience, Ellisville, MO, USA) was tested, they were added only during the GD period. After recovery, cell survival was evaluated by the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide) (Sigma RBI, St. Louis, MO, USA) reduction assay as previously described [42, 43]. Briefly, cells were incubated with MTT (150  $\mu$ M) during 1 h at 37 °C in a 5 % CO<sub>2</sub>/95 % air atmosphere. The medium was aspirated and the precipitated formazan was solubilized in 0.8 ml acid isopropanol and quantified in a spectrophotometer DU730 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) at a wavelength of 570 nm. Results are expressed as percentage MTT reduction relative to control cultures.

### Apoptosis detection

Nuclear morphology was analyzed by Hoechst staining and the number of condensed and fragmented nuclei was counted. The presence of DNA strand breaks, characteristic of DNA cleavage during apoptosis was detected by the TUNEL assay, 22 h after exposing cultures to glucose-free medium for 2 h. For Hoechst staining cultures were washed with D-PBS and 0.25 ml/well of 0.001 % Hoechst 33258 (Sigma RBI, St. Louis, MO, USA) was added during 15 min under dim light. Cells were washed with D-PBS, fixed with cold 3.7 % formaldehyde during 10 min and mounted on coverslips. For TUNEL assay (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Germany) cells were washed with PBS, fixed with cold 4 % paraformaldehyde during 1 h at room temperature, washed again with PBS, and blocked in 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in methanol for 10 min. Cells were then washed with PBS, and permeabilized in 0.1 % Triton X-100, 0.1 % sodium citrate for 2 min at 4 °C. After two more washes with PBS, the cells were incubated in the dark with 20  $\mu$ l of the TUNEL reaction mixture at 37 °C in a humidified 5 % CO<sub>2</sub>/95 % air atmosphere. Finally, the cells were washed with PBS and mounted on coverslips. Cells were observed under a fluorescence microscope using an UV-2A DM400 filter for Hoechst and a U-MNB2 filter for fluorescein for TUNEL. The number of high-fluorescent condensed and fragmented nuclei and the number of TUNEL-positive cells were counted with the aid of an image analyzer (Macintosh NIH Image 1.6). Ten different fields containing about 30–40 cells were counted per coverslip (at 60 $\times$  magnification) and one coverslip was counted per condition per experiment. Results are expressed as percent of condensed and fragmented nuclei relative to the total number of nuclei counted per coverslip

(Hoechst) or as the total number of TUNEL-positive cells present in each experimental condition. Cells treated with staurosporine (STS, 500 nM, Sigma RBI, St. Louis, MO, USA) for 24 h were used as positive control for apoptosis. When the effect of the QVDOPH, DEVDCHO or salubrinal was tested, they were added to cultures only during the GD period.

### Caspase activity

Caspase-3 and caspase-9 activity was determined at different times after GD (1, 2 and 4 h) or after 2, 4 or 6 h of GR. Briefly, cells were washed with D-PBS and then homogenized in lysis buffer (100 mM HEPES pH 7.5, 1 mM EDTA, 20  $\mu$ M EGTA, 12.5 % (w/v) sucrose, 10 mM DTT, 0.1 % (w/v), 3-[3-cholamidopropyl] dimethylammonio]-1-propane sulfonate (CHAPS) and protease inhibitor cocktail without EDTA (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). All chemicals were purchased from Sigma RBI (St. Louis, MO, USA). Homogenates were diluted 1:1 (v/v) with glycerol and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until used. Caspase-3 and 9 activity was assayed by monitoring the cleavage of the tetrapeptides Ac-DEVD-MCA and Ac-LEHD-MCA (Peptides International, Osaka, Japan), respectively, in a Synergy HT multi-detection microplate reader (Biotek Instruments, Winooski, VT, USA) set at 360 nm excitation and 460 nm emission. The reaction was followed for 30 min after the addition of 25  $\mu$ M substrate to the cell lysate (30  $\mu$ g protein) in 200  $\mu$ L of lysis buffer. Results are expressed as the change in fluorescence intensity per minute per milligram of protein produced after substrate cleavage. The protein concentrations were determined using the method of Lowry [44]. STS was used as a positive control for caspase-3 activity.

Caspase-12 activity was monitored after 1, 2 or 4 h of GD, using the fluorogenic substrate Ac-ATAD-AFC, which is specifically cleaved by caspase-12. The effect of the caspase inhibitors QVDOPH (20  $\mu$ M) and DEVDCHO (25  $\mu$ M), the calpain inhibitor, MDL-28170 (50  $\mu$ M) and the ER stress inhibitor, salubrinal (50  $\mu$ M), was tested on caspase-12 activity after 1 h GD. All inhibitors were present during GD. Immediately after, cells were washed with D-PBS and then homogenized in cell lysis buffer (BioVision, Mountain View, CA, USA). Reactions were carried out in 100  $\mu$ L volume containing 50  $\mu$ L of 2X reaction buffer (BioVision, Mountain View, CA, USA) containing 10 mM DTT, 250  $\mu$ g total protein sample and 50  $\mu$ M substrate Ac-ATAD-AFC (BioVision, Mountain View, CA, USA). The reaction mixture was incubated in the dark for 1 h at  $37^{\circ}\text{C}$  in black bottom 96-wells microplates. Fluorescence emission was measured during 30 min using a Synergy HT multi-detection microplate reader (Biotek Instruments, Winooski, VT, USA) set at

400 nm excitation and 505 nm emission. Thapsigargin (Tg, 5  $\mu$ M, Sigma RBI, St. Louis, MO, USA) and tunicamycin (Tm, 5  $\mu$ M, Sigma RBI, St. Louis, MO, USA) incubated during 48 h were used as positive controls for caspase-12 activity.

### Western blot analysis

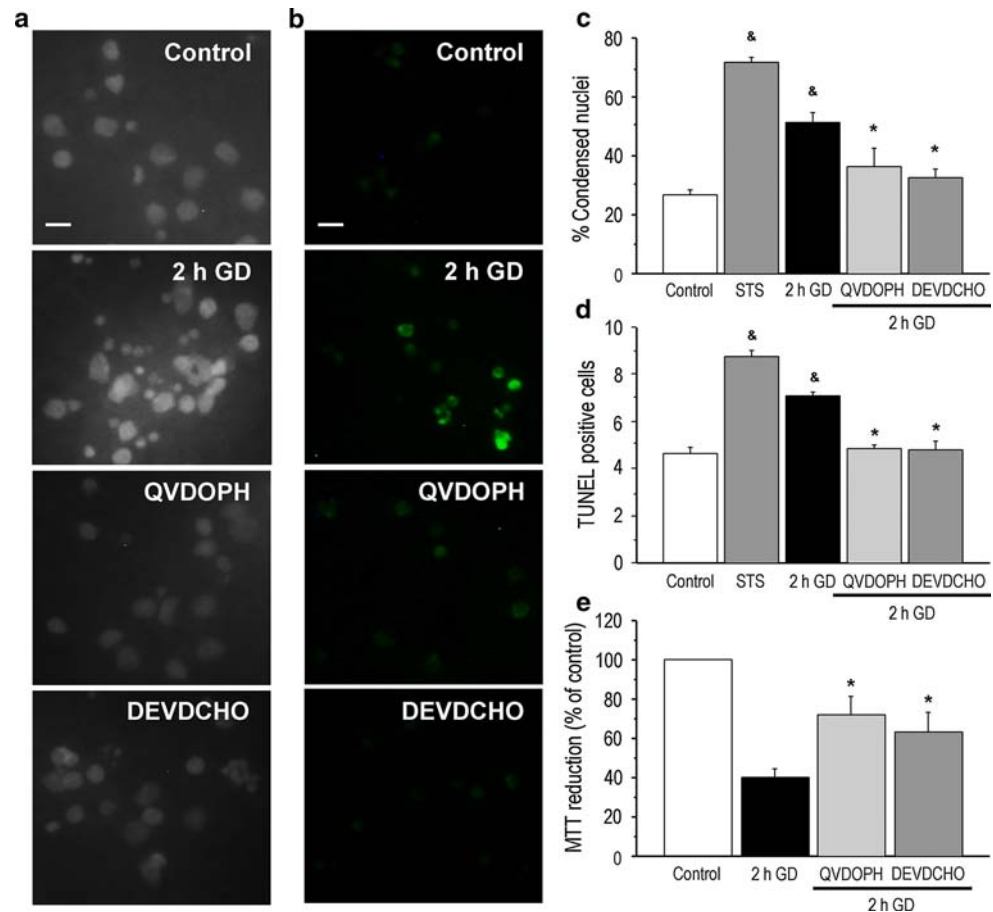
Caspase-3 processing was determined by Western blot after exposing cells to 2 h GD and different times of GR (2, 4 or 6 h). Cells were rinsed with D-PBS and resuspended in lysis buffer containing: 25 mM Tris-HCl pH 7.4, 50 mM NaCl, 2 % Nonidet P-40, 0.2 % SDS and protease inhibitor cocktail according to Miñano et al. [45] with slight modifications. For caspase-7 and 12 cultures were exposed to glucose-free medium for different periods of time (0.25, 0.5, 1, 2 and 4 h) and homogenized for Western blot analysis in lysis buffer containing: 50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0.5 % sodium deoxycholate, 1 % triton X-100, 1 % SDS and protease inhibitor cocktail, according to Sokka et al. [46]. All chemicals were purchased from Sigma RBI (St. Louis, MO, USA) except for protease inhibitor cocktail that was from (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

After incubation on ice for 10 min, homogenates were centrifuged at 14 000 rpm for 20 min at  $4^{\circ}\text{C}$  and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until used. The protein concentration was determined by the method of Lowry [44]. The supernatant (60  $\mu$ g of total protein) was separated by 12 % SDS-PAGE and transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). Membranes were blocked with Tris-Buffered saline/Tween-20 (TTBS) buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl and 0.1 % Tween-20) containing 5 % nonfat dry milk for 1 h at room temperature and incubated overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  in blocking buffer containing primary antibodies. The following primary antibodies and dilutions were used: Caspase-3 (1:200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), Caspase-7 (1:250, Abcam, Cambridge, MA, USA), Caspase-12 (1:500, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). As positive controls we used STS (500 nM, 8 h) for caspase-3 and Tg (5  $\mu$ M, 48 h) and Tm (5  $\mu$ M, 48 h) for caspase-7 and caspase-12.

Protein levels of markers of the ER stress PERK pathway, p-eIF2 $\alpha$ , ATF4, CHOP and GRP78 were determined by Western blot after exposing cells to GD for different periods of time (0.25, 0.5, 1, 2 and 4 h). Cells were homogenized in the same lysis buffer used for caspase-7 and 12 and processed as described above. In this case 25  $\mu$ g protein was used. The antibodies used were: p-eIF2 $\alpha$  (1:1000, Abcam, Cambridge, MA, USA), ATF4 (1:250, Abcam), GRP78 (1:1000, Abcam), CHOP (Gadd153, 1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and  $\alpha$ -actin (1:5000, Millipore, Temecula, CA, USA). Peroxidase-conjugated



**Fig. 1** Apoptotic cell death is induced by GD. Neurons were exposed to GD during 2 h in the presence or the absence of QVDOPH (20  $\mu$ M) or DEVDCHO (25  $\mu$ M), and 22 h later nuclear condensation and fragmentation (a, c), DNA cleavage (b, d) and cell viability (e) was determined by Hoechst staining, the TUNEL assay and MTT reduction, respectively. Staurosporine (STS) was used as a positive control of apoptosis. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM from 3 to 6 (c), 4 (d) and 3–7 (e) independent experiments and were analyzed by one-way ANOVA followed by a Fisher's least significant difference test.  $^{\&}P < 0.05$  versus control and  $^*P < 0.05$  versus 2 h GD. Photomicrographs showing the presence of condensed and fragmented nuclei (a) and TUNEL-positive cells (b) and the protective effect of QVDOPH (20  $\mu$ M) or DEVDCHO (25  $\mu$ M) are depicted. Scale bar 10  $\mu$ m



anti-rabbit IgG (1:5000, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA) or peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (1:5000, Jackson ImmunoResearch Laboratories) were used as secondary antibodies. All immunoblots were developed by ECL (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) and analyzed by densitometry with the Image-J program NIH Image version 1.46.

#### Statistics

In all cases data were analyzed by one-way ANOVA followed by a Fisher's multiple comparison test and were expressed as mean  $\pm$  SEM. Significant differences between data were considered when  $P < 0.05$ .

## Results

### GD induces neuronal death and increases the number of apoptotic nuclei

In order to investigate whether GD induces apoptotic neuronal death cells were exposed to glucose-free medium for 2 h. Immediately, the medium was substituted for the

glucose containing medium previously withdrawn (GR) and cells were left to recover for 22 h. After GR mitochondrial viability was measured by the MTT assay, which is an index of cell survival. Apoptosis was monitored by the quantification of the number of condensed and fragmented nuclei and the presence of DNA strand breaks, two hallmarks of apoptosis, using Hoechst staining and the TUNEL assays, respectively. Figure 1a shows representative images of Hoechst-stained nuclei; in control cultures most of the nuclei look large and round while in cultures exposed to glucose-free medium many bright-fluorescent condensed and fragmented nuclei are present. As can be observed when cells are incubated in the presence of caspase inhibitors many nuclei show a normal appearance similar to those observed in the control condition (Fig. 1a). Similar results were obtained when apoptosis was monitored by the TUNEL assay. Images of representative experiments show an increase in the number of TUNEL-positive cells in cultures exposed to GD relative to control cultures (Fig. 1b). The number of TUNEL-positive nuclei is reduced in the presence of the caspase inhibitors, QVDOPH and DEVDCHO (Fig. 1b).

Graph in Fig. 1c shows that the percentage of condensed and fragmented nuclei is increased in cells exposed to GD

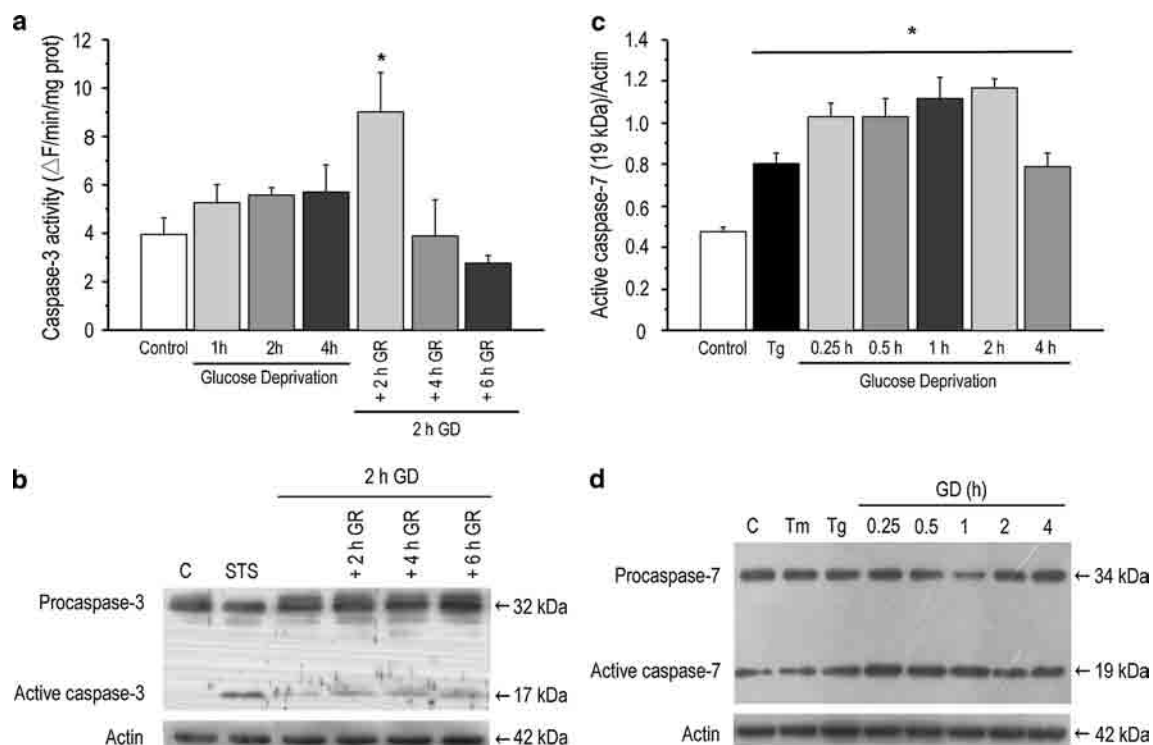
as compared to control cells. In control cultures 26.5 % of the cells showed condensed and fragmented nuclei, representing a basal level of apoptosis and this number increased to 51.2 % when cells were deprived from glucose. In the presence of STS (500 nM), used as a positive control of apoptosis, 71.5 % of apoptotic nuclei was observed (Fig. 1c). The increase in the number of condensed and fragmented nuclei induced by 2 h GD was effectively reduced in the presence of the broad-spectrum caspase inhibitor QVDOPH (20  $\mu$ M) and the caspase-3/7 inhibitor DEVDCHO (25  $\mu$ M) (Fig. 1c).

Graph in Fig. 1d shows the number of TUNEL-positive cells. In agreement with Hoechst staining, few TUNEL-positive cells were observed in the control condition, while this number increased to 89.4 % in the presence of STS. Cultures exposed to 2 h GD and observed 22 h later showed significantly more TUNEL-positive cells relative to the control condition (Fig. 1d). As expected, the number of TUNEL-positive cells was significantly reduced in the presence of caspase inhibitors (Fig. 1d). Cell survival was

determined by the MTT reduction assay. As indicated in Fig. 1e, cell survival significantly decreased to 40 % when cells were exposed to GD for 2 h. QVDOPH and DEVDCHO increased neuronal viability to 72 and 63 % of control, respectively (Fig. 1e). These results demonstrate that 2 h GD induces neuronal death and that this is mediated at least in part by apoptosis.

#### Caspase-3 and caspase-7 activities are induced at different times after GD

In order to investigate whether apoptosis contributes to neuronal death induced by GD and to identify the caspases involved, cells were continuously exposed to GD for 1–4 h and collected immediately after, or exposed to GD during 2 h and then to different periods of GR (2, 4 and 6 h). Immediately after GD or GR cells were homogenized for caspase-3 activity determination, using Ac-DEVD-MCA, a fluorogenic substrate for caspase-3/7. The time-course of caspase activation is shown in Fig. 2a. When cells were



**Fig. 2** Effects of GD on caspase-3 and caspase-7 activity. Caspase-3 activity was determined at different times after GD (1, 2 and 4 h) or after GR (2, 4 or 6 h) using the fluorogenic substrate, Ac-DEVD-MCA (a). Results are expressed as the change in fluorescence intensity/min/mg protein. Processing of pro-caspase-3 (32 kDa) in its active fragment (17 kDa) was determined by Western blot and is shown in (b). STS was used as a positive control of caspase-3 activation. Cells were exposed to GD during the indicated times and caspase-7 proteolysis was analyzed by Western blot (c, d). A representative Western blot shows the

presence of the procaspase-7 (34 kDa) and its active fragment (19 kDa).  $\beta$ -Actin was used as loading control (d). Tunicamycin (Tm, 5  $\mu$ M) and thapsigargin (Tg, 5  $\mu$ M) were used as positive controls of caspase-7 activation. Data in (c) represent the optical density of caspase-7 active fragment (19 kDa) band/ $\beta$ -Actin (42 kDa). Results are expressed as mean  $\pm$  SEM from 3 to 5 independent experiments. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by a Fisher's least significant difference test. \* $P < 0.05$  versus control



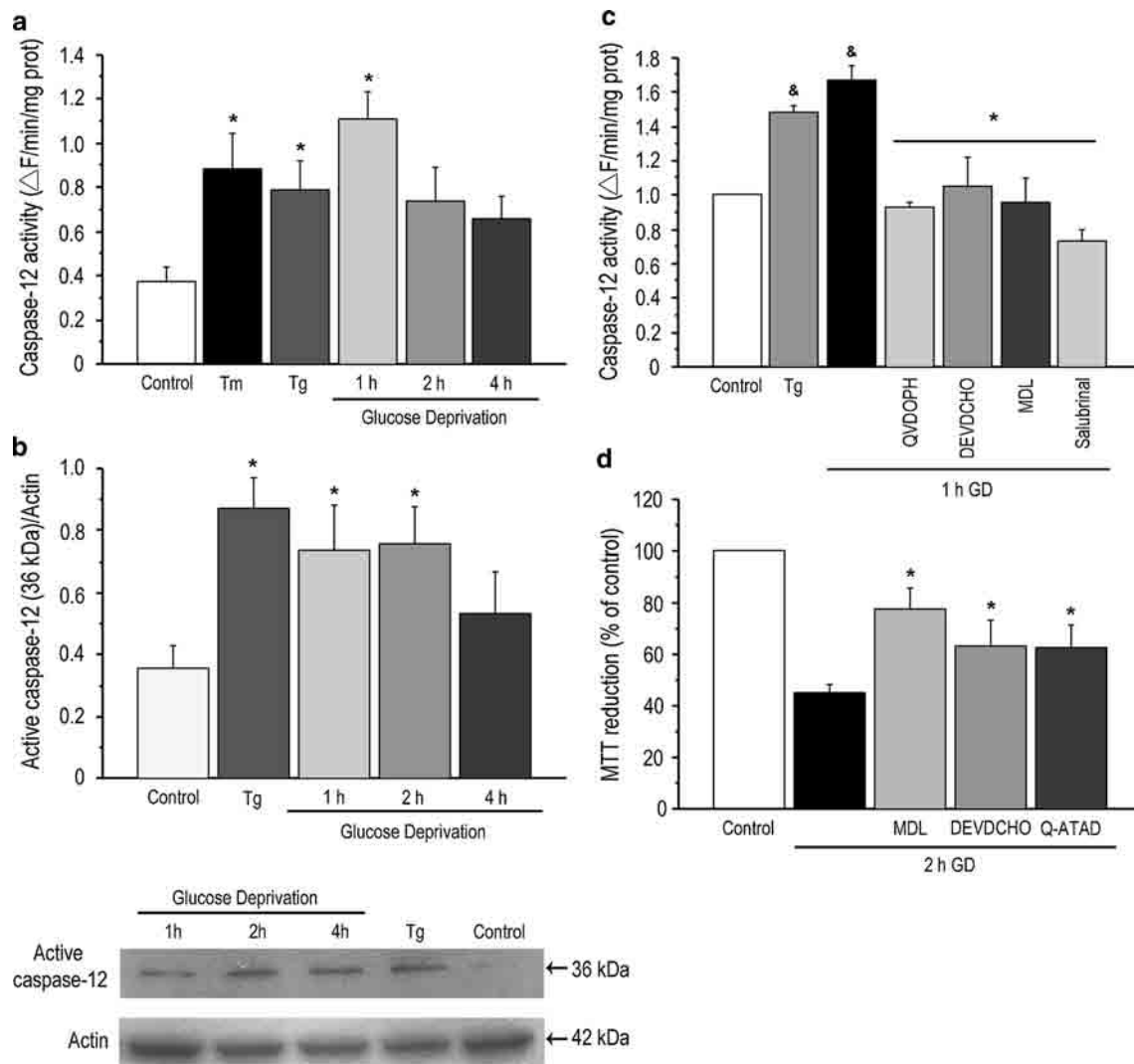
exposed to glucose-free medium for 1–4 h caspase activity increased only slightly and not significantly. A transient and significant increase in caspase activity was observed only after 2 h of GR (change in fluorescence intensity/min/mg protein, control =  $3.92 \pm 0.70$ ; GD =  $8.97 \pm 1.63$ ), and declined after 4 and 6 h recovery in glucose containing medium (Fig. 2a). Caspase activity was also measured at shorter times of GD and a slight but not significant increase was observed at 0.25 and 0.5 h of GD (data not shown). Cells exposed to STS for 8 h showed a significant increase in fluorescence (data not shown control =  $3.92 \pm 0.70$ ; STS =  $16.24 \pm 1.32$ ,  $n = 4$ ). In order to confirm caspase-3 activation we used Western blot analysis to evaluate the generation of the active fragment of caspase-3 in homogenates from cells exposed to GD during 2 h and then to GR for 2, 4 or 6 h (Fig. 2b). The 17 kDa active fragment was detected after GR (2–6 h) in cells previously exposed to 2 h GD. As a positive control we used STS (500 nM), which promoted the cleavage of pro-caspase-3 to its active 17 kDa fragment after 8 h incubation. As caspase-9 is a common activator of caspase-3, the activity of this caspase was also evaluated fluorometrically using the substrate Ac-LEHD-MCA. We observed a slight not significant 33 % increase in enzyme activity after 0.25 h of GD but not at longer GD periods or during GR (data not shown).

The results described above suggest that the mitochondrial pathway is not involved in GD-induced apoptotic neuronal death, because caspase-9 and caspase-3 are only marginally activated. However, a significant protective effect of DEVDCHO against GD-induced neuronal death was observed (Fig. 1). Because DEVDCHO also inhibits the activity of caspase-7, we aimed to evaluate the time course of caspase-7 processing by Western blot using an antibody that recognizes procaspase-7 (34 kDa) and the caspase-7 active fragment (19 kDa). The graph in Fig. 2c shows the densitometric analysis of the ratio of the 19 kDa band/actin. The optical density of the this band increased as early as 0.25 h of GD and it remained significantly elevated until 2 h, declining at 4 h. A representative Western blot of the time-course of caspase-7 activation is shown in Fig. 2d. As can be observed procaspase-7 processing promptly increased from 0.25 h of GD. As positive controls we incubated cells during 48 h with the inhibitor of N-linked glycosylation, Tm (5  $\mu$ M) and the inhibitor of the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase (SERCA), Tg (5  $\mu$ M), which are known to induce caspase-7 activation [47–49]. An increase in the processing of caspase-7 was observed after the treatment with Tg (Fig. 2c, d). These results suggest that the apoptotic neuronal death induced by GD is caspase-dependent and that caspase-7 is rapidly activated after GD and it is involved in neuronal death.

### Caspase-12 activity suggests activation of ER stress by GD

Based on the above-described findings suggesting that caspase-9 and caspase-3 are not significantly activated during or after GD, we aimed to investigate whether apoptotic neuronal death elicited by GD is the result of ER stress. Caspase-12 is an ER resident caspase, which has been proposed as a key mediator of ER stress-induced apoptosis. Caspase-12 is cleaved and activated specifically during ER stress, but not by death receptor- or mitochondrial-mediated apoptotic signals [22, 25]. This prompted us to assess caspase-12 activity using the fluorometric substrate Ac-ATAD-AFC. Tg and Tm were used as positive controls for caspase-12 activation. Fig. 3a shows that 1 h GD induced a significant increase in caspase-12 activity as compared to control cultures maintained in glucose-containing medium (change in fluorescence intensity/min/mg protein, control =  $0.37 \pm 0.06$ ; GD =  $1.10 \pm 0.12$ ), which declined after 2 and 4 h. Caspase-12 activity was also significantly stimulated when cultures were incubated during 48 h in the presence of Tm (5  $\mu$ M) and Tg (5  $\mu$ M). Fig. 3b (bottom panel) shows a representative Western blot of the time-course of caspase-12 processing, using an antibody that only recognizes the 36 kDa active fragment. As can be observed the active fragment was detected from 1 to 4 h GD, as well as 48 h after incubation with Tg (5  $\mu$ M), but not in control cultures. The densitometric analysis of the ratio of the active caspase-12 (36 kDa) fragment relative to the actin band is shown in Fig. 3b (upper panel).

It has been demonstrated that caspase-12 activation can be mediated by caspase-7 [28] as well as by the calcium-dependent cysteine protease, calpain, in response to calcium release from the ER during ER stress [27]. To determine the relative contribution of calpain and caspase-7 to caspase-12 activation cells were exposed to glucose-free medium during 1 h and incubated either in the presence or the absence of DEVDCHO (25  $\mu$ M) and the calpain inhibitor, MDL-28170 (50  $\mu$ M). As observed in Fig. 3c the increase in caspase-12 activity induced after 1 h GD was significantly inhibited by DEVDCHO and MDL-28170. As expected the broad-spectrum caspase inhibitor, QVDOPH (20  $\mu$ M) also inhibited caspase activity. To corroborate the inhibitory effect of DEVDCHO and MDL-28170 on caspase-12 activity, we also tested the effect of these inhibitors on caspase-12 processing. As observed in supplementary Fig. 1, the production of the 36 kDa product of active caspase-12 was significantly inhibited in cells incubated with MDL-28170 and DEVDCHO, further suggesting the role of calpain and caspase-7 on the activation of caspase-12. Moreover, inhibition of calpain, caspase-7 and caspase-12 (by Q-ATAD) prevented GD-induced



**Fig. 3** Caspase-7 and calpain mediate caspase-12 activity induced during GD. Neurons were exposed to GD for 1–4 h and caspase-12 activity was measured using the fluorogenic substrate, Ac-ATAD-AFC. Results are expressed as the change in fluorescence intensity/min/mg protein. Tunicamycin (Tm, 5  $\mu\text{M}$ ) and Tg (5  $\mu\text{M}$ ) were used as positive controls (a). The time course of caspase-12 proteolysis into its active fragment (36 kDa) was determined by Western blot and results are expressed as the optical density of the active fragment (36 kDa) band/ $\beta$ -Actin (42 kDa). A representative blot is shown (b). Cells were exposed to GD for 1 h in the presence or the absence of QVDOPH (20  $\mu\text{M}$ ), DEVDCHO (25  $\mu\text{M}$ ), MDL-28170 (MDL,

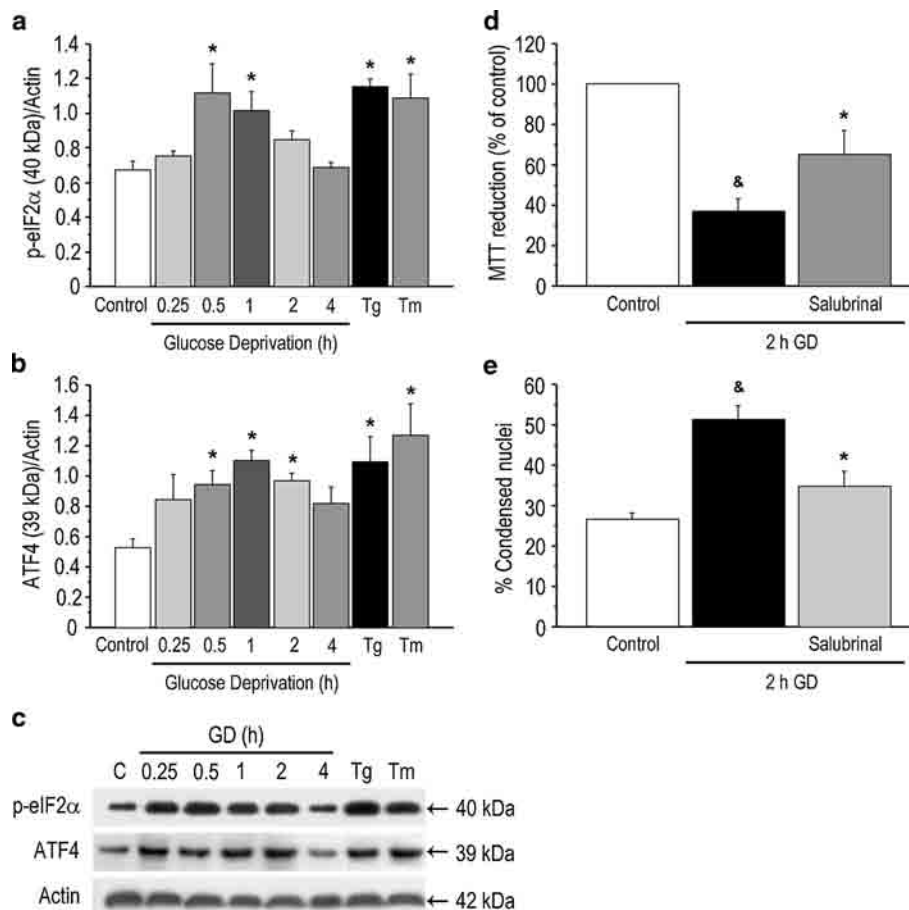
50  $\mu\text{M}$ ) or salubrinal (50  $\mu\text{M}$ ) and caspase-12 catalytic activity was measured. Results are expressed as the change in fluorescence intensity/min/mg protein (c). Neurons were exposed to GD during 2 h in the presence or the absence of MDL-28170 (50  $\mu\text{M}$ ), DEVDCHO (25  $\mu\text{M}$ ) or Q-ATAD (40  $\mu\text{M}$ ) and MTT reduction was measured 22 h after GD (d). Results are expressed as percent of control values and are mean  $\pm$  SEM of 4–7 (a), 3–5 (b), 4–6 (c) and 4 (d) independent experiments. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by a Fisher's least significant difference test. \* $P < 0.05$  versus control (a, b) and versus GD (c, d),  $^{\&}P < 0.05$  versus control (c)

neuronal death as assessed by the MTT assay (Fig. 3d). Altogether these results suggest that caspase-12 is activated during GD and contributes to apoptotic neuronal death. In addition, both caspase-7 and calpain are involved in the activation of caspase-12.

#### GD induces ER stress by activation the PERK pathway

We then aimed to study whether ER stress is induced after glucose withdrawal by evaluating the levels of different

markers of the PERK pathway by Western blot. Results in Fig. 4a, c show that the exposure to glucose-free medium induces an early and significant increase in the phosphorylation of eIF2 $\alpha$  (p-eIF2 $\alpha$ ) from 0.5 to 1 h, which progressively declines after 2–4 h. As expected, treatment of cultures during 48 h with Tg (5  $\mu\text{M}$ ) or Tm (5  $\mu\text{M}$ ) significantly increased p-eIF2 $\alpha$  (Fig. 4a, c). Phosphorylation of eIF2 $\alpha$  causes a global inhibition of protein synthesis, except for the translation of some mRNAs containing upstream open reading frames located in the 5' end such as



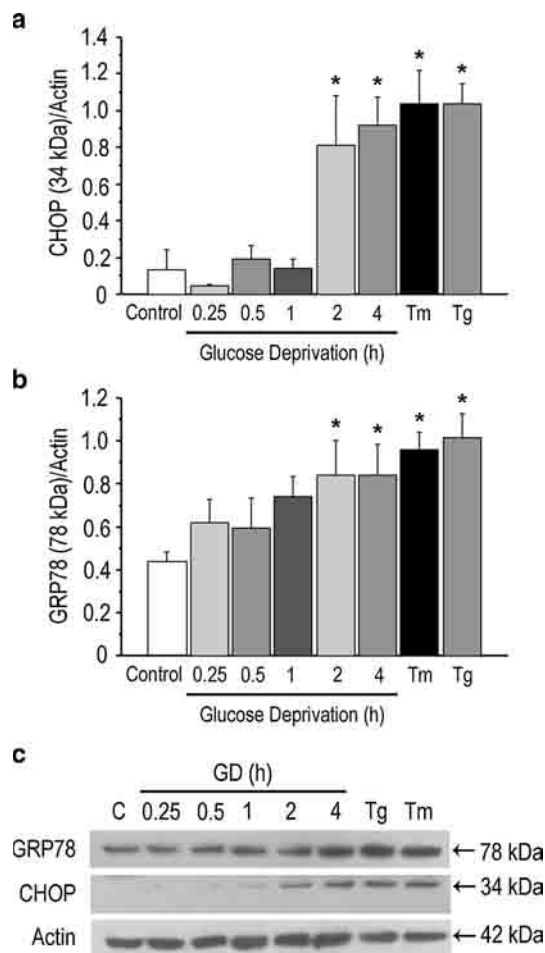
**Fig. 4** GD induces ER stress and increased expression of p-eIF2 $\alpha$  and ATF4. Cells were exposed to GD during the indicated periods of time and p-eIF2 $\alpha$  and ATF4 protein content was analyzed by Western blot (*a*, *b*). Data represent the optical density of p-eIF2 $\alpha$  (40 kDa) or ATF4 (39 kDa) bands/ $\beta$ -Actin (42 kDa). Tg (5  $\mu$ M) and Tm (5  $\mu$ M) were used as positive controls for ER stress induction. A representative Western blot shows the changes in p-eIF2 $\alpha$  (40 kDa) and ATF4 (39 kDa) content after GD.  $\beta$ -Actin was used as loading control (*c*). Neurons were exposed during 2 h GD in the presence or the absence of the ER stress inhibitor, salubrinal (50  $\mu$ M) and MTT reduction was

measured 22 h later (*d*). Results are expressed in percent of control values. Cells were exposed to 2 h GD in the presence or the absence of salubrinal (50  $\mu$ M) and 22 h later the number of condensed and fragmented nuclei was counted by Hoechst staining. Results are expressed as percent condensed and fragmented nuclei (*e*). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM 3–6 (*a*), 3–4 (*b*), 4 (*d*) and 3–6 (*e*) independent experiments. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by a Fisher's least significant difference test. \*  $P < 0.05$  vs control (*a*, *b*) and versus 2 h GD (*d*, *e*), &  $P < 0.05$  versus control (*d*, *e*)

that of the transcription factor, ATF4 [50]. Figure 4b shows the densitometric analysis of the 39 kDa band corresponding to ATF4. When cultures were deprived from glucose a prompt increase in ATF4 protein levels was observed from 0.5 to 2 h, declining at 4 h. Representative Western blots in Fig. 4c show the increase in p-eIF2 $\alpha$  (40 kDa) and ATF4 (39 kDa) protein levels after cells were exposed to glucose-free medium. Tg and Tm also induced a significant increase in the levels of the two proteins. We then sought to evaluate the effect of salubrinal, a small molecule known to inhibit GADD34, the phosphatase responsible for the dephosphorylation of p-eIF2 $\alpha$  preventing ER stress [51]. As indicated in Fig. 4d, cell viability was significantly increased when cultures were exposed to GD in the presence of salubrinal (50  $\mu$ M) restoring MTT reduction up to 65.2 % of control levels. Similarly,

salubrinal significantly reduced to 34.7 % the number of condensed and fragmented nuclei when present in the GD medium (Fig. 4e). These results are in agreement with the observed decrease in caspase-12 processing and activity in the presence of salubrinal (Fig. 3c and supplementary Fig. 1).

During prolonged ER stress, the three signaling pathways of the UPR can induce the expression of CHOP, a transcription factor involved in the induction of ER stress-mediated apoptosis. CHOP transcription is downstream of ATF4 and is essential for the induction of apoptosis through the PERK-eIF2 $\alpha$ -ATF4 pathway [52]. Thus, we evaluated CHOP levels after the continuous exposure to GD for 0.25–4 h. As observed, CHOP levels were significantly elevated after 2 h of GD and remained increased by 4 h (Fig. 5a, c). Treatment with Tm (5  $\mu$ M) or Tg (5  $\mu$ M)



**Fig. 5** GD induces CHOP and GRP78 expression. Cells were exposed to GD during the indicated periods of time and CHOP and GRP78 protein content was analyzed by Western blot (*a*, *b*). Data represent the optical density of CHOP (34 kDa) or GRP78 (78 kDa) bands/ $\beta$ -Actin (42 kDa). Results are expressed as mean  $\pm$  SEM of 3 (*a*) or 5–6 (*b*) independent experiments. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by a Fisher's least significant difference test. \* $P < 0.05$  versus control. A representative Western blot shows the change in GRP78 (78 kDa) and CHOP (34 kDa) content after GD.  $\beta$ -Actin was used as loading control (*c*)

during 48 h produced similar increases in CHOP levels (Fig. 5a, c). One of the hallmarks of ER stress is the induction of the chaperones GRP78 and GRP94. ER stress up-regulates the transcription of these ER-resident chaperone proteins to regulate ER stress and facilitate protein folding [18]. GRP78 levels were examined at different periods of time after the exposure to glucose-free medium (0.25, 0.5, 1, 2 and 4 h). Similarly to CHOP, GRP78 protein levels significantly increased after 2 h GD and remained elevated at 4 h (Fig. 5b, c). Treatment with Tm and Tg also induced a significant increase in GRP78 protein levels. A representative Western blot showing an increase in the density of the bands corresponding to GRP78 (78 kDa) and CHOP (34 kDa) after GD, is depicted

in Fig. 5c. Altogether, these results demonstrate that the PERK pathway of the UPR is activated during GD and suggest that this pathway is involved in neuronal death since inhibition of reticular stress by salubrinal increased neuronal survival.

## Discussion

Severe hypoglycemia is most commonly the result of the excessive administration of insulin in type 1 diabetic patients with a strict glycemic control [53]. The mechanisms of neuronal death associated with hypoglycemic brain injury have not been completely elucidated. Early studies suggested the involvement of an excitotoxic necrotic mechanism based on the release of glutamate and aspartate during the isoelectric period and the protective effect of glutamate receptor antagonists [3, 54]. Some studies suggested the role of the mitochondrial apoptotic cascade on hypoglycemic neuronal death [9]. The role of reticular stress and the resulting apoptotic death has not been previously reported during hypoglycemia, therefore we used an in vitro model of GD to mimic the hypoglycemic condition and investigate the induction of ER stress and its role on apoptotic neuronal death.

The present results demonstrate that GD during 2 h leads to neuronal death, which occurs, at least in part, through apoptosis. The broad-spectrum caspase inhibitor QVDOPH and the caspase inhibitor DEVDCHO, partially but significantly increased neuronal viability and reduced the number of TUNEL-positive cells and condensed and fragmented nuclei, suggesting the participation of a caspase-dependent apoptotic pathway. However, according to caspase activity determinations and Western blot assays, caspase-3 is only slightly and transiently activated during the recovery period, and caspase-9 activity is not significantly stimulated. Therefore, protection by QVDOPH and DEVDCHO might be related to the activation of other caspases. Given that DEVDCHO is also an inhibitor of caspase-7, we determined caspase-7 activity at different periods of time of GD through the processing of the pro-caspase and the production of the 19 kDa active fragment. We observed an early and sustained activation of this caspase from 15 min to 2 h. Thus, the protective effect of DEVDCHO against cell death might be attributable to caspase-7 activity, rather than caspase-3. These results are in agreement with those of Martinez et al. [49] showing that caspase-7 activation precedes that of caspase-3 after the exposure of PC12 cells to Tg.

Caspase activity also plays a critical role in ER stress-induced apoptosis. After the activation of the PERK pathway, increased expression of the transcription factor CHOP down-regulates Bcl-2 protein levels, inducing the



activation of caspase-9 and caspase-3, and as a result apoptotic death [28, 55–58]. However, in the present experimental conditions the participation of the mitochondrial-dependent cytochrome *c*/Apaf-1 pathway seems unlikely, due to the lack of activity of caspase-9 and caspase-3. According to the results caspase-3 is not activated during GD but only modestly and transiently after 2 h GR declining thereafter. The lack of activation of caspase-3 during GD might be explained by the lack of energy needed for the formation of the apoptosome and the activation of caspase-9 and 3, since a rapid decline in ATP levels is observed after glucose withdrawal [59]. Caspase-3 activity 2 h after GR might result from a partial recovery of ATP upon GR. In fact, the 17 kDa caspase-3 active fragment is detectable at longer periods of time after GR (4–6 h), although we were unable to detect the enzyme catalytic activity, suggesting a marginal activation of this caspase under the present experimental conditions. Other studies have reported a slight increase or no increase in caspase-3 activity during OGD and OG and serum deprivation (OGSD), while the peak of activation is observed during the recovery period [60, 61]. In addition, in an *in vivo* study of hypoglycemia, a modest increase in caspase-3 activity is transiently observed after glucose reperfusion, while no activity is detected during the hypoglycemic episode, presumably due to the lack of energy [9].

On the other hand, caspase-12, a murine caspase associated with the ER membrane, is activated by ER stress-induced apoptosis but not by receptor- or mitochondrial-mediated apoptosis [26, 56]. In the present study we observed an increase in caspase-12 activity from 1 to 2 h after GD. These findings agree with previous observations showing caspase-12 cleavage in several models of energy failure including OGD in cortical cultured neurons [36], OGSD in spinal cord astrocytes [60], hypoxia–ischemia in rat pups [36] and *in vivo* ischemia [37–39]. In addition, a rapid activation of caspase-12 has been observed after excitotoxic injury elicited by kainate exposure in cultured hippocampal neurons [46]. Activation of caspase-12 induced by ER stress can result from diverse mechanisms: cleavage by the calcium-dependent protease, calpain [27, 36, 49]; dimerization and activation following the formation of the IRE1-TRAF2 complex [29]; and cleavage by caspase-7 [28, 49, 62]. The present results show that caspase-12 activity induced by GD is significantly inhibited in the presence of the caspase-3/7 inhibitor, DEVDCHO, suggesting processing and activation of caspase-12 by caspase-7, in agreement with the results reported by others [49]. In addition, caspase-12 activation might result from calpain-mediated processing. We have previously reported that the calcium intracellular concentration rapidly and progressively increases upon glucose withdrawal in cultured hippocampal neurons [59], which is followed by a

rapid activation of calpain (Páramo et al. [63]). Therefore, in the present experimental conditions, calpain and caspase-7 contribute to caspase-12 activation. In a recent study Martínez et al. [49] reported that caspase-12 activity in PC12 cells in response to Tg exposure results from calpain and caspase-7-mediated processing, and that calpain-mediated cleavage precedes that mediated by caspase-7. In contrast, in the present study we observed a very early activation of caspase-7, and according to our recent observations, calpain activation is also rapidly induced after glucose withdrawal (Páramo et al. [63]), suggesting that caspase-12 processing by these two proteases occurs very early and simultaneously after GD. Accordingly, we observed that DEVDCHO and MDL-28170, effectively inhibited pro-caspase-12 processing into its active fragment and caspase-12 catalytic activity as assessed by the cleavage of the fluorescent substrate Ac-ATAD-AFC 1 h after GD. Furthermore, DEVDCHO, MDL-28170, and the caspase-12 inhibitor, Q-ATAD, efficiently prevented neuronal death, suggesting that caspase-12, activated by caspase-7 or by calpain, is an important executioner of GD-induced injury.

Alterations in the calcium homeostasis and accumulation of unfolded proteins within the ER lumen cause reticular stress and lead to cell death. UPR activation has been widely reported during transient focal or global cerebral ischemia [30–34, 38, 64], cerebral trauma [48, 65], and in *in vitro* models of OGD [35, 36, 60]. However, the role of ER stress in hypoglycemic injury has not been elucidated. In the present study, we observed a rapid phosphorylation of eIF2 $\alpha$  after 0.5 h of GD. Phosphorylation at Ser 51 of eIF2 $\alpha$  leads to inhibition of global protein synthesis. However, a few mRNAs that contain small upstream open reading frames (uORFs) in its 5' leader region can spare translation block, such as ATF4. We observed an increase in ATF4 levels 0.5 h after GD. In agreement with these observations, in a model of bilateral carotid artery occlusion (BCAO) and OGD in cortical neurons a rapid phosphorylation of PERK and eIF2 $\alpha$  has been observed [36, 64], as well as the induction of ATF4 after global cerebral ischemia, permanent middle cerebral artery occlusion, OGD and OGSD [32, 33, 36, 60]. According to the present results the increase in CHOP levels followed that of p-eIF2 $\alpha$  and ATF4, consistent with the up regulation of CHOP expression by ATF4. This result is in agreement with previous studies showing that CHOP mRNA is markedly induced in the brain of mice exposed to bilateral common carotid artery occlusion (BCCAO) [31]. Increased levels of the chaperone GRP78 were also observed in the present conditions after 2 and 4 h of GD, in agreement with previous studies showing chaperone induction after middle cerebral artery occlusion (MCAO) and OGD [36, 38]. Transcription regulation of this chaperone is mediated by the binding of transcription factors

to ERSE sequences present in its promoter. XBP1 and ATF6 are transcription factors related to the UPR that can bind to the ERSE sequences and mediate the up-regulation of GRP78. Therefore, in our experimental conditions the IRE1 and the ATF6 pathways might also be activated. It has been recently demonstrated that the IRE pathway of the UPR is induced by OGD in cortical and hippocampal cultured neurons because the splicing of XBP1 is observed during the recovery period [36, 66]. The study by Ibuki et al. [66] demonstrated an early and transient splicing of XBP-1 immediately after OGD, which is suppressed during the first hours of reoxygenation and restored again after 20–28 h of recovery. This second peak of XBP1 splicing is related to neuronal survival, since cells over-expressing spliced XBP1 were more resistant to OGD, possibly through the up-regulation of ER chaperones and the transcription of genes involved in the degradation of misfolded proteins. In agreement, a rapid and transient activation of the PERK pathway after OGD has been reported [36], while splicing of XBP-1 was observed at later times after recovery, suggesting that the activation of the IRE pathway is a delayed response to OGD. Further experiments are needed in order to determine whether IRE is activated in the present experimental conditions either during GD or GR.

The present data strongly support that the rapid activation of the PERK-mediated UPR pathway is involved in GD-induced neuronal death since salubrinal effectively increased cell survival. Salubrinal inhibits GADD34, the phosphatase responsible for the dephosphorylation of eIF2 $\alpha$ , maintaining protein synthesis abated and relieving ER stress [51]. Furthermore, salubrinal also inhibited caspase-12 processing and activity suggesting a role of this caspase in ER stress-induced neuronal death. The protective effect of salubrinal has been previously observed in different conditions associated with ER stress, such as mutant huntingtin accumulation in Huntington's disease [67], SOD accumulation in a model of familial amyotrophic lateral sclerosis [68] and exposure to kainic acid [46]. In the present experimental conditions ER stress might result from energy failure and loss of calcium homeostasis since we have previously shown an important decline in ATP levels as well as an increase in the intracellular concentration of calcium soon after GD [59].

Altogether, the present observations suggest that ER stress is elicited during GD and contributes to neuronal death through the activation of the PERK pathway of the UPR and caspase-12. In addition, results demonstrate that caspase-12 activation by calpain and caspase-7 is involved in the execution of neuronal death, rather than the caspase-dependent mitochondrial pathway. These results contribute to the knowledge of the mechanisms involved in neuronal death associated with hypoglycemia.

**Acknowledgments** This work was supported by S112179 CONA-CyT and IN211710-3 PAPIIT (UNAM) Grants to L.M. and 221026 CONA-CyT fellowship to S.G.C The authors thank Teresa Montiel for her technical assistance. This study was performed in partial fulfillment of the requirements for the PhD degree in Ciencias Bioquímicas of S. García de la Cadena at the Universidad Nacional Autónoma de México.

## References

1. Auer RN, Kalimo H, Olsson Y, Siesjö BK (1985) The temporal evolution of hypoglycemic brain damage. I Light- and electron-microscopic findings in the rat cerebral cortex. *Acta Neuropathol* 67:13–24
2. Auer RN, Kalimo H, Olsson Y, Siesjö BK (1985) The temporal evolution of hypoglycemic brain damage. II Light- and electron-microscopic findings in the hippocampal gyrus and subiculum of the rat. *Acta Neuropathol* 67:25–36
3. Wieloch T (1985) Hypoglycemia-induced neuronal damage prevented by an *N*-Methyl-D-aspartate antagonist. *Science* 230:681–683
4. Butcher SP, Jacobson I, Sandberg M, Hagberg H, Hamberger A (1987) 2-Amino-5-phosphonovalerate attenuates the severe hypoglycemia-induced loss of perforant path-evoked field potentials in the rat hippocampus. *Neurosci Lett* 76:296–300
5. Suh SW, Aoyama K, Chen Y, Garnier P, Matsumori Y, Gum E, Liu J, Swanson RA (2003) Hypoglycemic neuronal death and cognitive impairment are prevented by Poly (ADP-Ribose) Polymerase inhibitors administered after hypoglycemia. *J Neurosci* 33:10681–10690
6. Suh SW, Gum ET, Hamby AM, Chan PH, Swanson RA (2007) Hypoglycemic neuronal death is triggered by glucose reperfusion and activation of neuronal NADPH oxidase. *J Clin Invest* 117:910–918
7. Suh SW, Hamby AM, Gum ET, Shin BS, Won SJ, Sheline CT, Chan PH, Swanson RA (2008) Sequential release of nitric oxide, zinc, and superoxide in hypoglycemic neuronal death. *J Cereb Blood Flow Metab* 28:1697–1706
8. Friberg H, Ferrand-Drake M, Bengtsson F, Halestrap AP, Wieloch T (1998) Cyclosporin A, but not FK 506, protects mitochondria and neurons against hypoglycemic damage and implicates the mitochondrial permeability transition in cell death. *J Neurosci* 14:5151–5159
9. Ferrand-Drake M, Zhu C, Gidö G, Hansen AJ, Karlsson JO, Bahr BA, Zamzami N, Kroemer G, Chan PH, Wieloch T, Blomgren K (2003) Cyclosporin A prevents calpain activation despite increased intracellular calcium concentrations, as well as translocation of apoptosis-inducing factor, cytochrome c and caspase-3 activation in neurons exposed to transient hypoglycemia. *J Neurochem* 85:1431–1442
10. Tong L, Perez-Polo R (1998) Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protects cultured rat cerebellar granule neurons against glucose deprivation-induced apoptosis. *J Neural Transm* 105:905–914
11. Xu Y, Zhang Q, Yu S, Yang Y, Ding F (2011) The protective effects of chitoooligosaccharides against glucose deprivation-induced cell apoptosis in cultured cortical neurons through activation of PI3K/Akt and MEK/ERK1/2 pathways. *Brain Res* 1375:49–58
12. Rao RV, Bredesen DE (2004) Misfolded proteins, endoplasmic reticulum stress and neurodegeneration. *Curr Opin Cell Biol* 16:653–662

13. Michalak M, Parker JMR, Opas M (2002)  $\text{Ca}^{2+}$  signaling and calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *Cell Calcium* 32:269–278
14. Verkhratsky A (2005) Physiology and pathophysiology of the calcium store in the endoplasmic reticulum of neurons. *Physiol Rev* 85:201–279
15. Malhotra JD, Kaufman R (2007) The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Sem Cell Dev Biol* 18:716–731
16. Zhao L, Ackerman SL (2006) Endoplasmic reticulum stress in health and disease. *Curr Opin Cell Biol* 18:444–452
17. Merksamer PI, Papa FR (2010) The UPR and cell fate at a glance. *J Cell Sci* 123:1003–1006
18. Raghuram R, Nakka VP, Mehta SL (2011) Endoplasmic reticulum stress in brain damage. *Methods Enzymol* 489:259–275
19. Urano F, Wang XZ, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, Ron D (2000) Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* 287:664–666
20. Weston CR, Davis RJ (2007) The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Cell Biol* 19:142–149
21. Ron D, Walter P (2007) Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature Rev Mol Cell Biol* 8:519–529
22. Lai E, Teodoro T, Volchuk A (2007) Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response. *Physiology* 22:193–201
23. Boyce M, Yuan J (2006) Cellular response to endoplasmic reticulum stress: a matter of life or death. *Cell Death Differ* 13:363–373
24. Rasheva VI, Domingos P (2009) Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis* 8:996–1007
25. Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A (2006) Mediators of endoplasmic reticulum stress induced apoptosis. *EMBO Rep* 7:880–885
26. Nakagawa T, Zhu H, Muroshina N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan JY (2000) Caspase-12 mediated endoplasmic reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403:98–103
27. Nakagawa T, Yuan J (2000) Cross-talk between two cysteine protease families: activation of Caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol* 150:887–894
28. Rao RV, Hermel E, Castro-Obregon S, Del Rio G, Ellerby LM, Ellerby HM, Bredesen DE (2001) Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation. *J Biol Chem* 276:33869–33874
29. Yoneda T, Imaizumi K, Oono K, Yui D, Gomi F, Katayama T, Tohyama M (2001) Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *J Biol Chem* 276:13935–13940
30. Paschen W, Aufenberg C, Hotop S, Mengesdorf T (2003) Transient cerebral ischemia activates processing of xbp1 messenger RNA indicative of endoplasmic reticulum stress. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:449–461
31. Tajiri S, Oyadomari S, Yano S, Morioka M, Gotoh T, Hamada J-I, Ushio Y, Mori M (2004) Ischemia-induced neuronal cell death is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway involving CHOP. *Cell Death Differ* 11:403–415
32. Hayashi T, Saito A, Okuno S, Ferrand-Drake M, Dodd RL, Chan PH (2005) Damage to the endoplasmic reticulum and activation of apoptotic machinery by oxidative stress in ischemic neurons. *J Cereb Blood Flow Metab* 25:41–53
33. Morimoto N, Oida Y, Shimazawa M, Miura M, Kudo T, Imaizumi K, Hara H (2007) Involvement of endoplasmic reticulum stress after middle cerebral artery occlusion in mice. *Neuroscience* 147:957–967
34. Nakka VP, Gusain A, Raghuram R (2010) Endoplasmic reticulum stress plays critical role in brain damage after cerebral ischemia/reperfusion in rats. *Neurotox Res* 17:189–202
35. Benavides A, Pastor D, Santos P, Tranque P, Calvo S (2005) CHOP plays a pivotal role in the astrocyte death induced by oxygen and glucose deprivation. *Glia* 52:261–275
36. Badiola N, Penas C, Miñano-Molina A, Barneda-Zahonero B, Fadó R, Sánchez-Opazo G, Comella JX, Sabriá J, Zhu C, Blomgren K, Casas C, Rodríguez-Alvarez J (2011) Induction of ER stress in response to oxygen-glucose deprivation of cortical cultures involves the activation of the PERK and IRE-1 pathways and of caspase-12. *Cell Death Dis* 2:1–8
37. Mouw G, Zechel JL, Gamboa J, Lust WD, Selman WR, Ratcheson RA (2002) Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum resident caspase, after permanent focal ischemia in rat. *J Mol Neurosci* 14:183–186
38. Shibata M, Hattori H, Sasaki T, Gotoh J, Hamada J, Fukuuchi Y (2003) Activation of caspase-12 by endoplasmic reticulum stress induced by transient middle cerebral artery occlusion in mice. *Neuroscience* 118:491–499
39. Liu HJ, Yang JP, Wang CH, Liu RC, Li Y, Li CY (2009) Endoplasmic reticulum in the penumbra following middle cerebral artery occlusion in the rabbit. *Neurol Sci* 30:227–232
40. Hernández-Fonseca K, Massieu L, García de la Cadena S, Guzmán C, Camacho-Arroyo I (2012) Neuroprotective role of estradiol against neuronal death induced by glucose deprivation in cultured rat hippocampal neurons. *Neuroendocrinology* 96:41–50
41. Brewer GJ, Torricelli JR, Evege EK, Price PJ (1993) Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented neurobasal, a new serum free medium combination. *J Neurosci Res* 35:567–576
42. Mossman T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55–63
43. Berridge MV, Tan AS (1993) Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys* 303:474–482
44. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J Biol Chem* 193:265–275
45. Miñano A, Caballero-Benitez A, Lluch M, Morán J, Rodríguez-Alvarez J (2008)  $\text{C}_2$ -Ceramide mediates cerebellar granule cells apoptosis by activation of caspase-2, -9, -3. *J Neurosci Res* 86:1734–1747
46. Sokka AL, Putkonen N, Mudo G, Pryazhnikov E, Reijonen S, Khiroug L, Belluardo N, Lindholm D, Korhonen L (2007) Endoplasmic reticulum stress inhibition protects against excitotoxic neuronal injury in the rat brain. *J Neurosci* 27:901–908
47. Dahmer MK (2005) Caspases-2, -3, and -7 are involved in thapsigargin-induced apoptosis of SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Neurosci Res* 80:576–583
48. Larner SF, McKinsey DM, Hayes RL, Wang KKW (2005) Caspase 7: increased expression and activation after traumatic brain injury in rats. *J Neurochem* 94:97–108
49. Martinez JA, Zhang Z, Svetlov SI, Hayes RL, Wang KK, Larner SF (2010) Calpain and caspase processing of caspase-12 contribute to the ER stress-induced cell death pathway in differentiated PC12 cells. *Apoptosis* 15:1480–1493
50. Wek RC, Jiang HY, Anthony TG (2006) Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem Soc Trans* 34:7–11
51. Boyce M, Bryant KF, Jousse C, Long K, Harding HP, Scheuener D, Kaufman RJ, Ma D, Coen DM, Ron D, Yuan J (2005) A selective inhibitor of eIF2 $\alpha$  dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science* 307:935–939

52. Oyadomari S, Mori M (2004) Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ* 11:381–389
53. Cryer PE (2006) Mechanisms of sympathoadrenal failure and hypoglycemia in diabetes. *J Clin Invest* 116:1470–1473
54. Sandberg M, Butcher SP, Hagberg H (1986) Extracellular overflow of neuroactive amino acids during severe insulin-induced hypoglycemia: in vivo dialysis of the rat hippocampus. *J Neurochem* 47:178–184
55. McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ (2001) Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol* 21:1249–1259
56. Rao RV, Castro-Obregon S, Frankowski H, Schuler M, Stoka V, del Rio G, Bredezen DE, Ellerby HM (2002) Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. An Apaf-1-independent intrinsic pathway. *J Biol Chem* 277:21836–21842
57. Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T, Yasuhiko Y (2002) An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem* 277:34287–34294
58. Mao W, Iwai C, Keng PC, Vulapalli R, Liang C (2006) Norepinephrine-induced oxidative stress causes PC-12 cell apoptosis by both endoplasmic reticulum stress and mitochondrial intrinsic pathway: inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase survival pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* 290:1373
59. Páramo B, Hernández-Fonseca K, Estrada-Sánchez AM, Jiménez N, Hernández-Cruz A, Massieu L (2010) Pathways involved in the generation of reactive oxygen and nitrogen species during glucose deprivation and its role on the death of cultured hippocampal neurons. *Neuroscience* 167:1057–1069
60. Zhang A, Zhang J, Sun P, Yao C, Su C, Sui T, Huang H, Cao X, Ge Y (2010) EIF2 $\alpha$  and caspase-12 activation are involved in oxygen-glucose-serum deprivation/restoration-induced apoptosis of spinal cord astrocytes. *Neurosci Lett* 478:32–36
61. Malagelada C, Xifró X, Miñano A, Sabriá J, Rodríguez-Alvarez J (2005) Contribution of caspase-mediated apoptosis to cell death caused by oxygen-glucose deprivation in cortical cell cultures. *Neurobiol Dis* 20:27–37
62. Tan Y, Dourdin N, Wu C, De Veyra T, Elce JS, Greer PA (2006) Ubiquitous calpains promote caspase-12 and JNK activation during endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J Biol Chem* 281:16016–16024
63. Páramo B, Montiel T, Hernández-Espinosa DR, Rivera Martínez M, Morán J, Massieu L (2013) Calpain activation induced by glucose deprivation is mediated by oxidative stress and contributes to neuronal damage. *Int J Biochem Cell Biol* 45:2596–2604
64. Kumar R, Azam S, Sullivan JM, Owen C, Cavener DRC, Zhang P, Ron D, Harding HP, Chen JJ, Han A, White BC, Krause DJ, DeGracia DJ (2001) Brain ischemia and reperfusion activates the eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$  kinase, PERK. *J Neurochem* 77:1418–1421
65. Lerner SF, Hayes RL, McKinsey DM, Pike BR, Wang KKW (2004) Increased expression and processing of caspase-12 after traumatic brain injury in rats. *J Neurochem* 88:78–90
66. Ibuki T, Yamasaki Y, Mizuguchi H, Sokabe M (2012) Protective effects of XBP1 against oxygen and glucose deprivation/reoxygenation injury in rat primary hippocampal neurons. *Neurosci Lett* 518:45–48
67. Reijonen S, Putkonen N, Nørremølle A, Lindholm D, Korhonen L (2008) Inhibition of endoplasmic reticulum stress counteracts neuronal cell death and protein aggregation caused by N-terminal mutant huntingtin proteins. *Exp Cell Res* 314:950–960
68. Saxena S, Cabuy E, Caroni P (2009) A role for motoneuron subtype-selective ER stress in disease manifestations of FALS mice. *Nature Neurosci* 12:627–636



Apéndice 2

**“Caspases and their role in inflammation and ischemic neuronal death.  
Focus on caspase-12”.**

# Caspases and their role in inflammation and ischemic neuronal death. Focus on caspase-12

Selene García de la Cadena<sup>1</sup> · Lourdes Massieu<sup>1</sup>

© Springer Science+Business Media New York 2016

**Abstract** Caspases are cysteine proteases, which play important roles in different processes including, apoptosis and inflammation. Caspase-12, expressed in mouse and human, is classified as an inflammatory caspase. However, in humans caspase-12 gene has acquired different mutations that result in the expression of different variants. Caspase-12 is generally recognized as a negative regulator of the inflammatory response induced by infections, because it inhibits the activation of caspase-1 in inflammasome complexes, the production of the pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and IL-18 and the overall response to sepsis. In contrast, caspase-4, the human paralog of caspase-12, exerts a positive modulatory action of the inflammatory response to infectious agents. The role of caspase-12 and caspase-4 in inflammation associated with cerebral ischemia, a condition that results from a transient or permanent reduction of cerebral blood flow, is still unknown. Among the mechanisms involved in ischemic brain injury, apoptosis and inflammation have important roles. Under these conditions, disturbances in the homeostasis of the endoplasmic reticulum (ER) take place, leading to ER stress, caspase activation and apoptosis. Caspase-12 up-regulation and processing has been observed after the ischemic episode but its role in apoptosis is controversial. Cleavage of caspase-4 also occurs during ER stress but its role in ischemic brain injury is unknown. Throughout this review evidence supporting a role of caspase-12 and caspase-4 on the modulation of the inflammatory response to infection and their potential

contribution to ER stress-induced apoptosis, is discussed. Understanding the actions of rodent caspase-12 and human caspase-4 will help us to elucidate their role in different pathological conditions, which to date is not well understood.

**Keywords** Caspases · Apoptosis · Inflammation · Cerebral ischemia · ER stress · Caspase-4 · Caspase-12

## Abbreviations

CARD	Caspase-recruitment domain
DED	Death effector domain
DD	Death domain
DISC	Death inducing signaling complex
NLR	NOD-like receptor
ALR	AIM2 (absent in melanoma 2)-like receptor
ER	Endoplasmic reticulum
IRE1	Inositol-requiring enzyme 1
ATF6	Activating transcription factor 6
PERK	Protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase
GRP78	78-kDa glucose-regulated protein
eIF2 $\alpha$	$\alpha$ -Subunit of the eukaryotic translation initiation factor-2
ATF4	Activating transcription factor 4
XBP1	X-Box-binding protein 1
CHOP	C/EBP homologous protein
MCAO	Middle cerebral artery occlusion
OGD	Oxygen–glucose deprivation

✉ Lourdes Massieu  
lmassieu@ifc.unam.mx

<sup>1</sup> División de Neurociencias, Departamento de Neuropatología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70-253, México, D.F. CP 04510, Mexico

## Introduction

Caspases are cysteine proteases that specifically cleave proteins after aspartic acid residues, which play important roles in apoptosis and inflammation [1]. They are synthesized as single polypeptide chains of 32–55 kDa, which are

inactive zymogens or procaspases [2]. Caspases have been divided into two groups based on their function: caspase-2, -3, -6, -7, -8, -9 and -10 are apoptotic caspases, whereas caspase-1, -4, -5, -11 and -12 are involved in inflammation. The apoptotic caspases are subdivided into initiators and effectors based on their sequence of activation, their roles in apoptosis and according to the length of their prodomain [3]. These prodomains contain homotypic protein–protein interaction motifs of the death domain superfamily, specifically either a caspase-recruitment domain (CARD), or a death effector domain (DED) [4]. The initiator caspases (caspase-2, -8, -9 and -10), which have long N-terminal prodomains, are mostly monomeric in their preforms. This group of enzymes is activated through “induced proximity” when adaptor proteins interact with the prodomains and promote caspase dimerization by recruitment to huge oligomeric signaling complexes [1, 5]. In contrast, the effector caspases (caspase-3, -6 and -7) have shorter prodomains and exist in the cell as preformed but inactive homodimers, which are usually converted to the active enzyme by proteolytic processing by an initiator caspase [6].

### Caspases and apoptosis

Apoptosis is an evolutionarily conserved form of cell death observed from nematodes to mammals, which involves the controlled dismantling of intracellular components while cells are rapidly phagocytosed and cleared without the initiation of an inflammatory response [6–8]. Apoptosis is characterized by morphological and biochemical changes including condensation and fragmentation of nuclear chromatin, compaction of cytoplasmic organelles, dilatation of the ER, a decrease in cell volume and alterations to the plasma membrane [9–11]. The process of apoptosis involves the sequential activation of caspases. There are two major pathways of initiator caspases activation: (1) the death receptor-mediated pathway (extrinsic pathway) through the death inducing signaling complex (DISC) as an activating complex for procaspase-8 and -10, and (2) the mitochondria-mediated pathway (intrinsic pathway) through the apoptosome as activating complex for procaspase-9 [2]. The extrinsic pathway is initiated following ligand-binding to the death receptor. This interaction generates a caspase-activating complex inside the cell known as ternary DISC, usually containing Fas (Fas cell surface death receptor), Fas-associated death domain protein (FADD) and caspase-8 or -10. The recruitment and oligomerization of caspase-8 and -10 to the DISC complex, result in its autocatalytic activation [5, 12]. Recent studies have shown that caspase-2, other initiator caspase is activated by the formation of the PIDDosome complex [5, 13].

The intrinsic pathway activates the initiator caspase-9, through the interaction of Bcl-2 (B cell lymphoma 2) family members, such as, Bax (Bcl-2-associated X protein) and Bak (Bcl-2-antagonist/killer-1) in the mitochondrial membrane, which triggers the release of cytochrome *c* [12]. The release of this protein to the cytosol helps to assemble a heptamer rosette known as Apoptosome, which contains the apoptotic protease activating factor (Apaf-1), caspase-9, and cytochrome *c* [5]. These oligomeric signaling complexes serve to promote initiator caspases dimerization and activation via the induced proximity mechanism. Subsequently, effector caspases are cleaved and activated by specific initiator/upstream caspases in a cascade-like manner [8]. These caspases act directly on specific cellular substrates to dismantle the cell.

### Caspases and inflammation

In addition to their role in apoptosis, caspases have a critical role in inflammatory processes and a type of cell death, known as pyroptosis, which occurs in cells of the immune system and is closely related to the inflammatory response. Inflammatory caspases, also known as group I caspases are only present in vertebrates. The genetic locus in primates encodes four proteins, caspase-1, -4, -5 and -12, while the locus in rodents encodes three inflammatory caspases, caspase-1, -11 and -12. Sequence analysis of the inflammatory caspases suggests that caspase-4 and -5 probably arose following the duplication of a caspase-11 ancestor gene [14]. The activation of inflammatory caspases is mediated through their recruitment to large multiprotein complexes called inflammasomes [3]. These complexes assemble upon sensing of certain highly conserved microbial or viral structures, termed pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). In addition, danger or stress signals, for example UV irradiation or molecules released from injured cells like uric acid crystals, that are collectively called damage-associated molecular patterns (DAMPs), induce an inflammatory response mediated by inflammasomes [15]. The inflammasomes that have been best characterized are those containing NOD-like receptor (NLR) and AIM2 (absent in melanoma 2)-like receptor (ALR) proteins, which are a family of pattern-recognition receptors (PRRs) [4, 7]. These inflammasomes generally contain a NLR or ALR receptor and caspase-1, and may or may not contain the adaptor protein apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain (ASC) [8]. Caspase-1 (ICE; Interleukin-1 $\beta$  converting enzyme), the prototype member of this subfamily of inflammatory caspases, is well-known for its ability to induce proteolytic cleavage and activation of the pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and IL-18 leading to pyroptosis, a pro-inflammatory

type of cell death observed in macrophages, monocytes and dendritic cells, which is characterized by cell lysis and the release of pro-inflammatory molecules, presumably as an effective mechanism to deal with infectious agents [4, 16, 17]. IL-1 $\beta$  and IL-18 are synthesized as biologically inactive precursor proteins that require processing for their maturation and extracellular secretion before they can mediate their pro-inflammatory functions [4, 8]. Caspase-1 undergoes proximity-induced autoproteolysis by recruitment to multiple NLR-driven inflammasomes depending on the specific stimuli [18]. There are currently five major inflammasomes: (I) NLRP1 inflammasome is activated in response to anthrax lethal toxin exposure and by reduction in cellular ATP levels; (II) NLRP3/NALP3/cryopyrin inflammasome is activated by a wide range of PAMPs as well as whole pathogens, including fungi; (III) the NLRC4/IPAF inflammasome, which senses bacterial flagellin and various proteins from gram-negative bacteria; (IV) AIM2 inflammasome, which detects DNA from pathogens such as *Francisella tularensis*, cytomegalovirus and vaccinia virus and (V) pyrin inflammasome complex, which contains the N-terminal pyrin (PYD) domain, that interacts with ASC. It assembles with ASC and caspase-1 and responds to different pathogens such as *Burkholderia cenocepacia* and toxins of *Clostridium difficile*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Histophilus somni* [3, 4, 17, 19]. NLRP1 and NLRC4 inflammasomes can bind and activate caspase-1 directly via a CARD–CARD-mediated interaction [3]. In contrast, NLRP3 and AIM2 inflammasomes require the adapter protein ASC, which contains a PYD interaction domain and a CARD domain. The association of NLRP3 or AIM2 with ASC via the PYD domain allows the recruitment of the CARD-containing caspase-1 bringing it into close proximity resulting in its activation [8]. The NLRP1 inflammasome can also recruit caspase-5 via the CARD domain of the inflammasome adapter protein, CARDINAL [3]. Inflammasomes are regulated at multiple levels, NLRP3 activation is regulated by two steps: first requires a process known as inflammasome priming, which necessarily requires NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)-mediated transcriptional regulation of pro-IL-1 $\beta$  and NLRP3. Finally, activation of the NLRP3 inflammasome only occurs following detection of PAMPs and DAMPs as a second stimulus [3, 8].

Caspase-11, another inflammatory caspase present in rodents, is activated through the formation of a non-canonical inflammasome by a direct interaction between intracellular cytosolic lipopolysaccharides (LPS) and the CARD domain of caspase-11. Activation of this non-canonical inflammasome pathway can lead to pyroptosis and to the release of IL-1 $\alpha$  in a manner independent from NLRP3, ASC and caspase-1 [4, 20–22]. However, caspase-

11 cannot cleave pro-IL-1 $\beta$  directly but induces caspase-1 activity by NLRP3 activation stimulated by potassium efflux, leading to IL-1 $\beta$  maturation and secretion [21].

Caspase-4 and -5 are the human paralogs of rodent caspase-11. The role of caspase-4 on caspase-1 activation and the inflammatory response is still debated, but as caspase-11, it has been suggested that both caspase-4 and -5 recognize LPS in the cytosol and trigger pyroptosis by the activation of a non-canonical inflammasome [21, 22]. In human macrophages LPS leads to the activation of non-canonical inflammasome in a caspase-4 dependent manner, leading to the release of IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  [23]. Activation of non-canonical inflammasome by caspase-4 has been also observed in human macrophages in response to bacterial infection with *Legionella pneumophila*, leading to cell death and specifically to the release of IL-1 $\alpha$  but not IL-1 $\beta$  [23]. Similarly, in human intestinal epithelial cells the activation of a non-canonical inflammasome response by caspase-4 regulates the activation and secretion of IL-18 in response to the gram-negative bacteria *Salmonella typhimurium* or intracellular LPS, independently of caspase-1 activity. This response leads to pyroptotic death limiting bacterial infection [24]. These observations suggest that human macrophages and intestinal epithelial cells respond to bacterial infection by non-canonical inflammasome responses, which are regulated by caspase-4. This caspase also activates the NLRP3 inflammasome in human myeloid cells in response to LPS inducing caspase-1 activity and IL-1 $\beta$  processing and secretion [25, 26]. A similar observation was reported in human keratinocytes in response to irradiation [15]. These data support that caspase-4, as has been proposed for rodent caspase-11, is an important regulator of the inflammatory response to endotoxins in humans. In agreement, a recent study showed that transgenic mice expressing human caspase-4 are more prone to LPS-induced lethality and produce higher levels of IL-1 $\beta$ , IL-18, tumor necrosis factor-alpha (TNF $\alpha$ ) and interferon gamma (IFN $\gamma$ ) [27]. IL-1 $\beta$  secretion from bone marrow derived monocytes of mice expressing human caspase-4, is dependent on caspase-1 and NLRP3 inflammasome and caspase-4 is responsible for the processing and activation of caspase-1 [27]. In addition to these observations, a recent study showed that in human monocytic cells, caspase-4 stimulates the expression and secretion of chemokines and cytokines through the regulation of the NF- $\kappa$ B pathway in response to LPS. The interaction of caspase-4 with the tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factor 6 (TRAF6) and IL-1R-associated kinase (IRAK1), induces the phosphorylation of I $\kappa$ B, a negative regulator of NF- $\kappa$ B, stimulating its transcriptional activity and the expression of IL-8 and other inflammatory molecules. These observations indicate that caspase-4 can also regulate the inflammatory response in human cells through

NF- $\kappa$ B signaling [28]. The different inflammatory pathways positively modulated by caspase-4 are depicted in Fig. 1. The role of caspase-5 is less known and in contrast to caspase-4 its expression is normally low, although it is induced in response to LPS.

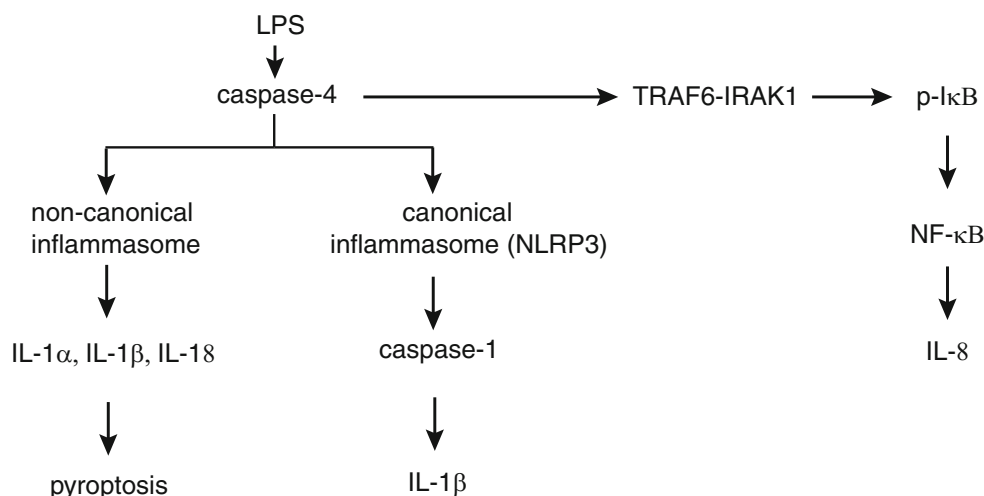
A recent study using biomolecular fluorescence complementation sensors to monitor caspases dimerization, revealed that caspase-1 dimerizes in macrophages transfected with ASC, NLRP1 or NLRP3 forming large fluorescent complexes. Similarly, to caspase-1, caspase-4 dimerizes in response to NLRP1, NLRP3 and NLRC4, but not in response to ASC. Caspase-5 dimerization was observed mainly when cells were transfected with NLRC4. In marked contrast to caspase-1, -4 and -5, caspase-12 dimerization was not observed in response to any of the inflammasome components, suggesting that this caspase does not interact directly with inflammasome complexes [29]. In the same study it was reported that caspase-1 can form heterodimers with caspase-4 and -5 in cells transfected with proteins of the different inflammasome complexes, and that the composition of the heterodimer depends on the particular protein transfected. Caspase-1/caspase-4 heterodimers were observed in response to ASC, NLRP1, NLRP3 and NLRC4, while caspase-1/caspase-5 heterodimer formation was observed mainly in the presence of ASC. Furthermore, this study reported homodimerization of caspase-1 and -5, as well as heterodimerization of caspase-1/caspase-5 in the presence of LPS and cholera toxin in primary murine macrophages transfected with ASC.

In addition to caspase-1, -11, -4 and -5, caspase-8, which has been traditionally associated with the extrinsic

apoptotic pathway, is also involved in inflammation. It has been recently observed that this caspase cleaves pro-IL-1 $\beta$  into its mature form and also activates caspase-1 in an inflammasome-independent manner [30, 31], although recent studies have shown that caspase-8 can also induce NLRP3 activity [32]. To date, the identified caspase-1 substrates include pro-IL-1 $\beta$  and pro-IL-18 but it can also cleave and activate both executioner caspase-3 and -7 [33]. On the other hand, very little is known about the physiological substrates of other inflammatory caspases. Caspase-4 has been shown to process pro-IL-18 and IL-1F7b inefficiently and was suggested to cleave caspase-3 and -1 into their active form [27, 34]. Caspase-5 was reported to cleave caspase-3 and was shown to process several pro-inflammatory cytokines, including IL-1 $\beta$  and IL-18 [34]. The only substrates known for caspase-11 are caspase-1 and -3, although it has recently been reported that this caspase can cleave gasdermin D, a protein whose physiological role is still unknown [35]. Although the inflammatory caspases, with the exception of caspase-12, are catalytically efficient and can process multiple cellular proteins *in vitro*, little is known about their substrates *in vivo*; therefore the precise function of these caspases is still unclear [36, 37].

### Caspase-12 and its role in sepsis

Caspase-12 is generally recognized as a negative regulator of the inflammatory response because it inhibits the activation of caspase-1 in inflammasome complexes, thereby modulating the production of IL-1 $\beta$  and IL-18 [11, 16].



**Fig. 1** Positive modulatory actions of caspase-4 on different inflammatory pathways in humans. Caspase-4 activates non-canonical inflammasomes upon LPS stimulation or bacterial infection leading to the release of interleukins in a caspase-1 independent manner. Caspase-4 can also activate canonical NLRP3 inflammasome leading

to caspase-1 activity and interleukin activation and secretion. Caspase-4 also modulates the NF- $\kappa$ B inflammatory pathway through the interaction with the TRAF6-IRAK1 complex leading to the phosphorylation of I $\kappa$ B and the activation of NF- $\kappa$ B and interleukin secretion

The murine caspase-12 gene is located on chromosome 9A1 together with the genes for caspase-11 and caspase-1. In humans, caspase-12 is located on chromosome 11q22.3, which in analogy to the murine system contains the genes for caspase-1, -4 and -5. Further upstream in human inflammatory caspase locus, are three genes encoding caspase-1-related CARD-only proteins: ICEBERG, INCA (inhibitory CARD) and COP (CARD-only protein) [16, 38]. The primary structure of murine caspase-12 has high homology with murine caspase-1 (39 % identity) and caspase-11 (38 % identity), and with human caspase-4 (48 % identity) and caspase-5 (45 % identity) [39]. The mRNA of murine caspase-12 can be found in almost all tissues. However, constitutive protein expression is restricted to skeletal muscle, heart, brain, liver, eye and testis. Although high caspase-12 mRNA expression levels were detected in the lymph nodes, thymus and spleen, only very low amounts of the protein could be detected in these organs [40]. In humans caspase-12 gene has acquired different mutations that result in the expression of different caspase-12 variants. Most individuals express the truncated form of caspase-12 (Casp 12-S) that has only a CARD domain and lacks catalytic activity [41]. Only in about 20 % of individuals of African descent the full length variant of caspase-12 (Casp 12-L) is expressed, because a single nucleotide polymorphism (SNP) changes the T residue at position 125 for a C residue. This SNP, which occurs in exon 4 turns the TGA stop codon to an encoding arginine codon (CGA), thus resulting in read-through and synthesis of a full length protein [38]. However, a catalytic activity in this Casp 12-L can be excluded since the SHG box, an element crucial for the enzymatic activity of caspases, is mutated to SHS [42, 43]. Expression of Casp 12-L at the protein level could be demonstrated in monocytes and macrophages of individuals heterozygous or homozygous for the Casp 12-L allele [16]. Analysis of population genetics suggests that Casp 12-S arose prior to the migration out of Africa approximately 100,000 years ago, which was followed by a positive selection pressure for Casp 12-S, presumably as a selective advantage for dealing with pathogens and diseases encountered in Europe or Asia, thereby favoring sepsis resistance [11, 44]. Besides rabbits and cows, humans are the only mammals that have lost a functional caspase-12 gene [11]. In a study in which samples of genomic DNA from people of distinct ethnic backgrounds were analyzed, it was found that Casp 12-L was present only in populations of African descent and was absent in all Caucasian and Asian groups tested [45]. In the same study, the authors observed that caspase-12 is naturally polymorphic in individuals of African ancestry and that the presence of the Casp 12-L allele in this population reduced cytokine production induced by LPS and increased susceptibility to severe sepsis and mortality [45]. However,

another study in humans, where the effect of the caspase-12 genotype on the susceptibility to *Candida* sepsis was evaluated, showed that caspase-12 had no significant effect on the susceptibility and severity of systemic infections with *Candida*. Furthermore, serum cytokine concentrations were shown to be unaffected by caspase-12 genotype [46]. In addition, the incidence of malaria and leishmaniasis show little correlation with the distribution of the Casp 12-L allele in African populations, since the incidence of these diseases is highest in East Africa where the presence of Casp 12-L is approximately 7 % [11].

Murine caspase-12 has similar functions in inflammation to human caspase-12 full-length variant. In agreement with human studies, it was observed that caspase-12 deficient mice (*Casp12<sup>-/-</sup>*) are more resistant to bacterial infections and sepsis than wild-type mice [43]. The resistance to sepsis of *Casp12<sup>-/-</sup>* mice is associated with an initial hyper-production of cytokines (IL-1 $\beta$  and IL-18) mediated by the de-repression of caspase-1. In the same study the authors observed overproduction for IFN- $\gamma$ , which promotes the survival of knockout mice from septic shock [43]. Notably, for these effects the enzymatic activity of caspase-12 is not necessary, since the mutation of the catalytic cysteine to alanine did not abrogate its inhibitory effects on both caspase-1 catalysis and IL-1 $\beta$  production [43]. In a subsequent study it was demonstrated that caspase-12 forms a complex with caspase-1 undergoing autocatalytic cleavage and that the resulting fragment remains associated with caspase-1. Furthermore, caspase-12 catalytic activity is not required for its interaction with caspase-1 [47]. Based on these observations, it has recently been suggested that caspase-12 acts as a dominant-negative regulator of the inflammasome by inhibiting caspase-1 in its activating complexes [17].

Caspase-12 can regulate other inflammatory routes, independently from the inflammasome and caspase-1 activation through the NOD signaling pathway [48, 49]. NOD proteins are involved in the mucosal innate immune response of intestine, after their activation by enteric pathogens. NOD proteins associate with Rip2 kinase to stimulate NF- $\kappa$ B signaling through the recruitment of the ubiquitin ligase TRAF6 to Rip2, leading to the production of antimicrobial peptides. The study by LeBlanc et al. [48] showed that caspase-12 binds to Rip2 kinase displacing TRAF6 from the NOD complex in intestine epithelial cells abating NF- $\kappa$ B activation and antimicrobial peptide production. This effect is independent of the presence of the CARD domain or caspase-12 catalytic activity. In agreement, caspase-12 deficient animals showed increased production of antimicrobial peptides and inhibition of bacterial growth, an effect independent of caspase-1 activation and IL-1 $\beta$  production, excluding the inflammasome pathway [48].



On the other hand, using *Casp12*<sup>-/-</sup> and wild type mice infected with *Plasmodium chabaudi*, the causative agent of malaria, Labbé et al. [49] showed that compared to wild type mice, *Casp12*<sup>-/-</sup> mice produced higher levels of cytokines such as IFN- $\gamma$ , which mediated their ability to more efficiently control parasite replication and clearance [49]. This protective phenotype of *Casp12*<sup>-/-</sup> animals was independent from the inflammasome and NOD signaling but was rather the result of the de-repression of NF- $\kappa$ B signaling. At rest, NF- $\kappa$ B is sequestered in the cytoplasm by the I $\kappa$ B family of inhibitory proteins. Upon receptor stimulation, activation of the IKK (I $\kappa$ B kinase) complex [IKK- $\alpha$ /IKK- $\beta$ /NF- $\kappa$ B essential modulator (NEMO)] leads to the phosphorylation and ubiquitination of I $\kappa$ B promoting its degradation and the release of NF- $\kappa$ B, which translocates to the nucleus to catalyze target gene transcription. Caspase-12 functions as a direct inhibitor of NF- $\kappa$ B by interfering with the formation of IKK complex. Caspase-12 competes with NEMO for IKK- $\alpha$ / $\beta$  binding effectively displacing NEMO from the complex and thus preventing the subsequent degradation of I $\kappa$ B and NF- $\kappa$ B translocation. Moreover, a catalytically inactive mutant of caspase-12 also efficiently inhibited NF- $\kappa$ B activity [49].

The above-described studies suggest that caspase-12 knockout mice are more resistant to bacterial infections and sepsis through improved inflammatory and innate immune responses. However, a contribution of caspase-11 cannot be discarded since *Casp12*<sup>-/-</sup> animals can also carry a mutation in the caspase-11 gene [50, 51]. Using *Casp11*<sup>-/-</sup>, *Casp11/11* double-knockout and *Casp1*<sup>-/-</sup>/*Casp11*<sup>Tg</sup> mice treated with LPS, Kayagaki et al. [50] reported that caspase-11 and caspase-1 are required for the release of IL-1 $\beta$  and IL-18. Furthermore, caspase-11 was essential for the death of macrophages and the release of IL-1 $\alpha$  in response to infection with cholera toxin B and *Escherichia coli* [50].

Besides participating in the de-repression of NF- $\kappa$ B and NOD signaling, it has been suggested that caspase-12 is required for the regulation of retinoic acid-inducible gene 1 protein (RIG-I)-like receptors RIG-I, which recognize viral double stranded RNA in the cytosol. Wang et al. [52] observed that in response to West Nile virus (WNV) infection, RIG-I is subjected to ubiquitination mediated by the tripartite motif-containing protein 25 (TRIM25) and that this process is regulated by caspase-12. Caspase-12 helps to recruit RIG-I to TRIM25 resulting in an effective type I interferon response, which does not require caspase catalytic activity. These observations suggest that caspase-12 can also exert a positive modulatory action of the immune response.

Overall, the observations described above suggest that caspase-12 can modulate the inflammatory and innate immune responses through its interaction with proteins of

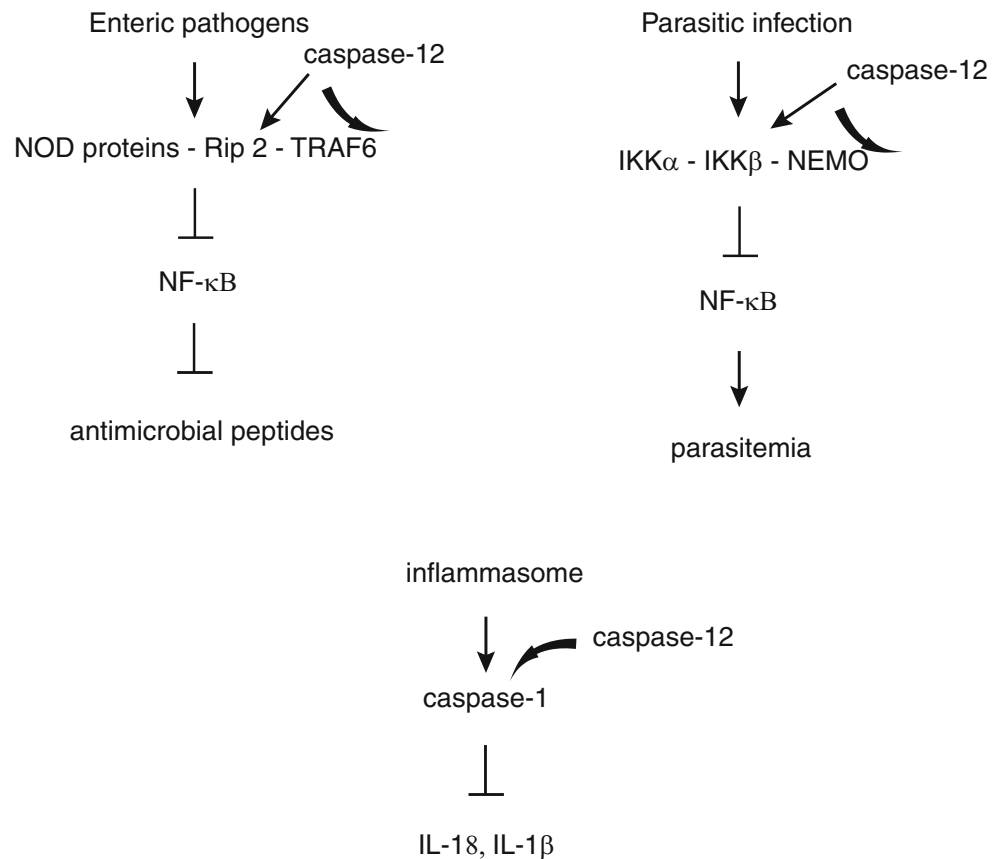
several inflammatory pathways (shown in Fig. 2) independently of its catalytic activity. However, little is known about the effect of the caspase-12 genotype on the inhibition of caspase-1 and cytokines release during sterile inflammation. A recent study shows that caspase-12 deficient mice are more prone to high fat diet-induced obesity, resulting in fatty liver disease, development of glucose intolerance, insulin-resistance and reduced insulin signaling [53]. Moreover, caspase-12 deficient animals showed increased inflammatory molecules and activation of caspase-1 in adipose tissue, and deletion of NLRP3 inflammasome reversed the *Casp12*<sup>-/-</sup> obese phenotype. Human studies in the African-American cohort of the Dallas Heart Study showed that in contrast to mice, individuals carrying the full-length caspase-12 are not protected from obesity, however analysis of obese children from the Yale Pediatric cohort, revealed that children carrying the full-length caspase-12 showed decreased inflammatory markers and a lower percent of macrophages in adipose tissue, suggesting that loss of caspase-12 may contribute to the inflammatory response associated with metabolic disturbances [53].

### Role of inflammasomes in cerebral ischemia

Recently, inflammasome complexes activation has been linked to a variety of non-infection pathological conditions related to inflammation, such as neurodegenerative diseases including multiple sclerosis, Alzheimer disease, Parkinson disease and stroke [54, 55]. Among these conditions, cerebral ischemia is related to an acute inflammatory process, and represents one of the leading causes of disability and death worldwide. Yet, treatments for cerebrovascular disease are limited to thrombolytic therapy, which requires early treatment (4–5 h after the onset of the symptoms) and benefits only a fraction of patients. Therefore, investigating the action of new modulatory molecules of the inflammatory response might offer new therapeutic strategies for the treatment of stroke.

The role of caspases related to the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways in ischemic apoptotic death, is well known [56–60] and will not be discussed in the present review. In contrast, the role of the inflammasomes in ischemic brain injury has not been well characterized and new information on this field is still emerging. Cerebral ischemia is the consequence of a transient or permanent reduction in cerebral blood flow (CBF) that is restricted to the territory of a major brain artery. The reduction in CBF is in most cases caused by the occlusion of a cerebral artery either by an embolus or by local thrombosis [61]. Among the mechanisms involved in ischemic brain damage, inflammation plays an important role; platelet-activating factor and inflammatory cytokines such as TNF $\alpha$ , IL-1 and

**Fig. 2** Negative modulatory actions of caspase-12 on different inflammatory pathways in rodents. Caspase-12 negatively modulates the NF- $\kappa$ B inflammatory pathway independently of the inflammasome by binding to Rip2 of the NOD complex displacing TRAF6 from the complex and blocking NF- $\kappa$ B activity, leading to a decreased production of antimicrobial peptides. Caspase-12 can also interact and displace NEMO away from the IKK- $\alpha$ /IKK- $\beta$  complex inhibiting NF- $\kappa$ B activity and leading to parasitemia. Caspase-12 also negatively modulates the inflammasome activity by the recruitment and displacement of caspase-1 away from the inflammasome, inhibiting the activation and secretion of interleukins



IL-6 appear to be robustly activated and secreted after the ischemic period. These cytokines may induce an inflammatory reaction and also act as chemoattractants to leukocytes [62]. Leukocytes may contribute to ischemic damage by re-occluding vessels after reperfusion (CBF restoration) or by entering infarcted tissue and exacerbating cell death. After cerebral ischemia, adhesion molecules are expressed in the endothelial cell surface, including intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), P-selectins and E-selectins [63].

During cerebral ischemia both NLRP1 and NLRP3 inflammasomes have been observed. The NLRP1 and NLRP3 inflammasomes can mediate neuronal cell death in ischemia through an increase in the production and secretion of the pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and IL-18, and through the actions of cleaved caspase-1 leading to pyroptosis and apoptosis [64]. A recent study using a mice model of focal cerebral ischemia induced by the occlusion of the middle cerebral artery (MCAO) demonstrated that ischemia/reperfusion (I/R) significantly increased the expression of NLRP1 and NLRP3 inflammasomes [64]. The same group observed that intermittent fasting reduced NF $\kappa$ B and MAPK signaling pathways and attenuated I/R-induced expression of NLRP1 and NLRP3, IL-1 $\beta$  and IL-18 and activation of caspase-1, -3 and -11 [65]. In

agreement with these studies, Yang et al. [66] observed increased expression of NLRP3 after 12–48 h of transient MCAO in mice, as well as increased levels of the pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and IL-18 and activation of caspase-1. In this same study, reduced infarction volume, edema formation and blood–brain barrier (BBB) permeability, was observed in NLRP3<sup>-/-</sup> mice, as compared to wild-type ischemic mice, suggesting a role of inflammasome activation in brain injury. Moreover, it was demonstrated that microglia cultures exposed to oxygen and glucose deprivation (OGD) exhibited apoptosis in a NLRP3-dependent manner [66]. It has been suggested that the formation of the NLRP3 inflammasome under ischemic conditions may result from activation of the NLRP3 receptor in response to DAMPs released from necrotic tissue within the ischemic core, whereas the NLRP1 can be activated in response to irregularities within the cellular microenvironment, such as reduction in ATP levels [19, 64]. Altogether, these studies suggest that the NLRP1 and NLRP3 inflammasomes activate following the ischemic period, and that this activation apparently contributes to brain injury.

Besides direct activation of NLRP1 and NLRP3 inflammasomes during I/R, evidence suggests that inflammatory caspases-1 and -12 play a role in neuronal cell



death during ischemia [67, 68]. Previous studies have reported that ischemic brain injury is reduced in mice with caspase-1 gene deletion [69] in agreement, with the observation that the intracerebroventricular administration of a caspase-1 inhibitor attenuates brain injury after transient focal cerebral ischemia [70]. Moreover, in caspase-1 deficient mice caspase-3 and -9 processing is reduced after MCAO as compared to wild-type mice, as well as Bid cleavage and the release of mitochondrial pro-apoptotic factors such as cytochrome *c*, smac/Diablo and apoptosis-inducing factor (AIF) [67]. Caspase-12 has also been associated with ischemic brain damage. Aoyama and colleagues [71] demonstrated the cleavage of caspase-12 in the peri-infarct region of mice subjected to 1 h transient MCAO. Other studies have also documented the processing of caspase-12 after I/R, mainly as a result of disturbances of the ER, which lead to ER stress and apoptosis. However, as discussed in the next sections, the role of caspase-12 in ER stress-mediated apoptosis has been questioned due to its low catalytic activity and the lack of identification of its downstream targets.

### Endoplasmic reticulum stress, caspases activation and apoptosis

ER is an organelle that regulates intracellular calcium levels and also the main subcellular compartment involved in the synthesis and folding of proteins destined for secretion, the cell membrane, the Golgi apparatus and lysosomes [72]. Disruption of homeostasis in the ER can be caused by variety of factors such as glucose deprivation (GD), hypoxia,  $\text{Ca}^{2+}$  depletion and oxidative stress [73, 74]. All these processes can induce the accumulation of misfolded or unfolded proteins in the ER lumen, a condition known as ER stress, which leads to the activation of an adaptive cellular response known as the unfolded protein response (UPR). In mammals, UPR signaling is mediated by three ER transmembrane protein sensors: the inositol-requiring enzyme 1 (IRE1), the activating transcription factor 6 (ATF6) and the protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase (PERK) [75]. Under normal conditions each sensor is maintained in an inactivated state through binding, via their luminal domain, to the ER chaperone 78-kDa glucose-regulated protein [GRP78; also named binding immunoglobulin protein (Bip)]. When unfolded proteins accumulate in the ER they bind to and sequester GRP78, thereby activating the ER sensors [76]. Once activated, PERK phosphorylates the  $\alpha$ -subunit of the eukaryotic translation initiation factor-2 (eIF2 $\alpha$ ), which leads to the inhibition of global protein synthesis, reducing the load of proteins inside the ER [77, 78]. Paradoxically, phosphorylated eIF2 $\alpha$  (p-eIF2 $\alpha$ ) promotes the translation of the

mRNA encoding activating transcription factor 4 (ATF4), which induces the transcription of genes encoding the ER chaperones, GRP78 and GRP94 (94-kDa glucose-regulated protein), the UPR-associated transcription factor, XBP1 (X-box-binding protein 1) [74] and proteins involved in amino acid transport, glutathione biosynthesis and resistance to oxidative stress [79]. The expression of these genes restores ER homeostasis and promotes cell survival. However, ATF4 can also induce the expression of pro-apoptotic factors such as C/EBP homologous protein (CHOP) also named growth arrest and DNA damage-inducible gene 153, (GADD153) [80], which promotes apoptosis by the down regulation of the anti-apoptotic protein Bcl-2, and the increased expression of pro-apoptotic factor, Bim [74, 81–83]. Thus, the PERK branch of the UPR first mediates a pro-survival response, which switches into a pro-apoptotic response when ER stress is severe or prolonged [84]. ATF6 is an ER located protein with a C-terminal luminal domain and a bZIP transcription factor in its cytosolic domain. During ER stress, GRP78 dissociates from the luminal domain of ATF6, promoting its translocation to the Golgi apparatus, where it is cleaved by site-1 and site-2 proteases (S1P and S2P) [85, 86], and transported into the nucleus where it regulates the expression of genes with cAMP (CRE) and ER stress response elements (ERSE). Among them, are components of the ER-associated protein degradation (ERAD) pathway, GRP78 and GRP94 chaperones, protein disulfide isomerase (PDI), calnexin and the transcription factor XBP1 [72, 74, 87]. The expression of these genes is mainly involved in adapting to ER stress, but if the cell is unable to restore ER homeostasis, ATF6 can induce the up-regulation of CHOP and pro-apoptotic genes [83, 88]. The third branch of the UPR pathway is initiated by the activation of IRE1, a transmembrane protein with a serine/threonine kinase domain and an endoribonuclease (RNase) domain, in its cytosolic portion. Misfolded proteins induce IRE1 dimerization and trans-autophosphorylation, which leads to a conformational change that activates the RNase domain [74]. Active IRE1 excises a 26-nucleotide-long intron of XBP1 mRNA, resulting in the expression of an active and stable transcription factor, termed spliced XBP1 (XBP1s) [89]. XBP1s translocates to the nucleus and binds both ERSE and the unfolded protein response element (UPRE) sequences, to activate the expression of genes encoding ER-resident chaperones, components of ERAD machinery and phospholipid biosynthetic genes [90–93].

Nevertheless, when the initial adaptive response to the UPR fails, cells activate death programs by the c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway [94]. The phosphorylation of IRE1 in the cytosolic domain stimulates its interaction with TNFR-associated factor 2 (TRAF2), which recruits and activates apoptosis signaling kinase (ASK1)

that subsequently phosphorylates and activates JNK [74]. JNK phosphorylates several Bcl-2 family members, promoting cytochrome *c* release, caspase activation and apoptosis. Thus, signals initiated from the cytosolic kinase domain of IRE1 are largely pro-apoptotic involving the JNK pathway [87]. A role of caspase-12 in ER stress-mediated apoptosis has also been suggested. Yoneda et al. [95] observed the homodimerization and processing of caspase-12 downstream of IRE1 activation. Under basal conditions, TRAF2 forms a stable complex with procaspase-12 and ER stress induces the dissociation of caspase-12 from TRAF2 promoting its dimerization [95]. However, the proteolytic activity of caspase-12 towards downstream caspases was not demonstrated in this condition, neither its contribution to apoptosis. Another study suggested that the autocatalytic processing of caspase-12 during ER stress leads to the cleavage of caspase-9 and caspase-3 in an Apaf-1/cytochrome *c*-independent manner in the C2C12 myoblast cell line [96]. Similarly, cleavage of caspase-12 and the downstream processing of caspase-9 and caspase-3 independently from Apaf-1<sup>-/-</sup>, was observed in immortalized mouse embryonic fibroblasts (Sak2) after treatment with thapsigargin. In these conditions a catalytically inactive caspase-12 mutant elicited no cell death, suggesting the contribution of this caspase to apoptosis [97]. In contrast, to these observations, other studies strongly suggest that caspase-12 catalytic activity is very low as compared to that of other caspases and limited to self processing [47, 98].

Caspase-12 can be cleaved into 35–38 kDa fragments by other proteases like calpain and caspase-7 [99–101]. Caspase-7 can cleave caspase-12 in hippocampal cultured neurons, differentiated PC12 cells and HEK293T cells during ER stress [100–102]. ER stress leads to the recruitment of caspase-7 to the ER surface, where it forms a complex with caspase-12 and GRP78, and this interaction results in caspase-7-mediated cleavage of caspase-12 [102, 103]. GRP78 exists as an ER lumen protein, but it also colocalizes with caspase-7 in the cytosol, in a complex that suppresses its activation [104]. However, how caspase-7 is recruited to the ER and activated during ER stress remains to be determined.

Pioneer studies by Nakagawa and collaborators suggested that the processing of caspase-12 occurs as a consequence of ER stress and contributes to apoptotic death [39]. They showed that caspase-12 is an ER resident caspase and that cells deficient in caspase-12 are resistant to apoptosis induced by ER stress inducers such as tunicamycin (Tm), thapsigargin (Tg) and brefeldin A (BFA). Also, cultured cortical neurons from caspase-12 deficient mice are resistant to amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) peptide neurotoxicity [39]. Importantly, induction of apoptosis through pathways that do not involve the ER does not result in the processing

of caspase-12 [39, 102]. In HEK293T cells treated with tamoxifen, which causes apoptosis without inducing ER stress, no increase in caspase-12 expression was observed. While, treatment of these cells with BFA or Tg led to caspase-12 cleavage and the translocation of cytosolic caspase-7 to the ER surface [102]. Similarly, in cultured spinal neurons treatment with BFA induced the cleavage of caspase-12 [105]. Thus, these observations suggested that in rodents, caspase-12 is cleaved and contributes to apoptosis specifically in response to ER stress inducing stimuli [39]. However, other studies proposed that caspase-12 is not required for ER stress-induced apoptotic death [106, 107]. In murine embryonic telencephalic cells devoid from Apaf-1 and treated with Tm, Di Sano et al. [107] observed that apoptosis was highly reduced and caspase-12 was not processed. Conversely, in Apaf-1<sup>+/+</sup> cells lacking caspase-12 UPR signaling led to apoptosis, suggesting that the apoptosome is involved in ER stress-mediated apoptotic death while caspase-12 is not. Similar results were reported by Obeng et al. [106] in a murine pro-B-cell line, which lacks caspase-12 expression. When exposed to ER-stress inducing agents UPR signaling and apoptosis was observed, while cell death was prevented when caspase-9 dominant negative was overexpressed.

In contrast to mouse, human caspase-12 gene has a premature stop codon and an amino acid substitution in the SHG motif required for enzymatic activity [42]. Nevertheless, other caspases with similar structures might functionally substitute for caspase-12 in humans [108] such as caspase-4, which can function as an ER stress-induced caspase in humans and might be involved in the pathogenesis of various neurodegenerative diseases such as Alzheimer disease (AD) [108, 109]. Caspase-4, as caspase-12, is mainly located in the ER membrane and specifically activated by stimuli inducing ER stress and apoptosis in human neuroblastoma cells [110]. In a study using human neutrophils treated with arsenic trioxide (ATO) and Tm, an increase in ER stress markers was observed accompanied by the processing of caspase-4. Additionally, caspase-4 activity was evaluated using a fluorogenic substrate and the increased activity induced by ATO was reversed when neutrophils were pretreated with a caspase-4 inhibitor [111]. This study demonstrated for the first time that the ER stress-mediated apoptotic pathway operates in human neutrophils and that it is mediated by caspase-4 [111].

On the other hand, previous studies showed a role of calpain in the cleavage and activation of caspase-12 [99, 100]. In agreement, calpain inhibitors block the cleavage of caspase-4 in human neuroblastoma SK-N-SH cells incubated with Tg or A $\beta$ , suggesting the role of calpain in the activation of this caspase [108]. Matsuzaki et al. [108] also demonstrated that treatment with calpain inhibitors and the calcium chelator, EGTA reduced ER stress-induced

neuronal death via the inhibition of caspase-4 activity. Additionally, inhibition of this caspase resulted in a significant reduction of the cleavage of caspase-3 [108].

In agreement, with these data it has been observed that familial AD-linked presenilin-1 (PS1) mutation ( $\Delta E9$ ) increases the vulnerability to ER stress and leads to the activation of caspase-4. In this study Yukioka et al. [109] observed that overexpression of human caspase-4 in COS-7 cells induced the cleavage of caspase-9 and caspase-3 without releasing cytochrome *c* from the mitochondria [109]. Furthermore Hitomi et al. [110] using SK-N-SH and HeLa cells observed that overexpression of Bcl-2 did not affect cleavage of caspase-4 suggesting that caspase-4 is activated upstream the activation of effector caspases during ER stress-induced apoptotic death [110]. In this study, when SK-N-SH cells were transfected with small interfering RNA (siRNA) to caspase-4, decreased Tg and A $\beta$ -induced cell death occurred, suggesting that caspase-4 is involved in neuronal apoptosis [110]. In support of the role of caspase-4 in the activation of effector caspases, Bian et al. [112] showed that the caspase-4 inhibitor, Z-LEVD, abolished both Tm-induced activation of caspase-3 and apoptosis in human retinal pigment epithelial (hRPE) cells, suggesting that caspase-3 acts downstream of caspase-4 [112]. Importantly, in the same study, Bian et al. [112] showed that proinflammatory agents induced the up-regulation of GRP78, caspase-4 activation and apoptosis, suggesting an intersection between inflammatory stimuli and ER stress.

Altogether, these observations suggest that caspase-4 act as the human functional counterpart of murine caspase-12 in ER stress-induced apoptosis.

### ER stress and caspase-12 in neuronal death induced by brain ischemia

Many studies have suggested a pivotal role of ER stress in brain damage associated with cerebral ischemia. In addition to the activation of the mitochondrial apoptotic pathway following up-regulation of CHOP and JNK phosphorylation, the contribution of caspase-12 to apoptosis, has also been suggested based on observations indicating its up-regulation and processing after the ischemic period. However, due to the low proteolytic activity of this caspase and the lack of identification of a caspase cascade downstream of caspase-12, its role in ischemic apoptosis remains controversial. On the other hand, evidence on the contribution of caspase-4 to ischemic injury is still lacking.

Several studies have shown that caspase-12 is cleaved after permanent and transient focal cerebral ischemia in rodent models. Moreover, processing of this caspase correlates with the up-regulation of markers of the PERK and

the IRE1 pathways of the UPR during ischemic reperfusion. In rats subjected to permanent MCAO, increased expression of procaspase-12 mRNA and its cleavage was observed in the ischemic core 24 h after ischemia [113]. Similarly, in the I/R model of MCAO, a marked increase in the expression of GRP78, ATF4 and CHOP was observed from 3 to 24 h after reperfusion. In this study, the authors also observed an increase in the processed xbp1 mRNA after I/R in the affected brain regions [114]. The increase in ER stress markers correlated with the augmented expression of procaspase-12 mRNA and the production of a caspase-12 fragment in the ischemic core 24 h after ischemia. However, the catalytic activity of this fragment towards caspases or other substrates was not reported. Importantly, salubrinal, a small compound that inhibits the dephosphorylation of eIF2 $\alpha$  and maintains the suppression of protein synthesis counteracting ER stress [115], reduced the volume of the ischemic infarct, supporting the role of the PERK branch of the UPR in ischemic neuronal death [114]. The effect of salubrinal on caspase-12 up-regulation or processing was not reported in the study by Nakka et al. [114], however, it has been shown that salubrinal treatment reduces the cleavage of caspase-12 and the activity of caspase-3, reducing neuronal damage induced by the glutamate receptor agonist, kainic acid in cultured neurons and in the rat hippocampus *in vivo*. The effect of salubrinal is mediated via the inhibition of ER stress, as suggested by its effect on caspase-12, caspase-3 and GRP78 [116].

Shibata et al. [117] also reported in the transient MCAO model in mice, the cleavage of caspase-12 from 5 to 23 h after reperfusion following 1 h ischemia. Caspase-12 processing correlated with the up-regulation of GRP78 and the presence of apoptotic cells. Similar results were reported in the rabbit brain 6 h and 3 days after 2 h transient MCAO [118]. On the other hand, Zhu and coworkers [119] observed in the same model increased expression of phosphorylated JNK (p-JNK), CHOP and caspase-12 from 6 to 72 h after reperfusion. Furthermore, the administration of a JNK phosphorylation inhibitor reduced the levels of p-JNK and caspase-12 suggesting the contribution of the IRE1 pathway to caspase-12 up-regulation. Increased expression and cleavage of caspase-12 has been also observed after traumatic brain injury in the rat hippocampus and cortex, which correlates with neuronal damage [120]. All these studies demonstrated increased expression and/or processing of caspase-12 after the ischemic episode, however, they relied on caspase-12 cleavage as an index of its activity, while caspases or other target molecules downstream of caspase-12 were not identified. In addition, evidence demonstrating the reduction of the ischemic infarct by direct inhibition of caspase-12 or caspase-12 deficiency is still lacking. Hence, the apoptotic cascade activated downstream of caspase-12 is still elusive and

thus, the relevance of caspase-12 in ER stress-mediated apoptosis after brain ischemia needs to be clarified.

### ER stress and caspase-12 in neuronal death induced by oxygen and glucose deprivation

Caspase-12 processing and the induction of apoptosis have also been suggested in ischemia cellular models using murine cultured neurons exposed OGD. A pioneer study by Nakagawa and Yuan [99] reported the cleavage of caspase-12 in mixed glial cultures from mouse cortex exposed to OGD, accompanied by the up-regulation of GRP78 and GRP94 suggesting caspase-12 processing as a consequence of ER stress. Moreover, the authors reported that m-calpain but not caspases mediates caspase-12 processing and calpain inhibition rescued cells from OGD-induced injury. The authors demonstrated that the 35 kDa calpain breakdown-product of caspase-12 was active in self-processing producing smaller fragments. Furthermore, transfection of the 35 kDa caspase-12 fragment promoted cell death in a rat fibroblast cell line suggesting its contribution to apoptosis. Calpain-mediated processing of caspase-12 was also observed after the exposure to thapsigargin [99]. However, caspase-12 catalytic activity towards other substrates than itself was not determined in this study.

Elevated levels of ER stress markers of the PERK and IRE1 pathways have been observed in murine cultured neurons and astrocytes exposed to OGD. Badiola et al. [121] reported in mouse cortical cultured neurons caspase-12 cleavage after 12–24 h of oxygen and glucose reintroduction. Cleavage of caspase-12 correlated with increased levels of markers of the PERK and IRE1 pathways, and in agreement with Nakagawa and Yuan [99], caspase-12 processing was dependent on calpain activity [121]. Similarly, in cultured cortical neurons Chen et al. [122] reported an increase in p-eIF2 $\alpha$  and caspase-12 processing after calcium release from the ER by the stimulation of inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor (IP<sub>3</sub>R) soon after OGD. Activation of the PERK pathway and subsequent caspase-12 cleavage was also observed in rat spinal cord astrocytes after the exposure to oxygen-glucose-serum deprivation [123].

In cultured glial cells exposed to OGD caspase-12 processing was demonstrated, while oxygen deprivation alone did not induce caspase cleavage [99]. In a recent study we investigated whether glucose deprivation (GD) alone in hippocampal cultured neurons from fetal rats, leads to ER stress and caspase-12-dependent apoptosis. We observed a rapid induction of the PERK branch of the UPR and caspase-12 processing during the GD phase [100]. The increase in p-eIF2 $\alpha$  and ATF4 occurred soon after glucose withdrawal, and was followed by the up-regulation of

CHOP and GRP78. Caspase-7 and calpain-mediated caspase-12 processing into a 36 kDa fragment and salubrinal prevented both caspase-12 cleavage and activity towards a peptide fluorogenic substrate. Overall, the observations described above demonstrate that the PERK and IRE1 pathways of the UPR are activated during OGD and GD in cultured neurons and glial cells leading to caspase-12 processing. They suggest that the loss of intracellular calcium homeostasis induces ER stress and activation of calpains, which in turn leads to the cleavage caspase-12. However, as in the case of in vivo studies the apoptotic cascade downstream caspase-12 remains to be elucidated.

The role of ER stress and caspase-12 in the inflammatory response to ischemia and OGD is still unknown, but a recent study in human cell lines demonstrates that ER stress inducers lead to the up-regulation of the NLRP1 inflammasome [124]. In addition, it has been observed that IRE1 $\alpha$  activates the NLRP3 inflammasome, increases caspase-1 cleavage and IL-1 $\beta$  secretion [125]. Moreover, IRE1 $\alpha$  activation increases mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and promotes NLRP3 association with mitochondria. This leads to the cleavage of the pro-apoptotic factor, Bid by caspase-2 driving the release of mitochondrial contents and the activation the inflammasome [126]. On the other hand, it was reported in mice cultured astrocytes, that ER stress leads to caspase-12 cleavage, up-regulation of NLRP3 and NF- $\kappa$ B, caspase-1 activation and IL-1 $\beta$  processing [127]. These studies suggest that ER stress can lead to inflammasome activation, which contributes to cell death. More studies are necessary to elucidate the relationship between the UPR and inflammation during ischemia and other pathological conditions, as well as the role of caspase-4 and -12 in these processes.

### Conclusions

Throughout this review we discussed evidence supporting that inflammatory caspases are activated in inflammasome complexes in response to infectious agents and ischemic brain injury. Caspase-1 is a key caspase activated in the inflammasome, leading to the cleavage and activation of the pro-inflammatory molecules IL-1 $\beta$  and IL-18 and the induction of pyroptosis. The activity of inflammasome complexes can be positively or negatively modulated by other inflammatory caspases. Human caspase-4 is a positive modulator of the inflammatory response, and this action is exerted by its interaction with protein components of the inflammasome or proteins of other inflammatory signaling pathways, such as NF- $\kappa$ B. Caspase-12, is an inflammatory caspase expressed in mouse and human. In humans the caspase-12 gene has acquired different mutations that result in the expression of variants, with no

catalytic activity. Caspase-12 exerts a negative modulatory action of the inflammatory response to infection, through its interaction and inhibition of caspase-1 preventing the production of pro-inflammatory cytokines in response to sepsis. Similarly to caspase-4, caspase-12 interacts with proteins of other inflammatory pathways such as NOD and NF- $\kappa$ B, but differently from caspase-4, caspase-12 exerts a negative modulatory effect through these interactions. Importantly, for these effects caspase-12 catalytic activity is not required. In addition to the modulatory role of the inflammatory response, caspase-12 and -4 are similarly processed by calpain in response to ER stress. Studies in rodent models of ischemia support the activation of the inflammasome and the processing of caspase-12 induced by ER stress, however the relationship between ER stress, caspase-12 processing and the inflammasome response, is still unknown. On the other hand, studies on the role of caspase-4 in the ischemic injury are still lacking. In conclusion, the evidence presented in this review suggests a dual role of caspase-4 and caspase-12 in the inflammatory and ER stress responses. The relationship between these two processes is still poorly understood and deserves further study.

**Acknowledgments** We apologize to all authors whose work could not be cited in the present review due to space limitations. LM laboratory work has been supported by CB239607 CONACYT and IN204213 PAPIIT (UNAM) Grants and S.G.C. was supported by 221026 CONACYT.

## References

- Parrish AB, Freel CD, Kornbluth S (2013) Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5:1–24
- Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK (2008) Caspases—an update. *Comp Biochem Physiol B* 151:10–27
- Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, Kumar S (2014) Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ* 21:1–14
- Lamkanfi M, Dixit VM (2014) Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell* 157:1013–1022
- Park HH (2012) Structural features of caspase-activating complexes. *Int J Mol Sci* 13:4807–4818
- Thornberry NA, Lazebnik Y (1998) Caspases: enemies within. *Science* 281:1312–1316
- Mcllwain DR, Berger T, Mak TW (2013) Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5:1–28
- Creagh EM (2014) Caspase crosstalk: integration of apoptotic and innate immune signalling pathways. *Trends Immunol* 35:631–640
- Cohen GM (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326:1–16
- Wang ZB, Liu YQ, Cui YF (2005) Pathways to caspase activation. *Cell Biol Int* 29:489–496
- Hermel E, Klapstein K (2011) A possible mechanism for maintenance of the deleterious allele of human caspase-12. *Med Hypotheses* 77:803–806
- Denault JB, Salvesen GS (2002) Caspases: keys in the ignition of cell death. *Chem Rev* 102:4489–4499
- Park HH, Wu H (2006) Crystal structure of RAIDD death domain implicates potential mechanism of PIDDosome assembly. *J Mol Biol* 357:358–364
- Kersse T, Vanden Berghe T, Lamkanfi M, Vandenabeele P (2007) A phylogenetic and functional overview of inflammatory caspases and caspase-1-related CARD-only proteins. *Biochem Soc Trans* 35:1508–1511
- Sollberger G, Strittmatter GE, Kistowska M, French LE, Beer HD (2012) Caspase-4 is required for activation of inflammasomes. *J Immunol* 188:1992–2000
- Kersse K, Vandenabeele P (2013) Caspase-12. In: Rawlings ND, Salvesen GS (eds) *Handbook of proteolytic enzymes*, 3rd edn. Academic Press, Oxford, pp 2274–2280
- Jiménez D, Lamkanfi M (2015) Inflammatory caspases: key regulators of inflammation and cell death. *Biol Chem* 396:193–203
- Schroder K, Tschopp J (2010) The inflammasomes. *Cell* 140:821–832
- Chavarría-Smith J, Vance R (2014) The NLRP1 inflammasomes. *Immunol Rev* 265:22–34
- Casson CN, Copenhaver AM, Zwack EE, Nguyen HT, Strowig T, Javdan B, Bradley WP, Fung TC, Flavell RA, Brodsky IE, Shin S (2013) Caspase-11 activation in response to bacterial secretion systems that access the host cytosol. *PLoS Pathog* 9:1–16
- Kayagaki N, Wong MT, Stowe IB, Ramani SR, Gonzalez LC, Akashi-Takamura S, Miyake K, Zhang J, Lee WP, Muszynski A, Forsberg LS, Carlson RW, Dixit VM (2013) Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4. *Science* 341:1246–1249
- Shi J, Zhao Y, Wang Y, Gao W, Ding J, Li P, Hu L, Shao F (2014) Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. *Nature* 514:187–192
- Casson CN, Yu J, Reyes VM, Taschuk FO, Yadav A, Copenhaver AM, Nguyen HT, Collman RG, Shin S (2015) Human caspase-4 mediates noncanonical inflammasome activation against gram-negative bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 112:6688–6693
- Knodler LA, Crowley SM, Sham HP, Yang H, Wrangle M, Ma C, Ernst RK, Steele-Mortimer O, Celli J, Vallance BA (2014) Non-canonical inflammasome activation of caspase-4/caspase-11 mediates epithelial defenses against enteric bacterial pathogens. *Cell Host Microbe* 16:249–256
- Baker PJ, Boucher D, Bierschenk D, Tebartz C, Whitney PG, D’Silva DB, Tanzer MC, Monteleone M, Robertson AA, Cooper MA, Alvarez-Diaz S, Herold MJ, Bedoui S, Schroder K, Masters SL (2015) NLRP3 inflammasome activation downstream of cytoplasmic LPS recognition by both caspase-4 and caspase-5. *Eur J Immunol* 45:2918–2926
- Schmid-Burgk JL, Gaidt MM, Schmidt T, Ebert TS, Bartok E, Hornung V (2015) Caspase-4 mediates non-canonical activation of the NLRP3 inflammasome in human myeloid cells. *Eur J Immunol* 45:2911–2917
- Kajiwaraya Y, Schiff T, Voloudakis G, Gama Sosa MA, Elder G, Bozdagi O, Buxbaum JD (2014) A critical role for human caspase-4 in endotoxin sensitivity. *J Immunol* 193:335–343
- Lakshmanan U, Porter AG (2007) Caspase-4 interacts with TNF receptor-associated factor 6 and mediates lipopolysaccharide-induced NF- $\kappa$ B-dependent production of IL-8 and CC chemokine ligand 4 (macrophage-inflammatory protein-1 $\beta$ ). *J Immunol* 179:8480–8490
- Sanders MG, Parsons MJ, Howard AG, Liu J, Fassio SR, Martinez JA, Bouchier-Hayes L (2015) Single-cell imaging of



- inflammatory caspase dimerization reveals differential recruitment to inflammasomes. *Cell Death Dis* 6:1–11
30. Gringhuis S, Kaptein TM, Wevers BA, Theelen B, Van der Vlist M, Boekhout T, Geijtenbeek TBH (2012) Dectin-1 is an extracellular pathogen sensor for the induction and processing of IL-1 $\beta$  via a noncanonical caspase-8 inflammasome. *Nat Immunol* 13:246–255
  31. Philip NH, Dillon CP, Snyder AG, Fitzgerald P, Wynosky-Dolfi MA, Zwack EE, Hu B, Fitzgerald L, Mauldin EA, Copenhaver AM, Shin S, Wei L, Parker M, Zhang J, Oberst A, Green DR, Brodsky IE (2014) Caspase-8 mediates caspase-1 processing and innate immune defense in response to bacterial blockade of NF- $\kappa$ B and MAPK signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:7385–7390
  32. Gurung P, Anand PK, Malireddi RK, Vande Walle L, Van Opdenbosch N, Dillon CP, Weinlich R, Green DR, Lamkanfi M, Kanneganti TD (2014) FADD and caspase-8 mediate priming and activation of the canonical and noncanonical Nlrp3 inflammasomes. *J Immunol* 192:1835–1846
  33. Fann DYW, Lee SY, Manzanero S, Chunduri P, Sobey C, Arumugam T (2013) Pathogenesis of acute stroke and the role of inflammasomes. *Ageing Res Rev* 12:941–966
  34. Hotchkiss RS, Nicholson DW (2006) Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat Rev Immunol* 6:813–822
  35. Kayagaki N, Stowe IB, Lee BL, O'Rourke K, Anderson K, Warming S, Cuellar T, Haley B, Roose-Girma M, Phung QT, Liu PS, Lill JR, Li H, Wu J, Kummerfeld S, Zhang J, Lee WP, Snipas SJ, Salvesen GS, Morris LX, Fitzgerald L, Zhang Y, Bertram EM, Goodnow CC, Dixit VM (2015) Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signaling. *Nature* 526:666–671
  36. Nadiri A, Wolinski MK, Saleh M (2006) The inflammatory caspases: key players in the host response to pathogenic invasion and sepsis. *J Immunol* 177:4239–4245
  37. Martinon F, Tschopp J (2007) Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. *Cell Death Differ* 14:10–22
  38. Scott AM, Saleh M (2007) The inflammatory caspases: guardians against infections and sepsis. *Cell Death Differ* 14:23–31
  39. Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J (2000) Caspase-12 mediates endoplasmic reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- $\beta$ . *Nature* 403:98–103
  40. Kalai M, Lamkanfi M, Denecker G, Boogmans M, Lippens S, Meeus A, Declercq W, Vandenebee P (2003) Regulation of the expression and processing of caspase-12. *J Cell Biol* 162:457–467
  41. Kachapati K, O'Brien TR, Bergeron J, Zhang M, Dean M (2006) Population distribution of the functional caspase-12 allele. *Hum Mutat* 27:975–980
  42. Fischer H, Koenig U, Eckhart L, Tschachler E (2002) Human caspase 12 has acquired deleterious mutations. *Biochem Biophys Res Commun* 293:722–726
  43. Saleh M, Mathison JC, Wolinski MK, Bensinger SJ, Fitzgerald P, Droin N, Ulevitch RJ, Green DR, Nicholson DW (2006) Enhanced bacterial clearance and sepsis resistance in caspase-12-deficient mice. *Nature* 440:1064–1068
  44. Xue Y, Daly A, Yngvadottir B, Liu M, Coop G, Kim Y, Sabeti P, Chen Y, Stalker J, Huckle E, Burton J, Leonard S, Rogers J, Tyler-Smith C (2006) Spread of an inactive form of caspase-12 in humans is due to recent positive selection. *Am J Hum Genet* 78:659–670
  45. Saleh M, Vaillancourt JP, Graham RK, Huyck M, Srinivasula SM, Alnemri ES, Steinberg MH, Nolan V, Baldwin CT, Hotchkiss RS, Buchman TG, Zehnbauser BA, Hayden MR, Farrer LA, Roy S, Nicholson DW (2004) Differential modulation of endotoxin responsiveness by human caspase-12 polymorphisms. *Nature* 429:75–79
  46. Rosentul D, Plantinga T, Scott W, Alexander B, Van de Geer N, Perfect J, Kullberg B, Johnson M, Netea M (2012) The impact of caspase-12 on susceptibility to candidemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31:277–280
  47. Roy S, Sharom JR, Houde C, Loisel TP, Vaillancourt JP, Shao W, Saleh M, Nicholson DW (2008) Confinement of caspase-12 proteolytic activity to autoprocessing. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:4133–4138
  48. LeBlanc PM, Yeretssian G, Rutherford N, Doiron K, Nadiri A, Zhu L, Green DR, Gruenheid S, Saleh M (2008) Caspase-12 modulates NOD signaling and regulates antimicrobial peptide production and mucosal immunity. *Cell Host Microbe* 3:146–157
  49. Labbé K, Miu J, Yeretssian G, Serghides L, Tam M, Finney C, Erdman L, Goulet ML, Kain K, Stevenson M, Saleh M (2010) Caspase-12 dampens the immune response to malaria independently of the inflammasome by targeting NF- $\kappa$ B signaling. *J Immunol* 185:5495–5502
  50. Kayagaki N, Warming S, Lamkanfi M, Vande Walle L, Louie S, Dong J, Newton K, Qu Y, Liu J, Heldens S, Zhang J, Lee WP, Roose-Girma M, Dixit VM (2011) Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature* 479:117–121
  51. Galluzzi López-Soto A, Kumar S, Kroemer G (2016) Caspases connect cell-death signaling to organismal homeostasis. *Immunity* 44:221–231
  52. Wang P, Arjona A, Zhang Y, Sultana H, Dai J, Yang L, LeBlanc PM, Doiron K, Saleh M, Fikrig E (2010) Caspase-12 controls West Nile virus infection via the viral RNA receptor RIG-I. *Nat Immunol* 11:912–919
  53. Skeldon AM, Morizot A, Douglas T, Santoro N, Kursawe R, Kozlitina J, Caprio S, Mehal WZ, Saleh M (2016) Caspase-12, but not caspase-11, inhibits obesity and insulin resistance. *J Immunol* 196:437–447
  54. Trendelenburg G (2014) Molecular regulation of cell fate in cerebral ischemia: role of the inflammasome and connected pathways. *J Cereb Blood Flow Metab* 34:1857–1867
  55. Guo H, Callaway JB, Ting JP (2015) Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat Med* 21:677–687
  56. Peng S, Kuang Z, Zhang Y, Xu H, Cheng Q (2011) The protective effects and potential mechanism of calpain inhibitor calpeptin against focal cerebral ischemia–reperfusion injury in rats. *Mol Biol Rep* 38:905–912
  57. Espinosa-García C, Viguera-Villaseñor RM, Rojas-Castañeda JC, Aguilar-Hernández A, Monfil T, Cervantes M, Morali G (2013) Post-ischemic administration of progesterone reduces caspase-3 activation and DNA fragmentation in the hippocampus following global cerebral ischemia. *Neurosci Lett* 550:98–103
  58. Wen XR, Fu YY, Liu HZ, Wu J, Shao XP, Zhang XB, Tang M, Shi Y, Ma K, Zhang F, Wang YW, Tang H, Han D, Zhang P, Wang SL, Xu Z, Song YJ (2015) Neuroprotection of sevoflurane against ischemia/reperfusion-induced brain injury through inhibiting JNK3/Caspase-3 by enhancing Akt signaling pathway. *Mol Neurobiol* 51:1–11
  59. Benchoua A, Couriaud C, Guégan C, Tartier L, Couvert P, Friocourt G, Chelly J, Ménissier-de Murcia J, Onténiente B (2002) Active caspase-8 translocates into the nucleus of apoptotic cells to inactivate poly(ADP-ribose) polymerase-2. *J Biol Chem* 277:34217–34222
  60. Shabanzadeh AP, D'Onofrio PM, Monnier PP, Koeberle PD (2015) Targeting caspase-6 and caspase-8 to promote neuronal survival following ischemic stroke. *Cell Death Dis* 6:1–13

61. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22:391–397
62. Leker RR, Shohami E (2002) Cerebral ischemia and trauma-different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities *Brain. Res Rev* 39:55–73
63. Bramlett H, Dietrich WD (2004) Pathophysiology of cerebral ischemia and brain trauma: similarities and differences. *J Cereb Blood Flow Metab* 24:133–150
64. Fann DYW, Lee SY, Manzanero S, Tang SC, Gelderblom M, Chunduri P, Bernreuther C, Glatzel M, Cheng YL, Thundyil J, Widiapradja A, Lok KZ, Foo SL, Wang YC, Li YI, Drummond GR, Basta M, Magnus T, Jo DG, Mattson MP, Sobey SG, Arumugam TV (2013) Intravenous immunoglobulin suppresses NLRP1 and NLRP3 inflammasome-mediated neuronal death in ischemic stroke. *Cell Death Dis* 4:1–10
65. Fann DYW, Santro T, Manzanero S, Widiapradja A, Cheng YL, Lee SY, Chunduri P, Jo DG, Stranahand AM, Mattson MP, Arumugam TV (2014) Intermittent fasting attenuates inflammation activity in ischemic stroke. *Exp Neurol* 257:114–119
66. Yang F, Wang Z, Wei X, Han H, Meng X, Zhang Y, Shi W, Li F, Xin T, Pang Q, Yi F (2014) NLRP3 deficiency ameliorates neurovascular damage in experimental ischemic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 34:660–667
67. Zhang WH, Wang X, Narayanan M, Zhang Y, Huo C, Reed JC, Friedlander RM (2003) Fundamental role of the Rip2/caspase-1 pathway in hypoxia and ischemia-induced neuronal cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:16012–16017
68. Mergenthaler P, Ulrich D, Meisel A (2004) Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. *Metab Brain Dis* 19:151–167
69. Schielke GP, Yang GY, Shivers BD, Betz AL (1998) Reduced ischemic brain injury in interleukin- $\beta$  converting enzyme-deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:180–185
70. Ross J, Brough D, Gibson RM, Loddick SA, Rothwell NJ (2007) A selective, non-peptide caspase-1 inhibitor, VRT-018858, markedly reduces brain damage induced by transient ischemia in the rat. *Neuropharmacology* 53:638–642
71. Aoyama K, Burns DM, Suh SW, Garnier P, Matsumori Y, Shiina H, Swanson RA (2005) Acidosis causes endoplasmic reticulum stress and caspase-12-mediated astrocyte death. *J Cereb Blood Flow Metab* 25:358–370
72. Oyadomari S, Mori M (2004) Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ* 11:381–389
73. Chen L, Gao X (2002) Neuronal apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Neurochem Res* 27:891–898
74. Cao SS, Kaufman RJ (2012) Unfolded protein response. *Curr Biol* 22:622–626
75. Schröder M, Kaufman RJ (2005) ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res* 569:29–63
76. Wang S, Kaufman RJ (2012) The impact of the unfolded protein response on human disease. *J Cell Biol* 197:857–867
77. Harding HP, Zhang Y, Ron D (1999) Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 397:271–274
78. Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, Ron D (2000) Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell* 5:897–904
79. Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calton M, Sadri N, Yun C, Popko B, Paules R, Stojdl DF, Bell JC, Hettmann T, Leiden JM, Ron D (2003) An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell* 11:619–633
80. Zinszner H, Kuroda M, Wang XZ, Batchvarova N, Lightfoot RT, Remotti H, Stevens JL, Ron D (1998) CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev* 12:982–995
81. McCullough KD, Martindale JL, Klotz L, Aw T, Holbrook NJ (2001) Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol* 21:1249–1259
82. Reimertz C, Kögel D, Rami A, Chittenden T, Prehn JHM (2003) Gene expression during ER stress-induced apoptosis in neurons: induction of the BH3-only protein Bbc3/PUMA and activation of the mitochondrial apoptosis pathway. *J Cell Biol* 162:587–597
83. Logue SE, Cleary P, Saveljeva S, Samali A (2013) New directions in ER stress-induced cell death. *Apoptosis* 18:537–546
84. Gardner BM, Pincus D, Gotthardt K, Gallagher CM, Walter P (2013) Endoplasmic reticulum stress sensing in the unfolded protein response. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5:1–15
85. Ye J, Rawson RB, Komuro R, Chen X, Davé UP, Prywes R, Brown MS, Goldstein JL (2000) ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell* 6:1355–1364
86. Shen J, Prywes R (2005) ER stress signaling by regulated proteolysis of ATF6. *Methods* 35:382–389
87. Chakrabarti A, Chen AW, Varner JD (2011) A review of the mammalian unfolded protein response. *Biotechnol Bioeng* 108:2777–2793
88. Carrara M, Prischi F, Ali MU (2013) UPR signal activation by luminal sensor domains. *Int J Mol Sci* 14:6454–6466
89. Hetz C (2012) The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13:89–102
90. Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K (2001) XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 107:881–891
91. Calton M, Zeng H, Urano F, Till JH, Hubbard SR, Harding HP, Clark SG, Ron D (2002) IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* 415:92–96
92. Lee K, Tirasophon W, Shen X (2002) IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. *Genes Dev* 16:452–466
93. Parmar VM, Schröder M (2012) Sensing endoplasmic reticulum stress. *Adv Exp Med Biol* 738:153–168
94. Yk Oh, Shin KS, Yuan J, Kang SJ (2008) Superoxide dismutase 1 mutants related to amyotrophic lateral sclerosis induce endoplasmic stress in neuro2a cells. *J Neurochem* 104:993–1005
95. Yoneda T, Imaizumi K, Oono K, Yui D, Gomi F, Katayama T, Tohyama M (2001) Activation of Caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *J Biol Chem* 276:13935–13940
96. Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T, Yasuhiko Y (2002) An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome *c*-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem* 277:34287–34294
97. Rao RV, Castro-Obregon S, Frankowski H, Schuler M, Stoka V, del Rio G, Bredesen DE, Ellerby HM (2002) Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. An Apaf-1-independent intrinsic pathway. *J Biol Chem* 277:21836–21842
98. Fujita E, Kouroku Y, Jimbo A, Isoai A, Maruyama K, Momoi T (2002) Caspase-12 processing and fragment translocation into nuclei of tunicamycin-treated cells. *Cell Death Differ* 9:1108–1114
99. Nakagawa T, Yuan J (2000) Cross-talk between two cysteine protease families: activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol* 150:887–894
100. de la Cadena SG, Hernández-Fonseca K, Camacho-Arroyo I, Massieu L (2014) Glucose deprivation induces reticulum stress

- by the PERK pathway and caspase-7- and calpain-mediated caspase-12 activation. *Apoptosis* 19:414–427
101. Martinez JA, Zhang Z, Svetlov SI, Hayes RL, Wang KK, Larner SF (2010) Calpain and caspase processing of caspase-12 contribute to the ER stress-induced cell death pathway in differentiated PC12 cells. *Apoptosis* 15:1480–1493
  102. Rao RV, Hermel E, Castro-Obregon S, Del Rio G, Ellerby LM, Ellerby HM, Bredesen DE (2001) Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation. *J Biol Chem* 276:33869–33874
  103. Heath-Engel HM, Chang NC, Shore GC (2008) The endoplasmic reticulum in apoptosis and autophagy: role of the BCL-2 protein family. *Oncogene* 27:6419–6433
  104. Reddy RK, Mao C, Baumeister P, Austin RC, Kaufman RJ, Lee AS (2003) Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors. *J Biol Chem* 278:20915–20924
  105. Kikuchi S, Shinpo K, Tsuji S, Yabe I, Niino M, Tashiro K (2003) Brefeldin A-induced neurotoxicity in cultured spinal cord neurons. *J Neurosci Res* 71:591–599
  106. Obeng EA, Boise LH (2005) Caspase-12 and caspase-4 are not required for caspase-dependent endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J Biol Chem* 280:29578–29587
  107. Di Sano F, Ferraro E, Tufi R, Achsel T, Piacentini M, Cecconi F (2006) Endoplasmic reticulum stress induces apoptosis by an apoptosome-dependent but caspase 12-independent mechanism. *J Biol Chem* 281:2693–2700
  108. Matsuzaki S, Hiratsuka T, Kuwahara R, Katayama T, Tohyama M (2010) Caspase-4 is partially cleaved by calpain via the impairment of  $Ca^{2+}$  homeostasis under the ER stress. *Neurochem Int* 56:352–356
  109. Yukioka F, Matsuzaki S, Kawamoto K, Koyama Y, Hitomi J, Katayama T, Tohyama M (2008) Presenilin-1 mutation activates the signaling pathway of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Neurochem Int* 52:683–687
  110. Hitomi J, Katayama T, Eguchi Y, Kudo T, Taniguchi M, Koyama Y, Manabe T, Yamagishi S, Bando Y, Imaizumi K, Tsujimoto Y, Tohyama M (2004) Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and A $\beta$ -induced cell death. *J Cell Biol* 165:347–356
  111. Binet F, Chiasson S, Girard D (2010) Evidence that endoplasmic reticulum (ER) stress and caspase-4 activation occur in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 391:18–23
  112. Bian ZM, Elner SG, Elner VM (2009) Dual involvement of caspase-4 in inflammatory and ER stress-induced apoptotic responses in human retinal pigment epithelial cells. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 50:6006–6014
  113. Mouw G, Zechel JL, Gamboa J, Lust WD, Selman WR, Ratcheson RA (2003) Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum resident caspase, after permanent focal ischemia in rat. *Neuroreport* 14:183–186
  114. Nakka VP, Gusain A, Raghuram R (2010) Endoplasmic reticulum stress plays critical role in brain damage after cerebral ischemia/reperfusion in rats. *Neurotox Res* 17:189–202
  115. Boyce M, Bryant KF, Jousse C, Long K, Harding HP, Scheuner D, Kaufman RJ, Ma D, Coen DM, Ron D, Yuan J (2005) A Selective inhibitor of eIF2 $\alpha$  dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science* 307:935–939
  116. Sokka AL, Putkonen N, Mudo G, Pryazhnikov E, Reijonen S, Khiroug L, Belluardo N, Lindholm D, Korhonen L (2007) Endoplasmic reticulum stress inhibition protects against excitotoxic neuronal injury in the rat brain. *J Neurosci* 27:901–908
  117. Shibata M, Hattori H, Sasaki T, Gotoh J, Hamada J, Fukuuchi Y (2003) Activation of caspase-12 by endoplasmic reticulum stress induced by transient middle cerebral artery occlusion in mice. *Neuroscience* 118:491–499
  118. Liu HJ, Yang JP, Wang CH, Liu RC, Li Y, Li CY (2009) Endoplasmic reticulum in the penumbra following middle cerebral artery occlusion in the rabbit. *Neurol Sci* 30:227–232
  119. Zhu H, Zhu H, Xiao S, Sun H, Xie C, Ma Y (2012) Activation and crosstalk between the endoplasmic reticulum road and JNK pathway in ischemia-reperfusion brain injury. *Acta Neurochir* 154:1197–1203
  120. Larner SF, Hayes RL, McKinsey DM, Pike BR, Wang KKW (2004) Increased expression and processing of caspase-12 after traumatic brain injury in rats. *J Neurochem* 88:78–90
  121. Badiola N, Penas C, Miñano-Molina A, Barneda-Zahonero B, Fadó R, Sánchez-Opazo G, Comella JX, Sabriá J, Zhu C, Blomgren K, Casas C, Rodríguez-Alvarez J (2011) Induction of ER stress in response to oxygen-glucose deprivation of cortical cultures involves the activation of the PERK and IRE-1 pathways and of caspase-12. *Cell Death Dis* 2:1–8
  122. Chen X, Kintner DB, Luo J, Baba A, Matsuda T, Sun D (2008) Endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  dysregulation and endoplasmic reticulum stress following in vitro neuronal ischemia: role of  $Na^{+}$ - $K^{+}$ - $Cl^{-}$  cotransporter. *J Neurochem* 106:1563–1576
  123. Zhang A, Zhang J, Sun P, Yao C, Su C, Sui T, Huang H, Cao X, Ge Y (2010) EIF2 $\alpha$  and caspase-12 activation are involved in oxygen–glucose–serum deprivation/restoration-induced apoptosis of spinal cord astrocytes. *Neurosci Lett* 478:32–36
  124. D’Oswaldo AD, Anania VG, Yu K, Lill JR, Kaufman RJ, Matsuzawa S, Reed JC (2015) Transcription factor ATF4 induces NLRP1 inflammasome expression during endoplasmic reticulum stress. *PLoS One* 10:1–16
  125. Lerner AG, Upton JP, Praveen PV, Ghosh R, Nakagawa Y, Igbaria A, Shen S, Nguyen V, Backes BJ, Heiman M, Heintz N, Greengard P, Hui S, Tang Q, Trusina A, Oakes SA, Papa FR (2012) IRE1 $\alpha$  induces thioredoxin-interacting protein to activate the NLRP3 inflammasome and promote programmed cell death under irremediable ER stress. *Cell Metab* 16:250–264
  126. Bronner DN, Abuaita BH, Chen X, Fitzgerald KA, Nuñez G, He Y, Yin XM, O’Riordan MX (2015) Endoplasmic reticulum stress activates the inflammasome via NLRP3-and caspase-2-driven mitochondrial damage. *Immunity* 43:451–462
  127. Lu M, Sun XL, Qiao C, Liu Y, Ding JH, Hu G (2014) Uncoupling protein 2 deficiency aggravates astrocytic endoplasmic reticulum stress and nod-like receptor protein 3 inflammasome activation. *Neurobiol Aging* 35:421–430