



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas

Instituto de Fisiología Celular

“EL PAPEL DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN LA SEÑALIZACIÓN DE
TXNIP Y SUS EFECTOS EN LA MUERTE NEURONAL”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

Brenda Vianey García Hernández

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Julio Eduardo Roque Morán Andrade

Instituto de Fisiología Celular

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Marina Macias Silva

Instituto de Fisiología Celular

Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte

Instituto de Investigaciones Biomédicas

Ciudad Universitaria.. Ciudad de México Septiembre 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Tabla de Contenido

Agradecimientos

Abreviaturas

Resumen

PARTE 1. Introducción, antecedentes y objetivo de la tesis.

PARTE 2. Métodos y materiales

PARTE 3. Resultados

PARTE 4. Discusión

Referencias

Figuras suplementarias

Artículo publicado

El papel de las especies reactivas de oxígeno en la señalización de Txnip y sus efectos en la muerte neuronal

Este trabajo de investigación se realizó bajo la dirección del Doctor Julio Morán Andrade en la División de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Este trabajo fue financiado por los donativos otorgados por el Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnología (CONAHCYT, 285184), el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la UNAM (DGAPA-PAPIIT IN212019, IN216422) y por la beca de estudios de Doctorado (CONAHCYT, 463895).

El comité tutorial que asesoró el desarrollo de este trabajo estuvo conformado por:

Dr. Julio Morán Andrade

Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte

Dra. Marina Macias Silva

El jurado designado por el Comité Académico de Estudios de Posgrado en Ciencias Biomédicas estuvo integrado por:

Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva

Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte

Dra. Maria de Lourdes Massieu Trigo

Dr. Luis Oskar Soto Rojas

Dra. Angélica Zepeda Rivera

Agradecimientos

A los proyectos de financiamiento CONACYT No. 285184 y PAPIIT No. IN216422.

A CONACYT por la beca para estudios de Doctorado No. 463895.

Al Doctor Julio Morán por su guía durante la Licenciatura y Doctorado, por sus consejos, disposición y ejemplo para formar estudiantes con calidad científica y humana.

A los miembros de mi comité tutor, la Doctora Marina Macias Silva y la Doctora Maria Eugenia Gonsebatt Bonaparte por su orientación y retroalimentación durante el Doctorado.

A la técnico M. en C. Guadalupe Dominguez Macouzet por su invaluable apoyo en el laboratorio y en la realización de los cultivos celulares.

A los Doctores Angel Barco y Beatriz Blanco del Instituto de Neurociencias de Alicante por su apoyo constante durante la estancia de investigación.

A los miembros del jurado de examen de grado por la revisión y sugerencias al presente trabajo.

Agradecimientos personales

A mis padres y hermano por su apoyo y amor incondicional.

A mis amigos por estar.

A mi pareja.

A mis profesores, alumnos y todos los compañeros de laboratorio, clases y cursos que enriquecieron mi experiencia académica y personal.

A Molly.

A todos los animales sacrificados para la realización de este proyecto.

Abreviaturas

NGC- Neuronas granulares de cerebelo

K5- Medio bajo potasio (5mM)

K25- Medio alto potasio (25mM)

Sts- Estaurosporina

ERO- Especies reactivas de oxígeno

LY – LY294002 inhibidor de PI3K

TXNIP- Thioredoxin interacting protein

TXN- Tiorredoxina

DHE- Dihidroetidio

IP- Yoduro de propidio

GFP- Green fluorescent protein

DPN – Días postnatales

DIV- Días in vitro

shRNA - Short hairpin RNA

Scr- Scramble

TSS- Sitio de inicio de la transcripción

PCR- Polymerase chain reaction

ChIP- Chromatin Immunoprecipitation

DNA- Ácido desoxirribonucleico

Resumen

TXNIP ha sido descrita como una proteína sensible a condiciones oxidantes cuya expresión se relaciona con la progresión de la muerte en cáncer, diabetes, isquemia y enfermedades neurodegenerativas. Debido a esto, diferentes estudios sugieren a TXNIP como un blanco terapéutico para inhibir la muerte en algunas patologías. La exposición a estaurosporina y a las concentraciones bajas de potasio son dos modelos de muerte in vitro de las neuronas granulares de cerebelo. Ambos se caracterizan por la producción inicial de especies reactivas de oxígeno (ERO) que induce la activación de la vía JNK y la maquinaria apoptótica. En estos modelos se ha demostrado el incremento en la proteína TXNIP en respuesta a las ERO. En este estudio, evaluamos la vía de señalización involucrada en la expresión de *Txnip* y su papel en la muerte neuronal. Utilizando el modelo de muerte por la exposición a una concentración baja de potasio, observamos el incremento temprano de las ERO previamente reportado. Esto correlaciona con la inactivación de la cinasa Akt y el incremento en los niveles de mensajero y proteína de TXNIP. Cuando evaluamos el promotor del gen de *Txnip*, encontramos los motivos de unión reportados en la base de datos JASPAR para FOXO 1 y FOXO3 cercanos al sitio de inicio de la transcripción. Verificamos mediante un ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina que FOXO3 interacciona con el promotor de *Txnip* 1h después del estímulo con bajo potasio. Finalmente, utilizando un shRNA para *Txnip* en células de la línea MSN de neuroblastoma humano encontramos que la inhibición de la expresión de *Txnip* disminuye la muerte neuronal inducida por estaurosporina. Estos datos sugieren que las ERO modulan la expresión de *Txnip* a través de la activación de FOXO3 y que esta expresión es necesaria para que se active la muerte neuronal.

Abstract

TXNIP has been recognized as a protein sensitive to oxidant conditions whose expression has been related to the progression of death in cancer, diabetes, ischemia, and neurodegenerative disease models. Due to this, many studies suggest TXNIP as a therapeutic target to reduce cell death in several diseases. Exposure to staurosporine and low potassium are two models of death of cerebellar granule neurons in vitro. Both are characterized by an early production of reactive oxygen species (ROS) that activate the ASK1 pathway and the apoptotic machinery. In these models, it has been shown an increase in TXNIP protein in response to ROS. In this study, we evaluated the signaling pathway involved in TXNIP expression and its role in neuronal death. Using a low potassium and staurosporine death stimulus in cerebellar granule neurons we observed an early increase in the oxidative conditions correlating with the increase of *Txnip* expression. When we evaluated the promoter of the *Txnip* gene we found JASPAR-reported FOXO1/3 transcription factor motifs close to the TSS. We then verified through the Chromatin Immunoprecipitation technique (ChIP) that FOXO 3 interacts with the *Txnip* promoter 1 hour after the low potassium treatment. Finally, by using *Txnip* shRNA in the MSN cell line, we found that *Txnip* downregulation decreases the neuronal death induced by staurosporine. Together, these results suggest that ROS promotes the expression of *Txnip* through the activation of the FOXO3 transcription factor by Akt inhibition and that *Txnip* expression is necessary to induce neuronal death by low potassium and staurosporine.

PARTE 1

Introducción

Thioredoxin Interacting Protein (TXNIP)

TXNIP es una proteína que forma parte de la familia de proteínas α -arrestinas de la cual solo se han identificado seis miembros junto con ARRDC1- ARRDC5. Presenta dos dominios tipo arrestina y cuatro variantes de splicing en el humano (Zbieralski *et. al.*, 2022). La proteína tiene 341 residuos de aminoácidos y un peso molecular de 46 KDa (Cao *et al.* 2020).

La secuencia génica de *Txnip* está conservada en humanos, ratón y rata. La secuencia y estructura proteica tridimensional tienen un alto grado de homología en ratones y humanos (94%) lo cual sugiere que su función también se conserva en la evolución (Cao *et al.* 2020). Estructuralmente, TXNIP tiene motivos PxxP y PPxY con los que interactúa SH3 de diversas proteínas funcionando como proteína *Scaffold* o adaptadora en el citoplasma y en el núcleo debido a que también puede interactuar con la proteína α -importina que facilita la translocación al núcleo. Estos dominios los comparte con los otros miembros de la familia de α -arrestinas (Yoshihara, et al. 2020).

TXNIP debe su nombre a las siglas en inglés *Thioredoxin Interacting Protein*. Fue descrita como inhibidor endógeno de la proteína tioredoxina Trx que tiene una participación importante en el mantenimiento del estado redox intracelular (Zhou *et al.*, 2010).

En células de mamífero, TXNIP se expresa de forma ubicua y tiene funciones tejido-dependientes como la regulación del metabolismo de la glucosa y el metabolismo lipídico en tejido periférico (Yoshihara *et al.* 2013). Por ejemplo, la expresión de TXNIP correlaciona

inversamente con la captación de glucosa a la célula ya que puede reclutar de la membrana e internalizar a los transportadores de glucosa GLUT4 y GLUT1 (Yu *et al.*, 2010; Yoshihara., 2020). Al existir una amplia entrada de glucosa a la célula, los primeros productos de la glucólisis promueven la transcripción de TXNIP mediante el factor de transcripción ChREBP. TXNIP interacciona con los transportadores de glucosa y los internaliza mediante vesículas de clatrina reduciendo así el metabolismo glucolítico (Yu *et al.*, 2010). La reducción del flujo glucolítico en consecuencia también regula el metabolismo lipídico debido a que ambos se encuentran estrechamente relacionados (Cao *et al.* 2020).

Independiente de su participación en el metabolismo celular, la expresión de TXNIP ha sido asociada a la muerte celular en tejido periférico. Se describió como una proteína supresora de tumores que, al ser inhibida, permite la proliferación celular exacerbada en células cancerígenas, por lo tanto, sus niveles de expresión han sido relacionados inversamente con el grado, estadio y capacidad metastásica en cáncer de mama, cáncer hepatocelular, cáncer de vejiga y leucemia, demostrando su importancia en el control de la proliferación (Zhou *et al.*, 2010; Yoshihara *et al.*, 2013; Zhou y Chng, 2013).

Además, TXNIP actúa en la señalización inflamatoria al ser requerido para la oligomerización del complejo multiproteico inflammasoma NLRP3 que lleva a la producción de la interleucina 1 β en consecuencia a diversas condiciones que requieren de una respuesta pro-inflamatoria (Li *et al.*, 2019).

Considerando lo anterior, las funciones de TXNIP se pueden dividir en 4, por una parte, la función como regulador metabólico en tejido periférico, la función pro-inflamatoria al inducir la oligomerización del inflammasoma NLRP3, la participación como proteína *scaffold* que permite la interacción con proteínas con dominios SH3 y por último la función redox dependiente mediante la cual interacciona con Trx (Figura 1).

La diversidad de funciones de TXNIP se comprende al observar el promotor del gen donde convergen motivos de interacción para distintos factores de transcripción como FOXO, ChREBP, PPAR γ , HSF1 y GR los cuales promueven la expresión de *Txnip* en diferentes contextos celulares (Yoshihara *et al.*, 2020).

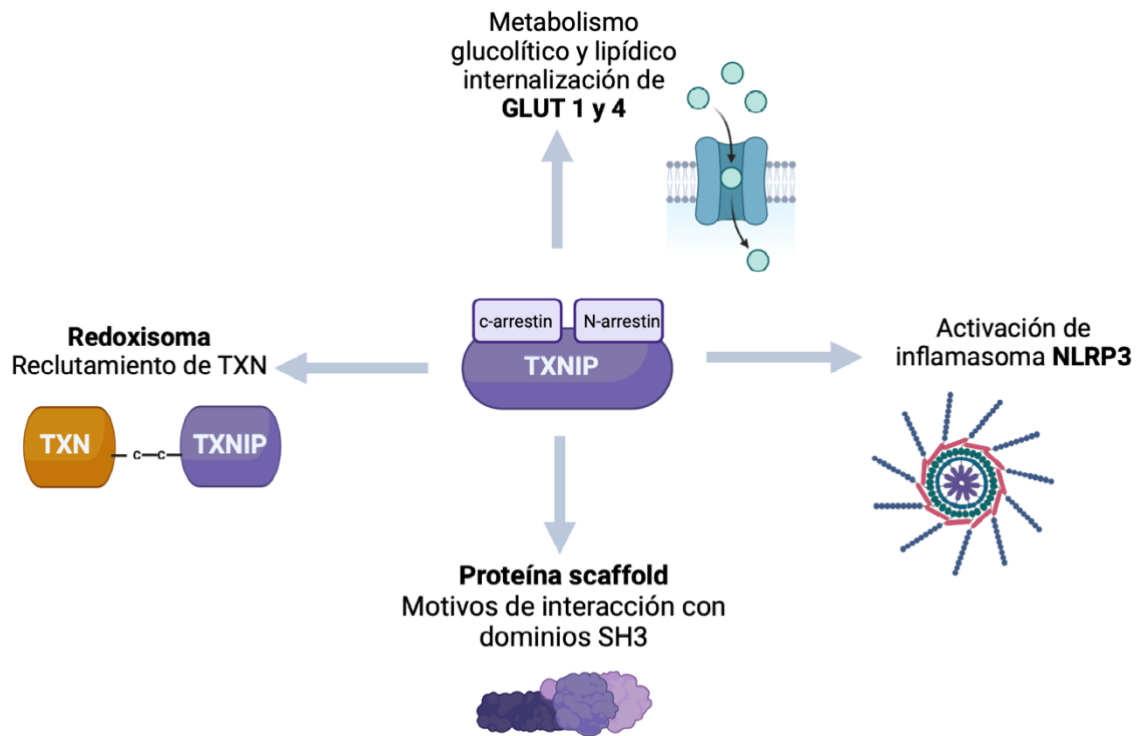


Figura 1 . Principales funciones celulares de la proteína TXNIP. Las funciones de TXNIP se pueden dividir en 4 de acuerdo al efecto que inducen, primero la regulación del metabolismo glucilítico y lipídico en tejido periférico, segundo, la oligomerización del inflammasoma NLRP3 en respuesta a estímulos pro inflamatorios. Tercero, la participación como proteína *scaffold* por interacción con otras proteínas y cuarto, las funciones relacionadas con la interacción y reclutamiento de Trx (TXN). Esquema realizado con BioRender.

Funciones redox dependientes

El nombre de TXNIP se le confirió por su capacidad de interacción redox con la proteína tiorredoxina Trx que forma parte del sistema antioxidante Trx-Trx reductasa. TXNIP en su secuencia primaria, contiene dos cisteínas reactivas mediante las cuales inhibe de forma negativa a Trx por reclutamiento (Hwang *et al.* 2014.) En estado oxidado forma un enlace disulfuro entre sus cisteínas (Cys 63, Cys 247), al interactuar con Trx reducido forma un enlace disulfuro intermolecular específico y altamente estable que inhibe la función de Trx.

Trx reclutado por TXNIP no tiene capacidad antioxidante ni puede reducir a proteínas oxidadas u otras proteínas como las peroxirredoxinas de respuesta al estrés oxidante (Masutani *et al.* 2005). La participación de Trx en el control redox celular es tan compleja, que los ratones *Knockout* son inviables debido a que participa desde las primeras etapas de desarrollo (Karlenius *et al.* 2010).

Al complejo formado por TXNIP-Trx se le denominó redoxisoma porque es una interacción mediada por estados redox específicos y en este sentido funciona como un sensor redox (Figura 2). Además del control de una defensa antioxidante, la interacción TXNIP-Trx también es relevante en la activación de la vía ASK1. Trx reducido se une a la proteína ASK, miembro de la familia de proteínas MAPK (*Mitogen-activated protein kinases*), e inhibe su función cinasa que a su vez activa las vías JNK y p38, vías de respuesta a daño que promueven la muerte apoptótica (Zhang *et al.* 2015). La interacción entre Trx1 y ASK1 es mediada entonces por la presencia de TXNIP en estado oxidado.

La expresión de TXNIP se ha detectado en respuesta a una gran cantidad de estímulos nocivos como luz UV, rayos gamma y estrés oxidante (Yu *et al.* 2010). Si bien, se mencionó que TXNIP se expresa de forma ubicua, la sobreexpresión en algunos tipos celulares conduce a la muerte. Estudios realizados en células pancreáticas muestran que en condiciones basales esta proteína se localiza en el núcleo mientras que la vía ASK1 se encuentra inhibida en la mitocondria por interacción con Trx. En respuesta a estrés oxidante, TXNIP incrementa su expresión y recluta a Trx promoviendo que ASK1 se active y conduciendo a la muerte celular apoptótica (Chen *et al.* 2008; Chen *et al.* 2008b; Tanaka *et al.* 2002; Olgúin- Albuérne *et al.* 2014, Wang *et al.* 2002).

Para que TXNIP incremente su expresión en respuesta a una condición de estrés se requiere una cascada de señalización que reconozca el estímulo desde etapas tempranas y con ello se active la señalización requerida para la progresión de la muerte. En células beta pancreáticas se ha descrito que la expresión de TXNIP en condiciones de estrés depende de la inactivación de la proteína cinasa B (Akt) (Chen *et al.* 2004). Akt es susceptible a ser inactivada por el incremento de especies reactivas de oxígeno. Por ello, se propone que las especies reactivas

podrían funcionar como la primera señal de activación de la expresión de TXNIP a través de modificaciones puntuales y mecanismos de señalización redox.

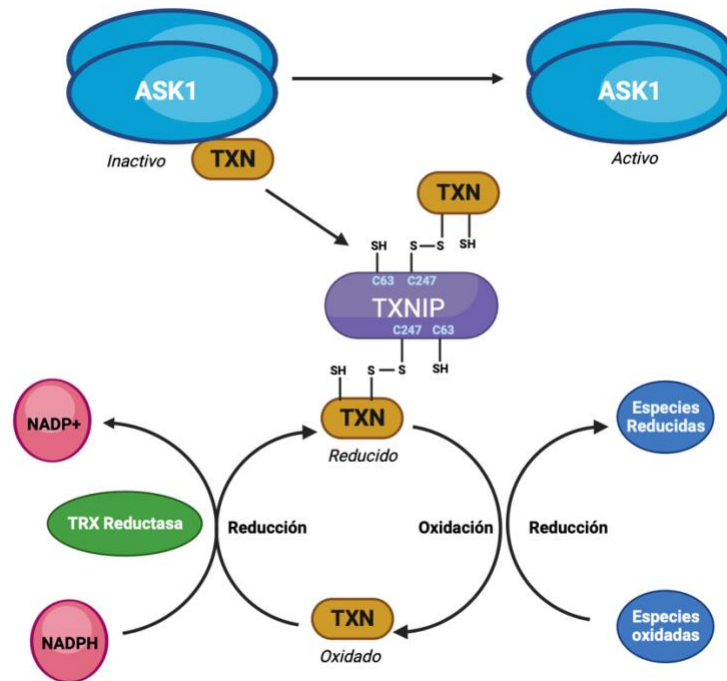


Figura 2. Interacción TXNIP-Trx. El reclutamiento de Trx (TXN) por TXNIP es mediado por la formación de un enlace disulfuro intermolecular, Trx debe encontrarse en estado reducido y TXNIP oxidado, de esa forma se promueve la transferencia de electrones para llevar a la unión Trx-TXNIP. Este proceso tiene dos efectos principales, por una parte Trx ya no puede participar como antioxidante ya que una de sus cisteínas reactivas es utilizada por la formación del enlace con TXNIP. Por otra parte, el reclutamiento de Trx de la interacción Trx-ASK1 lleva a la activación de la cinasa ASK1 y con ello la activación de las cinasas río abajo JNK y p38 por activación de una MAP2K intermediaria. Finalmente JNK y p38 conducen a la activación de la muerte apoptótica. Esquema realizado con Biorender.

A continuación se describe detalladamente los elementos que intervienen en la vía de señalización que conduce a la expresión de TXNIP y a la ejecución de la muerte apoptótica:

El estado redox intracelular y las Especies Reactivas de Oxígeno

El estado redox intracelular es de importancia crítica para la homeostasis celular, cambios discretos en el estado redox pueden participar en la regulación de la señalización celular mientras que el estrés oxidante puede llevar al desarrollo de diversas enfermedades (Mochizuki *et al.* 2018). El potencial redox intracelular es una medida del balance redox y está dado por las especies oxidantes y aquellas antioxidantes (Zhang *et al.* 2015).

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son moléculas generadas por todas las células con metabolismo aeróbico. Se forman por la reducción secuencial del oxígeno molecular a formas reactivas como los radicales anión superóxido, radical hidroxilo y alkoxy y a formas no radicales como el peróxido de hidrógeno (Apel y Hirt, 2004). La acumulación exacerbada de ERO lleva a un estado general de daño en la célula conocido como estrés oxidante debido a que las especies reactivas pueden oxidar a péptidos, lípidos, DNA y RNA de manera desregulada (Circu y Aw, 2010; Finkel, 2011).

Los primeros trabajos sobre ERO se centraron en describir las fuentes que las producen como metabolito secundario y los mecanismos de contención de estas: los diferentes sistemas antioxidantes (Dickinson y Jay Forman, 2002). La primera fuente descrita fue la mitocondria. Como parte la cadena de transporte de electrones se produce el anión superóxido en los complejos I y IV por la transferencia incompleta de electrones al oxígeno molecular (Circu y Aw, 2010). Algunos estudios estiman que 2% del oxígeno consumido por la mitocondria termina en forma de anión superóxido que posteriormente dismuta a peróxido de hidrógeno, a pesar de que estos estudios no han sido precisos en sus estimaciones, el metabolismo mitocondrial si representa una tasa de producción constante de ERO (Orrenius *et al.*, 2007). Además de la mitocondria existen complejos enzimáticos como los citocromos p450, lipoxigenasas, ciclooxigenasas y sistema xantina oxidasa que han sido ampliamente estudiados porque también forman ERO como subproducto de su actividad enzimática principal (Apel y Hirt, 2004; di Meo *et al.*, 2016) .

De forma relevante para el entendimiento de la biología redox, se descubrió un grupo de enzimas NADPH oxidasas (NOX) cuya única función es transferir electrones a través de las

membranas biológicas utilizando al oxígeno como aceptor y produciendo superóxido (Leto *et al.*, 2009; Sorce *et al.*, 2012; Sorce y Krause, 2009). Esto implica que la célula cuenta con sistemas específicos que solo funcionan para producir ERO y que pueden ser regulados de forma temporal y espacial en diferentes condiciones celulares. El primer evento celular en el que fue descrita la participación de NOX fue el estallido respiratorio que llevan a cabo células fagocíticas del sistema inmune al interior del fagolisosoma para eliminar microorganismos como hongos y bacterias (Lambeth, 2004, 2007). La identificación de las enzimas NOX mostró que existen complejos capaces de utilizar especies reactivas de oxígeno para llevar a cabo eventos celulares de defensa y también de señalización. Las enzimas NOX y la producción de ERO actualmente se han relacionado de manera amplia con otros eventos fisiológicos independientes del sistema inmune como la proliferación, migración, crecimiento neurítico y potenciación y depresión a largo plazo en sistema nervioso (Finkel, 2011; Olguín-Albuerno y Morán, 2018).

Señalización Redox

Cuando las ERO se producen de forma específica y localizada en tiempo y espacio como parte de una cascada de eventos, entonces se habla de señalización mediante reacciones de oxido- reducción (redox) (Kamata y Hirata, 1999; Olguín-Albuerno y Morán, 2018; Zhu *et al.*, 2017). El peróxido de hidrógeno se ha propuesto como la ERO con mayor relevancia fisiológica debido a su baja reactividad en comparación con los radicales, a su vida media estable y a la capacidad de difusión a través de las membranas biológicas (Figura 3) (Finkel, 2011; Giorgio *et al.*, 2007).

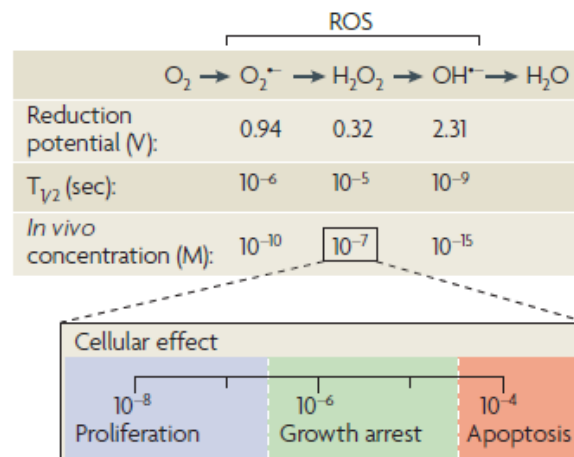


Figura 3. Potencial reductor, vida media y concentración de las diferentes especies producidas por la reducción secuencial del oxígeno, así como los efectos del peróxido de hidrógeno en diferentes concentraciones al interior de la célula. Tomado de Giorgio *et al.*, 2007.

La principal forma de señalización redox es a través de la oxidación de residuos de cisteína y metionina de las proteínas. Se ha propuesto como mecanismo de señalización porque existe especificidad en cuanto a los residuos susceptibles a oxidación: la accesibilidad de estos en la conformación tridimensional de la proteína y la carga de los aminoácidos vecinos, así como el pKa son algunos de los factores que favorecen la reactividad de los residuos. A diferencia del estrés oxidante, este mecanismo no implica daño generalizado a biomoléculas sino una modificación postraduccional que regula la actividad de las proteínas blanco (Lindermayr *et al.*, 2018; Noctor y Foyer, 2016; Ray *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2017).

Las proteínas son susceptibles a regulación redox gracias a los grupos tioles y sulfuro que se encuentran en los residuos de cisteína y metionina que conforman la secuencia peptídica. Cuando un grupo tiolato (R-S-) de la cisteína entra en contacto con H_2O_2 , éste se oxida y cambia a ácido sulfénico (R-SOH) el cual tiene alta probabilidad de formar un enlace disulfuro intramolecular con otro grupo tiol (R-SS-R') o intermolecular con otro residuo de cisteína de alguna proteína (Kamata y Hirata, 1999; Olguín-Albuérne y Morán, 2018). El enlace disulfuro intramolecular cambia la conformación de la proteína y de esta forma es

posible regular su función, ocultando o exponiendo dominios de interacción con otras proteínas o motivos de modificación postraduccional (Dickinson y Jay Forman, 2009.).

Actualmente ha incrementado la evidencia de proteínas que son reguladas postraduccionalmente mediante reacciones redox. Un estudio realizado de forma global por (Su *et al.*, 2019) mostró el análisis del proteoma redox en adipocitos tratados con carmustina; los autores encontraron 13,451 cisteínas oxidadas de forma reversible, y de estas, sólo el 12%, alrededor de 1550, pertenecían a proteínas reportadas en UniProt. Esto muestra que aún se desconoce mucho sobre la señalización redox y sus blancos moleculares.

Regulación de las Especies Reactivas de Oxígeno

Existen dos mecanismos de regulación de las ERO, una es a través de su producción mediante la localización o activación específica de sus fuentes y otra es mediante los distintos sistemas antioxidantes.

Como se mencionó anteriormente, la familia de enzimas NOX tiene la función de producir directamente ERO. Esta familia de proteínas se compone de siete miembros, NOX 1-5 y dos oxidasas duales DUOX 1,2 que se expresan en diferentes tipos celulares (Leto *et al.*, 2009; Sorce *et al.*, 2012). Las NOX son complejos que pueden localizarse en la membrana citoplasmática o mitocondrial debido a que constan de 6 pasos transmembranales y son regulados a través de sus subunidades o de unión a calcio (Gorin, 2013; Gorin y Block, 2013). Las NOX están formadas por una oxidasa que es la subunidad catalítica gp91phox (también conocida como NOX2) que contiene un grupo hemo y dominios flavina que permiten la transferencia de electrones del NADPH al oxígeno molecular formando superóxido y peróxido de hidrógeno (Gorin, 2013).

Estas enzimas cuentan con subunidades reguladoras que cambian en los distintos miembros de la familia. NOX 2 es regulada por p22phox, p47phox, p40phox, p67phox y la GTPasa Rac. De forma similar NOX 1 depende de la GTPasa Rac y de p22phox para su activación además de un homólogo de p67, NOXO1 (Nayernia *et al.*, 2014; Sorce y Krause, 2009). NOX 5 es dependiente de calcio para su activación y tiene dominios de unión a este en la región citoplasmática (Lassegue y Griendling, 2010). NOX 4 es un miembro de esta familia

que no requiere de subunidades reguladoras, y la heterodimerización con p22 phox induce su activación. Por lo tanto, sus niveles de expresión están relacionados con tu actividad (Gorin y Block, 2013)

La actividad de las enzimas de la familia NOX está entonces regulada por vías de señalización que participan en la formación del complejo, señales intracelulares de calcio o bien la modulación de su expresión y localización.

La mitocondria, como se mencionó previamente, representa una fuente importante de ERO por la cadena respiratoria. De forma interesante, se ha observado que el metabolismo mitocondrial puede cambiar y aumentar la producción de especies reactivas en respuesta a algunos estímulos, por ejemplo, de eventos de fisión y fusión mitocondrial. Esta evidencia abre las puertas para considerar a la mitocondria como posible fuente de ERO de forma dinámica e independiente de flujo metabólico (Choi y Kim, 2019).

Participación de sistemas antioxidantes

Los sistemas antioxidantes también regulan la producción y distribución de ERO en la célula. Dentro de estos sistemas se han descrito aquellos que son enzimáticos como la enzima superóxido dismutasa (SOD) que reduce el anión superóxido a peróxido de hidrógeno (Newsholme *et al.*, 2012a), la catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GSH-Pxs) que forman agua a partir de la reducción del peróxido de hidrógeno utilizando NADPH como equivalente reductor. La tioredoxina Trx, las peroxirredoxinas Prx, las glutarredoxinas Grx son proteínas que contienen grupos tiol que eliminan el peróxido de hidrógeno porque lo reducen a moléculas menos reactivas estas dependen de sistemas enzimáticos de reducción para llevar a cabo su funcionamiento de forma constante (Newsholme *et al.*, 2012). Trx se considera el mayor regulador redox de proteínas y su función está conservada desde procariontes hasta vertebrados (Mochizuki *et al.* 2018). También hay sistemas no enzimáticos como el ácido ascórbico (vitamina C) y alfa tocoferol (vitamina E) que actúan como acarreadores o *scavengers* de ERO porque pueden ceder electrones y oxidarse para evitar la oxidación de

otras biomoléculas, en este caso, principalmente lipidos de membrana (Circo y Aw, 2010b) (Figura 4).

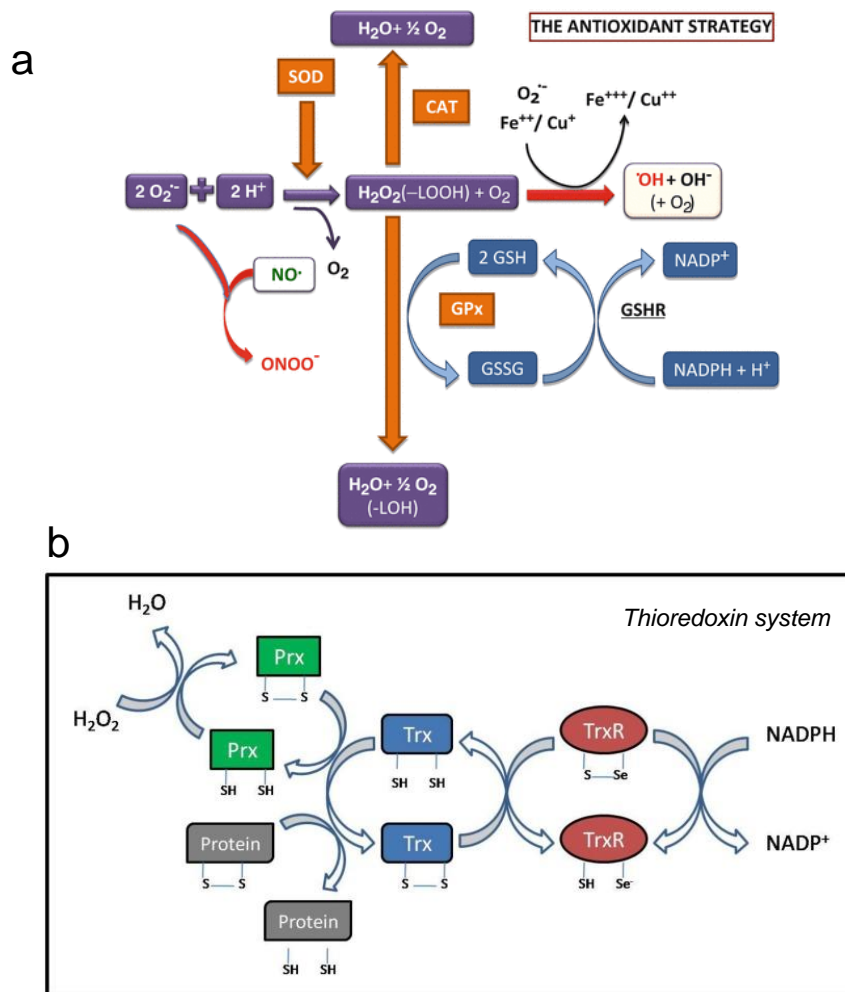


Figura 4. Sistemas antioxidantes celulares. a) Se muestra el proceso de reducción de las diferentes ERO (color morado) por las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx) (color naranja). En azul se muestran las moléculas que pueden participar como cofactores del proceso enzimático. Tomado de Sáez *et al.*, 2017. **b) Sistemas Tiorredoxina- Tiorredoxina reductasa..** La célula cuenta con diferentes mecanismos antioxidantes para mantener el estado redox, uno de ellos es el sistema Tiorredoxina- Tiorredoxina reductasa que trabaja en conjunto con las peroxirredoxinas para disminuir el contenido de peróxido y reducir a las proteínas oxidadas. La donación de un electrón por parte de residuos -SH de la peroxirredoxina lleva a la reducción del peróxido de hidrógeno a agua. La proteína oxidada puede entonces ser reducida por Trx. Por otra parte, Trx también puede reducir a otras proteínas que se encuentran oxidadas. La oxidación de los silfidrilos de Trx se resuelve mediante el sistema

tioredoxina reductasa que utiliza a los electrones del NADPH para transferirlos a Trx y con ello continuar con el ciclo redox (Figura tomada de Karlenius *et al.*, 2010).

Apoptosis

El proceso de apoptosis se refiere a un conjunto de eventos moleculares dependientes de ATP que conducen a la muerte celular. El término se estableció en 1972 por Kerr, Wyllie y Currie para describir un tipo de muerte genéticamente programada que ocurre durante el desarrollo de los organismos y también en la progresión de enfermedades neurodegenerativas e inflamación (Elmore, 2007.; Sastry y Rao, 2000)

Se caracteriza por el uso de proteínas caspasas como moléculas iniciadoras y ejecutoras del proceso y por la activación de endonucleasas, la fragmentación del DNA, la destrucción de proteínas nucleares y del citoesqueleto, la condensación de la cromatina y la formación de cuerpos apoptóticos (Circu y Aw,2008; Sastry y Rao,2000).

El proceso en general ocurre en dos fases, la primera es la fase de iniciación, donde la célula recibe un estímulo o señal que la compromete a la muerte, la fase de ejecución es cuando inician los cambios morfológicos asociados a la muerte celular (Elmore, 2007).

Entre las fases de iniciación y ejecución ocurre la regulación transcripcional de diversas proteínas y la activación de cascadas de señalización, esta fase intermedia se reconoce como fase de compromiso o *commitment* en la cual el proceso es irreversible (McIlwain *et al.*, 2013).

Las caspasas son proteínas conservadas en los eucariontes, en mamíferos se han identificado 14 miembros que se dividen en caspasas iniciadoras y ejecutoras. Su función es la de proteasas de cisteína que son activadas proteolíticamente por proximidad entre ellas (Li y Yuan, 2008).

La muerte apoptótica puede inducirse por vía extrínseca a través de la activación de receptores o por vía intrínseca en la mitocondria. Los receptores de muerte FAS o TNRF son activados por unión a ligando y reclutan y activan a la caspasa 8 que a su vez activa a caspasa

3, involucrada en la ejecución. A su vez, la caspasa 8 puede activar la vía intrínseca mediante la activación de bid, que trasloca a la mitocondria y promueve la liberación del citocromo C y la formación del apoptosoma. El apoptosoma se forma por unión de procaspasa 9, Apaf-1 y citocromo C y su función es amplificar la activación de caspasa 3 para ejecutar la muerte (Elmore, 2007.; Jordán, 2003; Shen y Pervaiz, 2006).

El proceso apoptótico es un evento que ocurre no solo en diferentes patologías o en organismos adultos también ocurre durante el desarrollo del sistema nervioso central. De hecho, el proceso apoptótico se describió porque ocurre durante el desarrollo de diferentes organismos y se consideró el principal mecanismo de muerte celular programada en este estadio. Estudios en *C. elegans* han demostrado que, durante la diferenciación y desarrollo, un número determinado de células mueren por apoptosis (Yamaguchi et al., 2015). De forma similar, durante el desarrollo postnatal de cerebro de ratón, se encontró que la mitad de las interneuronas secretoras de GABA mueren por apoptosis en un porcentaje constante (Song et al. 2012). El proceso apoptótico durante este estadio es regulado también por señales externas, en anfibios, las células que mueren por apoptosis durante el cierre del tubo neural lo hacen en respuesta a estímulos señalizadores vecinos (Nonomura et al., 2013).

Las neuronas granulares de cerebelo (NGC) es el tipo neuronal más abundante del sistema nervioso central de mamíferos. Durante el desarrollo del cerebelo una gran población de los precursores de las NGC mueren por apoptosis cuando éstos no reciben las conexiones sinápticas glutamatérgicas necesarias para su maduración y establecimiento de los circuitos neuronales (Belmokhtar et al., 2001; Contestabile, 2002; Valencia y Morán, 2001; Ramiro-Cortés y Morán., 2009). De esta forma, durante el desarrollo, la apoptosis contribuye a la formación correcta del sistema nervioso central (Yacubova y Komuro.,2002). El cerebelo termina su maduración durante el periodo postnatal en mamíferos; en roedores se han caracterizado distintas etapas de la maduración de las NGC con distintos días postnatales (PN). Por ejemplo, la proliferación de los precursores que dan origen a estas neuronas ocurre en mayor porcentaje al día 8 PN; al día 12 PN ocurre la migración de las células ya diferenciadas hacia la capa molecular interna y al día 16 PN las células que no recibieron estímulos despolarizantes mueren por apoptosis (Coyoy et al., 2013). Estos eventos correlacionan con el aumento en la expresión de NOX2 y con la producción de especies

reactivas de oxígeno, indicando que el proceso de muerte apoptótica en neuronas granulares de cerebelo durante el desarrollo puede estar mediado por la producción de ERO y señalización redox.

Muerte apoptótica y vías de señalización

La vía intrínseca de apoptosis está regulada por vías de señalización como la vía de cinasas activadas por mitógeno (MAPK) que favorecen el proceso ante la presencia de ciertos estímulos como el incremento de ERO (Zaragoza- Campillo y Morán 2017; Yue y López, 2020). Las vías de señalización de cinasas activadas por mitógeno (MAPK) juegan un papel importante en convertir estímulos extracelulares a una gran variedad de respuestas celulares como el crecimiento celular, migración, proliferación, diferenciación y apoptosis (Yue y López, 2020). Los miembros de la superfamilia de las MAPK están evolutivamente conservados en las células eucariontes (Adler *et al.* 1999, Braicu *et al.* 2019). Son proteínas cinasas de serina/treonina que comparten estructura similar y propiedades bioquímicas como su activación por fosforilación en un motivo (Thr-X-Tyr) e inactivación regulada por fosfatasas (Braicu *et al.*, 2019).

Las cinasas JNK (C-Jun N-terminal kinase) y p38 (Mitogen-activated protein kinases) forman parte de esta superfamilia y están relacionadas con la señalización en respuesta a condiciones de estrés como estrés oxidante, radiación ultravioleta, rayos X, entre otros, y juegan un papel importante en el balance entre la supervivencia y la muerte celular (Adler *et al.* 1999).

ASK1 (Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1) también es miembro de esta familia. Es una cinasa de serina/ treonina que se localiza río arriba de la cascada de señalización de JNK y p38. Contiene el dominio cinasa flanqueado por dominios reguladores N-terminal y C-terminal (Ogier *et al.* 2020). Estos dominios cuentan con sitios de interacción con otras proteínas reguladoras y motivos de modificaciones postraduccionales formando en su conjunto un complejo denominado señalosoma (Olguín- Albuerne *et al.* 2014). Su activación es regulada por la autofosforilación en la treonina 845 en ratón y Thr 838 en humano y se induce por factores estresantes como producción de ERO, estrés de retículo y señales

inflamatorias (Shiizaki *et al.* 2013). Se ha demostrado que tanto la inhibición farmacológica de JNK en células LNCaP (Joo y Yoo, 2009) como de ASK1 inhiben la muerte apoptótica inducida por condiciones de estrés y por el contrario, su sobreexpresión conduce al incremento en la muerte apoptótica (Ogier *et al.* 2020).

Especies Reactivas de Oxígeno y ASK1

ASK1 se expresa en citoplasma y mitocondria y su actividad está estrechamente controlada por señalización redox debido a que contiene cisteínas reactivas susceptibles a oxidación y formación de enlaces disulfuro con proteínas oxidorreductoras de grupos tioles tiorredoxina (Trx) y glutarredoxina (Grx) (Olguín- Albuérne *et al.* 2014). Trx inhibe al señalosoma por su interacción directa con ASK1 en la región N-terminal. Esta tiorredoxina tiene un sitio activo redox que se conforma de dos residuos de cisteína (Cys32 y Cys35) con las que forma enlaces disulfuro inter e intramoleculares.

Por lo descrito anteriormente, Trx es un elemento importante en la activación o inactivación del señalosoma. En mamíferos existen dos homólogos con localización distinta: Trx1 es citosólica y Trx2 es mitocondrial. Se ha demostrado que Trx2 es quien se encarga de regular al señalosoma porque se localiza en la mitocondria, al igual que la cinasa ASK1. En su forma reducida, Trx es capaz de unirse al señalosoma e inhibirlo, sin embargo, en su condición oxidada se disocia y estimula la muerte apoptótica (Lim *et al.* 2008) (Figura 5).

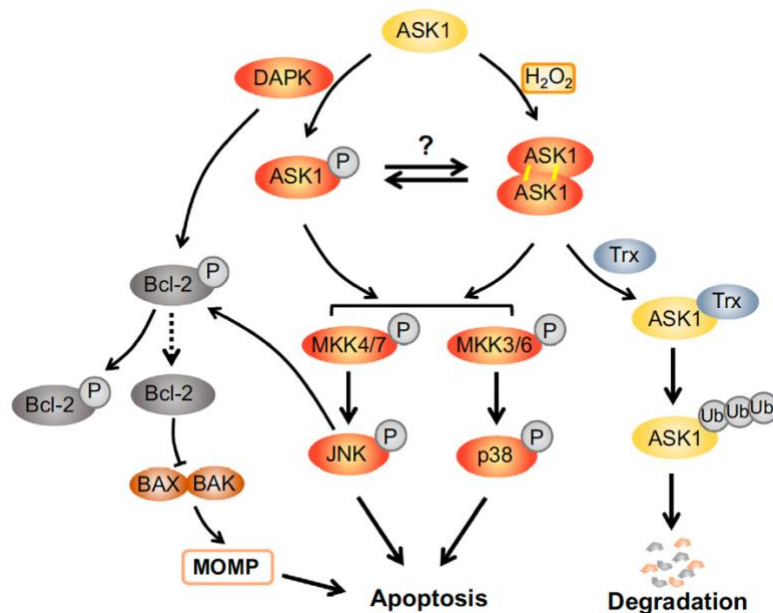


Figura 5. Mecanismo de activación de ASK1. En condiciones basales, ASK1 es inhibida por la interacción con la forma reducida de Trx. El incremento en el estrés celular y estrés oxidante lleva a la disociación del complejo Trx-ASK1 que promueve la autofosforilación de ASK1 y su consecuente activación. Esta condición lleva a la fosforilación y activación de MKK y JNK /p38 que inician con el proceso apoptótico. Por otra parte, JNK activada puede llevar a la fosforilación de Bcl-2 y con ello contribuir al proceso apoptótico. Tomado de Zhang et al., 2015

JNK, p38 y activación de la apoptosis

Como se mencionó previamente Jun N-terminal Kinases (JNKs) son un conjunto de proteínas miembros de la superfamilia de MAPK que participan en la proliferación, diferenciación y apoptosis. JNK es indispensable en el proceso de apoptosis y proliferación (Liu y Lin, 2005). Presenta tres genes denominados JNK1, JNK2 y JNK3 y múltiples variantes de *splicing* (Johnson *et al.* 2007). Las tres JNKs han sido involucradas en la inducción de la señalización apoptótica, los modelos de *knockout* específicos para cada una de estas cinasas han establecido que su deficiencia induce resistencia a la apoptosis inducida por radiación UV y excitotoxicidad, eventos en los cuales las especies reactivas de oxígeno participan (Tournier *et al.*, 2000; Dhanasekaran *et al.* 2008). JNK se encuentra río debajo de la activación de una

cinasa MAP2K que a su vez es activada por una cinasa MAP3K como ASK1. Su activación implica la fosforilación específica en residuos de serina Ser63 y Ser73 (Dhanasekaran *et al.* 2008). En su estado activo, JNK lleva a la fosforilación y transactivación de c-Jun que induce la formación de AP-1 (Activator protein 1) involucrado en la transcripción de factores pro-apoptóticos como los genes de TNF- α , Fas-L y Bak (Fan y Chambers, 2001). JNK también fosforila otros factores de transcripción como ATF2, ATF3, HSF-1, c-Myc entre otros que participan en respuesta a estrés y daño (Johnson y Nakamura, 2007). En general, se considera que la activación de JNK lleva al incremento en la expresión de factores pro-apoptóticos mientras que reduce aquellos anti-apoptóticos. Sin embargo, este no es un mecanismo universal y hay otras cinasas como p38 y p53 que han demostrado participar en los eventos de muerte, por lo tanto la activación de una u otra cinasa río debajo de una MAP3K depende del estímulo iniciador (Dhanasekaran *et al.* 2008). Por otra parte, JNK también tiene efectos independientes de su señalización nuclear, esta cinasa tiene una participación esencial modulando las funciones pro-apoptóticas y anti-apoptóticas de las proteínas localizadas en la mitocondria (Schroete *et al.*, 2003). JNK activada transloca a la mitocondria donde participa en la liberación de citocromo C, evento requerido para la formación del apoptosoma junto con Apaf-1 y caspasa 9 y la inducción de la activación de caspasas ejecutoras como la caspasa 3 (Tournier *et al.*, 2000) Figura 6.

JNK tiene una contribución esencial para la activación del proceso apoptótico en condiciones de estrés, esto se ha determinado mediante el uso de su inhibidor SP600125 en diferentes modelos mostrando que inhibir a JNK impide la progresión de la muerte (Dhanasekaran *et al.* 2008). JNK y p38 comumente se describen en conjunto porque comparten algunas funciones.

P38 está codificado en 4 genes en mamíferos: p38 α , p38 β , p38 γ y p38 δ , es activada en respuesta a estrés oxidante, radiación UV, estresores celulares, presión osmótica entre otros, también participa regulando funciones como metabolismo, diferenciación, apoptosis y senescencia (Boulton *et al.*, 1994; Rouse *et al.*, 1994, Raingerud *et al.*, 1995). La inhibición de p38 tiene efectos neuroprotectores en diferentes tipos neuronales. Estos efectos se deben principalmente a la fosforilación de Bim que a su vez fosforila a Bcl-2 inhibiendo sus

funciones anti-apoptóticas. En cultivo neuronal, p38 es activado por ASK1 al igual de JNK (Cai *et al.* 2006) (Figura 6) .

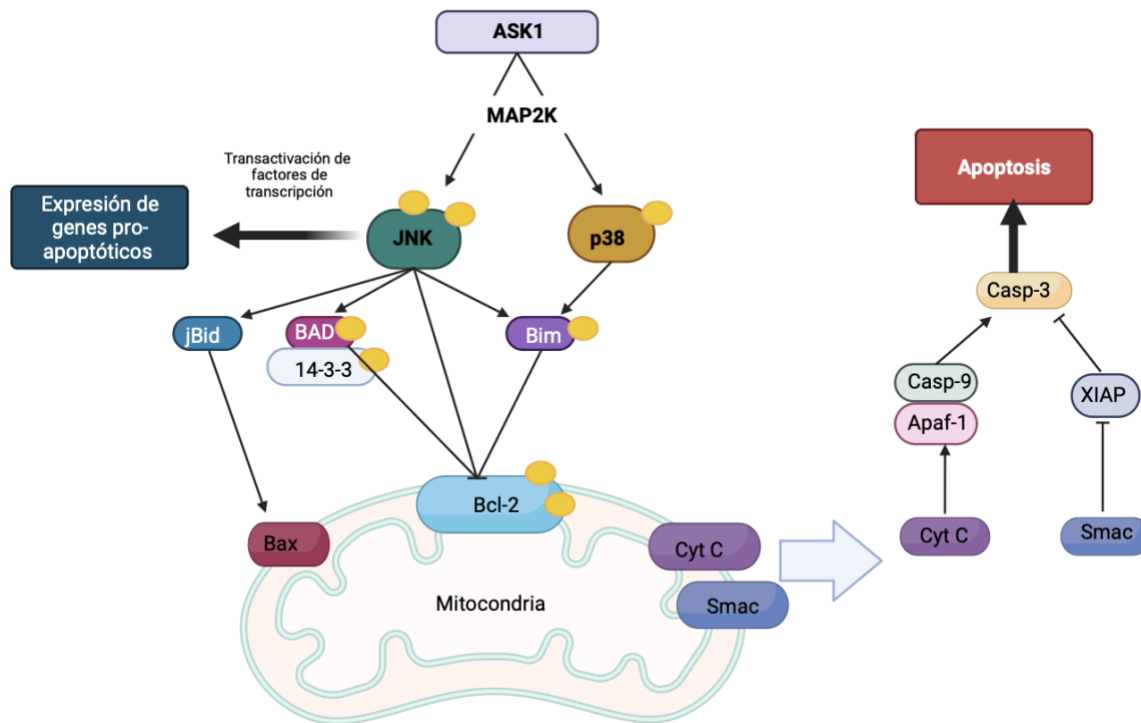


Figura 6. Apoptosis mediada por activación de JNK y p38. La activación de JNK y p38 inicia por activación de una MAP3K como ASK1 y MAP2K como intermediario. JNK fosforilado activa a Bid quien a su vez activa a Bax (proteína pro-apoptótica) y promueve la liberación del citocromo C (Cyt C) y Smac/Diablo (Smac) de la mitocondria. El citocromo C inicia la cascada de muerte mediante la activación de caspasa 9. Smac, por otra parte inhibe al inhibidor de la caspasa 3, XIAP. Además, JNK fosforila a BAD que es secuestrado por la proteína 14-3-3 y promueve la neutralización de Bcl-2 que es una proteína anti-apoptótica. JNK también puede inhibir directamente a Bcl-2 por fosforilación. p38 por su parte fosforila a Bim quien también inhibe a Bcl-2, esta ultima función es compartida con JNK. Independiente de la señalización mitocondrial, JNK es capaz de translocar al nucleo e inducir la expresión de genes pro-apoptóticos. Esquema realizado por Biorender, basado en Chiyo *et al.* 2009.

Factores de transcripción FOXO

Como se abordó previamente, el promotor de *Txnip* cuenta con motivos de interacción a distintos factores de transcripción que estarían regulando su expresión en respuesta a diversos estímulos. En condiciones de estrés oxidante, se ha observado que los factores FOXO pueden ser los encargados del incremento en *Txnip* para promover la muerte celular (Papadia *et al.*, 2008).

Se han descrito 4 miembros de la familia Forkhead box-O que comprende a los factores FOXO 1, 3, 4 y 6. Esta familia de proteínas promueve la transcripción de genes blanco en respuesta a diversos procesos tales como autofagia, muerte, longevidad (Webb *et al.* 2014). Los factores FOXO son sustratos directos de Akt, ya que tienen 3 motivos conservados de fosforilación por esta cinasa. La fosforilación lleva a su reclutamiento por la proteína 14-3-3, a la retención citoplasmática y en consecuencia a la inhibición de la actividad transcripcional (Kloet *et al.* 2011). Al ser reclutado por la proteína 14-3-3, FOXO pierde su afinidad por el DNA y la señal de localización nuclear (NLS) queda oculta, por lo tanto, afecta su importación al núcleo (Manning *et al.* 2017; Daitoku *et al.* 2011) (Figura 7). En células endoteliales se ha comprobado que la expresión de *Txnip* requiere de la inactivación de Akt y depende del factor de transcripción FOXO (Li *et al.* 2009)

En relación con lo anterior, en neuronas corticales y en células beta pancreáticas los factores de transcripción de la familia FOXO promueven la expresión de *Txnip* a través de la interacción con la secuencia conservada en el promotor del gen (Papadia *et al.*, 2008).

El papel de las especies reactivas de oxígeno en la señalización de Txnip y sus efectos en la muerte neuronal

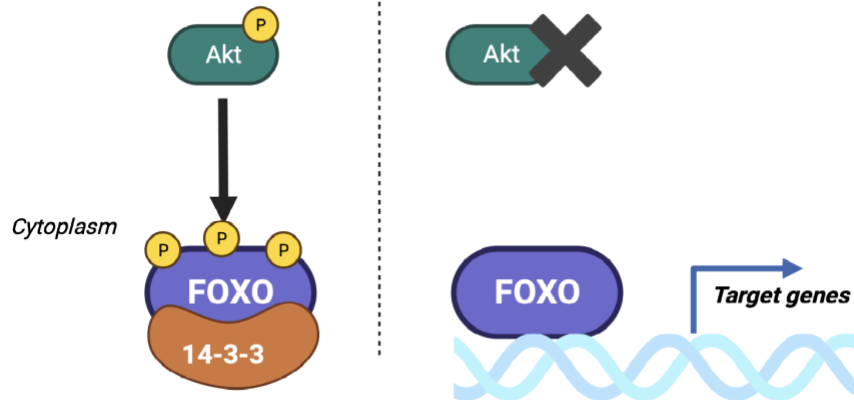


Figura 7. Regulación de FOXO por Akt. Cuando Akt se encuentra activa, fosforila a FOXO en uno o más de los 3 motivos conservados, esto permite que la proteína 14-3-3 interaccione con los factores de transcripción y los reclute porque esconde la señal de localización nuclear. Si la fosforilación es removida permite la disociación de 14-3-3 y facilita la interacción con el DNA y con otros complejos correguladores como la acetilasa CBP/P300 lo que promueve la transcripción de sus genes blanco. Esquema realizado con BioRender.

Antecedentes

Las neuronas granulares de cerebelo en cultivo *in vitro* recapitulan eventos del desarrollo que ocurre *in vivo*. Estas células muestran desarrollo axonal, dendrítico y una respuesta trófica al glutamato extracelular y a condiciones despolarizantes. Este periodo de sensibilidad comprende desde los 5 DIV a los 9 DIV y se asocia al recambio de las subunidades de los receptores NMDA que permiten incrementar la afinidad a glutamato. *In vivo*, las NGC que reciben estímulos despolarizantes garantizan su supervivencia, mientras que las que no los reciben mueren de forma programada con características apoptóticas (Blancas y Moran, 2011; Valencia y Morán, 2004). En cultivo, el mantenimiento del medio con condiciones despolarizantes (25mM de KCl) permite que las células sobrevivan. El cambio de medio a concentraciones bajas de potasio (5mM) (K5) induce muerte apoptótica. Bajo estas condiciones, alrededor de 50% de la población neuronal muere durante las primeras 24 h (Valencia y Morán, 2004b).

Dentro de la cascada de señalización que lleva a la muerte se han descrito algunos eventos relevantes: la producción temprana de ERO que es detectable desde las 3.5 h. Este evento correlaciona con la activación de ASK1 a las 3 h y la fosforilación de C-jun, proteína río abajo de JNK (Ramiro-Cortés y Morán, 2009). Por otra parte, durante las primeras horas de con el estímulo de bajo potasio ocurre la inactivación de Akt de forma dependiente del incremento en ERO. A las 2 h disminuye la fosforilación de la proteína S473, condición que demuestra que Akt se encuentra inactiva y se recupera gradualmente volviendo a su estado activo a las 5 h posteriores al tratamiento con K5. La inactivación de Akt depende de ERO porque el tratamiento con H₂O₂ disminuye la fosforilación y el tratamiento con antioxidantes la incrementa (Zaragoza-Campillo y Morán, 2017).

Un evento relevante en la señalización en respuesta a K5 se asocia a la proteína TXNIP. En NGC de 7DIV en condiciones despolarizantes (K25) TXNIP no se expresa. Cuando se hace un cambio de medio a K5, la proteína comienza a expresarse e incrementar sus

niveles a las 4 h de forma dependiente de ERO y de la inactivación de Akt. Esto se demostró mediante el tratamiento con EUK -134, un antioxidante, y con DPI y AEBSF, dos inhibidores inespecíficos de las enzimas NOX. Además, el tratamiento de las NGC con LY294002, un inhibidor de PI3K y por lo tanto de Akt, indujo un incremento de TXNIP (Zaragoza-Campillo y Morán, 2017).

Estas evidencias sugieren que en NGC la expresión de TXNIP podría estar promoviendo la muerte apoptótica, como se ha observado en células con fenotipo carcinogénico y en células pancreáticas (Masutani, 2022). Además, la expresión de TXNIP está regulada por la producción de ERO.

Por otra parte, un ensayo de ChIP seq de FOXO3 en progenitores neuronales de adulto (NPCs) mostró que este factor de transcripción se une al promotor de *Txnip* e induce su expresión (Webb *et al.*, 2013). Este trabajo incluye a *Txnip* como uno de los 50 genes principalmente regulados por FOXO3 en ese modelo.

Las observaciones citadas anteriormente son reafirmadas en el trabajo de Papadia *et al.* (2008). Usando un modelo de neuronas corticales de ratón, este grupo demuestra que tanto FOXO1 como FOXO3 pueden promover la expresión de *Txnip* en respuesta al daño citotóxico mediante la interacción directa con su región promotora.

Esta evidencia sugiere que los factores FOXO son capaces de regular la expresión de *Txnip* en distintos tipos celulares incluyendo neuronas en respuesta a condiciones de estrés, lo cual robustece la hipótesis de que en cultivo de NGC la expresión *Txnip* podría ocurrir mediante FOXO.

Descripción del Modelo

El modelo de muerte por bajo potasio en neuronas granulares de cerebelo (NGC) ha sido descrito previamente. La muerte apoptótica ocurre como consecuencia de la caída en el potencial de membrana neuronal que se produce cuando hay un cierre de los canales de calcio dependientes de voltaje generado por el cambio en la concentración de iones potasio en el medio extracelular (Hernández-Enríquez *et al.*, 2010)

En condiciones de potasio alto (25mM-30mM) la membrana neuronal se mantiene despolarizada (-30mM). Esta despolarización es similar a la que ocurre en el desarrollo *in vivo* cuando existe una activación de los receptores glutamatérgico tipo NMDA por parte de las fibras presinápticas, lo que permiten el flujo de calcio al interior de la célula. Contrario a esto, en condiciones *in vitro*, cuando el potasio extracelular disminuye, se genera una hiperpolarización de la membrana que impide la activación de los canales de calcio dependientes de voltaje y, por lo tanto, lleva a una reducción de calcio intracelular. Esto se ha asociado a un aumento en la producción de las ERO en una etapa temprana por un mecanismo desconocido (Benitez-Rangel *et al.*, 2020) y a la activación del proceso apoptótico (Valencia y Morán, 2004). La activación de caspasa 3 y la traslocación de fosfadilserina, marcadores característicos de este tipo de muerte, se observan a las 4 h y 5 h, respectivamente. La membrana celular se compromete alrededor de las 12 h y la viabilidad celular disminuye a las 24 h (Figura 8).

Por otra parte, el modelo de muerte por estaurosporina inicia por un proceso diferente, la estaurosporina es un inhibidor general de proteínas cinasas. Sin embargo, el tipo de muerte que activa es similar al inducido por bajo potasio. Se caracteriza por un incremento de calcio intracelular y pérdida del potencial de membrana mitocondrial en minutos y la producción temprana de especies reactivas de oxígeno, así como la activación de ASK1 que promueve la muerte neuronal 24 h más tarde (Ramiro-Cortés y Morán, 2009).

El papel de las especies reactivas de oxígeno en la señalización de Txnip y sus efectos en la muerte neuronal

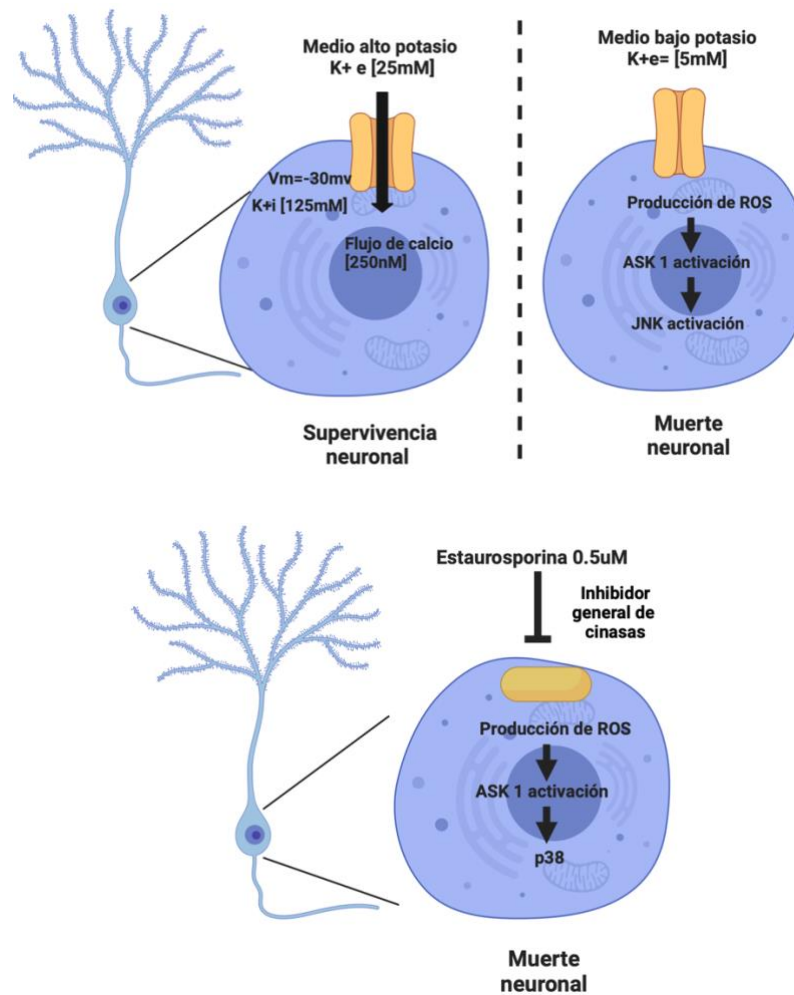


Figura 8. Modelos de muerte neuronal generados por bajo potasio y estaurosporina. El mantenimiento del cultivo de neuronas granulares de cerebelo (NGC) en medio con concentración de potasio 25mM es una señal de supervivencia y mantenimiento celular, cuando se realiza el cambio de medio a uno con concentración de potasio 5mM a los 7 días *In vitro* (DIV) se induce el proceso de muerte apoptótica que disminuye el 60% de la población neuronal 24 horas después. Creado con Biorender.

Planteamiento del problema

TXNIP es una proteína que ha cobrado relevancia en la investigación debido a que podría ser un blanco terapéutico en diversas enfermedades ya que se ha relacionado con el progreso de la muerte celular en diferentes tipos celulares. Conocer la vía de señalización involucrada en la expresión de *Txnip* es de suma importancia para establecer el curso de la muerte celular y conocer las moléculas implicadas. Las neuronas granulares de cerebelo son el modelo idóneo para el estudio de la muerte neuronal debido a que el proceso puede inducirse mediante dos tratamientos bien descritos en la literatura: el cambio a medio con concentraciones bajas de potasio (5 mM, K5) o el tratamiento con estaurosporina (Sts). Hasta ahora, se desconoce cuál es el mecanismo de señalización que lleva a la expresión transcripcional de *Txnip* en NGC después de los tratamientos con K5 y estaurosporina así como el factor de transcripción involucrado en este proceso que es dependiente de especies reactivas de oxígeno. Asimismo, poco se ha explorado el efecto de la inhibición de la expresión de *Txnip* en la ejecución de la muerte.

Alcance de la tesis

El objetivo de la presente tesis fue investigar:

-El mecanismo de señalización celular que lleva a la regulación de *Txnip* y a la expresión de la proteína en neuronas granulares de cerebelo durante el estímulo de muerte por bajo potasio K5 y estaurosporina.

-La participación de la proteína TXNIP en la muerte celular haciendo énfasis en los posibles efectos neuroprotectores.

Considerando los antecedentes mencionados, nuestra hipótesis de trabajo es que en las NGC de 7 DIV los estímulos de bajo potasio y estaurosporina inducen la producción de especies reactivas de oxígeno, lo cual permite la inactivación de Akt. Esta condición promueve que FOXO transloque al núcleo e induzca la expresión de *Txnip*, el cual es necesario para la progresión de la muerte neuronal porque permite la activación de ASK1 .

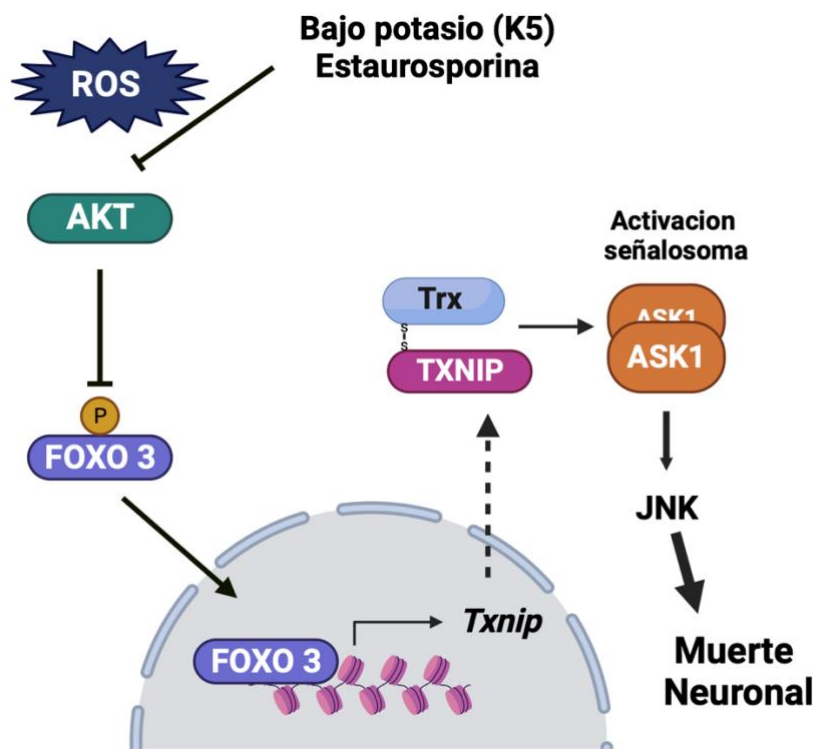


Figura 9. Hipótesis de la investigación. El estímulo de muerte generado por bajo potasio induce el incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) que inactivan a la proteína Akt mediante su oxidación. Esto genera que los factores de transcripción FOXO inicien la transcripción de *Txnip*. La proteína TXNIP recluta a Trx y con ello activa la vía de MAPK implicada en la muerte apoptótica (ASK1- JNK/p38) en NGC. Realizado con Biorender.

Para probar la hipótesis propuesta, la presente tesis abordará los siguientes puntos de manera experimental en el modelo de cultivo de células granulares de cerebelo de rata de la cepa *wistar*.

1. La producción de ERO y su dinámica en la muerte inducida por bajo potasio (K5) y estaurosporina (Sts).
2. El efecto de las ERO y de la inactivación de Akt en la translocación de FOXO 3 al núcleo.
3. El efecto de las ERO producidas por K5 y Sts y de la inactivación de Akt en la expresión de *Txnip*.
4. La regulación transcripcional de *Txnip* por FOXO 3.
5. El efecto del silenciamiento de *Txnip* sobre el proceso de muerte.

PARTE 2

Métodos

Materiales

Suero Fetal bovino, penicilina/estreptomicina y medio basal Eagle's de GIBCO®, medio DMEM GIBCO, Neurobasal GIBCO, invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Dihidroetidio, calcein-AM y MTT de Molecular Probes® (Eugene, OR, USA). Poly-d-lisina, tripsina GIBCO, DNasa I, citosina arabinosa, Dimetil sulfoximina (DMSO), LY294002, poliacrilamida, sacarosa, Mg2Cl, KCl, EDTA,). Coctel Inhibidor de proteasas en tabletas (Complete) Roche, (Manheim, Alemania). Inhibidor de fosfatasas en tabletas, Thermo Scientific (Rockford, USA), ProSiev QuadColor protein Marker, PyroTaq Eva Green 5X Master mix qPCR , glicógeno RNA grade invitrogene, Random primers Thermo Scientific RNasa A, reverse transcriptase, Riboblock, buffer RT Thermo Scientific. Primers Merck *Txnip* mRNA Reverse 5'GCTCACTGCACGTTGTTGTT, Forward 5' TATGTACGCCCCTGAGTTCC, FOXO 1/3 motif en promotor de *Txnip* forward 5' GTTGGAGGCCTGGTAAACAA reverse 5' ATATAGCCGCCTGGCTTG FOXO 1 motif en promotor *Txnip* forward 5' GGCTGGGGGTGTTGTTTA Reverse 5' GCGCAGGAAAATAAAGATGA, GAPDH Foward - CTCATGACCACAGTCCATGC Reverse - TTCAGCTCTGGGATGACCTT

Cultivo Celular

Los animales utilizados para experimentación en el presente estudio fueron tratados de acuerdo con los estándares internacionales de cuidado animal y con los procedimientos aprobados por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, protocolo: “*Metodología del cultivo de células de cerebelo de rata*”, con número **JMA174-21**. Se utilizó como protocolo la Guía de Uso y Cuidado de Mamíferos en Neurociencia al igual que la Guía de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de los Institutos de Investigación de México. Se realizaron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento animal y reducir el número de animales empleados en la presente investigación.

Las neuronas granulares de cerebelo (NGC) fueron cultivadas como se describió previamente (Valencia y Morán, 2001). Para los ensayos de viabilidad, expresión de *Txnip* e inmunofluorescencia se utilizaron cultivos de NGC de rata Wistar. El ensayo de ChIP se realizó con cultivo de neuronas granulares de cerebelo de ratones C57BCL/6 en el laboratorio del Doctor Angel Barco en el Instituto de Neurociencias de Alicante, España, en este modelo se realizó ensayo de inmunofluorescencia para validar los anticuerpos y se cuantificó la expresión de *Txnip*. Las neuronas se aislaron de ratas Wistar o ratones C57BCL/6 de 4 y 7 DPN respectivamente y se sembraron a una densidad de 256×10^3 células /cm² en cajas plásticas previamente tratadas con poly-D-lisina (5ug/mL). Se utilizó medio de cultivo basal Eagle's suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino inactivado por calor, glutamina 2 mM, KCl 25 mM, estreptomina 50 µg/ml y penicilina 50 U/ml. 24 h después de sembradas las células, se añadió citosina arabinosa (10 µM) para evitar la proliferación de células no neuronales. El cultivo se mantuvo a 37°C en una atmosfera de CO₂ (5 %) y aire saturado con vapor de agua (95 %). El cultivo de neuronas se mantuvo 7 días en condiciones de medio despolarizante (K25) y después de 7 DIV se realizó cambio de medio a medio libre de suero y con bajo potasio KCl 5 mM (K5) durante diferentes tiempos que comprenden desde 30 minutos hasta 24 h.

Línea Celular MSN neuroblastoma humano

La línea celular MSN de Neuroblastoma Humano fue donada por el Laboratorio de la Doctora Clorinda Arias del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. Fueron sembradas de acuerdo con lo descrito por (Zepeta-Flores *et al.*, 2018)

Las células adherentes de Neuroblastoma MSN fueron crecidas en monocapa y cultivadas en medio RPMI 160 suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco, Life Technologies Corporation, GrandIsland, NY, USA), 1% de medio no esencial MEM (Gibco) y 1 % de solución con glutamina-serina- asparagina en platos de cultivo y se mantuvieron en incubación humidificada con atmosfera de 95 % de aire y 5 % de CO₂ a 37 °C. Las células fueron re- cultivadas a una densidad de 1x10⁶ células por plato de 100mm. Reynolds *et al.*, 1986).

Western Blot

Las células MSN fueron lavadas con PBS frio y homogenizadas en buffer de lisis (Trizma 25 mM, NaCl 50 mM, Igepal 2 %, SDS 0.2 % pH 7.4 adicionado con inhibidor de proteasas complete, inhibidor de fosfatasas y NaF (50 mM). Las muestras fueron sonicadas por 30 segundos con potencia de sonicación de 30 % y centrifugadas a 4,500 rpm por 5 min. La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry. La electroforesis se realizó en SDS-PAGE 10% con 60 µg de proteína por pozo o 20 µg en la evaluación de la interferencia de *Txnip*. Los geles se transfirieron en membranas PVDF a 260 mA por 40 min. Las membranas se bloquearon con buffer TTBS (Tri-HCl 100 mM, NaCl 150 mM y Tween 0.1% pH 7.4) con 5% de leche libre de grasa por 1 h en agitación a temperatura ambiente. El anticuerpo primario anti TXNIP cell signaling (D5F3E) se incubó por 48 h (1:1,000). El anticuerpo secundario peroxidase-conjugated anti-rabbit [1:10,000] se incubó por 1h.

Inmunofluorescencia

Los ensayos de inmunofluorescencia se realizaron en cultivos de NGC de rata wistar de 7DIV. Se utilizaron los anticuerpos anti FOXO 3 Cell signaling (D19A7) y el anticuerpo secundario con Alexa Fluor 488 Anti-rabbit cell signaling (4412S). Las células se cultivaron sobre cubreobjetos de vidrio en caja de 12 pozos sobre una capa de PLL 5X, se mantuvieron en medio K25 durante 7DIV y se realizó el tratamiento con el inhibidor de PI3K LY294002 (100 μ M durante 4h), cambio a medio K5 o con Sts (0.5 μ M) por 30 min, 1 y 2 h o tratamiento con peróxido de hidrogeno 100 μ M 1h. Posteriormente las células se lavaron con PBS 3 veces, se fijaron con paraformaldehído 4 % por 20 minutos a temperatura ambiente, se lavaron con PBS 3 veces y se bloquearon con suero 3 % -triton 0.2 %- PBS por 2h a temperatura ambiente. El anticuerpo primario anti FOXO 3 se utilizó a una dilución (1:500) en solución PBS-T suero de cabra 3 % y las células se mantuvieron en esta solución toda la noche. Las células se incubaron en el anticuerpo secundario acoplado a Alexa 488 (1:1000) por 1h a temperatura ambiente en oscuridad. Se utilizó el medio de montaje Vectashied con DAPI para teñir el nucleo celular. Las imágenes se capturaron en microscopio confocal Zeiss LM1000, se tomaron imágenes en diferentes planos en Z para evaluar la señal de FOXO3 y DAPI en diferentes planos de la célula. Se utilizó el complemento de image J, JaCOP para cuantificar el coeficiente de colocación de Pearson entre la marca de FOXO 3 y la señal nuclear de DAPI en las diferentes condiciones.

El ensayo de inmunofluorescencia en células granulares de cerebelo se realizó con el objetivo de corroborar el funcionamiento de los anticuerpos FOXO 1 (ab39670) (1:500) y FOXO 3 (ab12162) (1:500) anticuerpos primarios específicos para la realización del ensayo de inmunoprecipitación de cromatina, esto debido a que los ensayos de ChIP se realizaron en el Instituto de Neurociencias de Alicante, España en el laboratorio del Doctor Angel Barco. Los anticuerpos fueron transportados desde México en hielo seco. Se utilizaron NGC de ratón de la cepa C57BCL/6. Para ambos casos, se utilizó anticuerpo secundario Alexa Fluor 594 goat anti rabbit. La fijación se realizó con paraformaldehído 4 % por 12 minutos a temperatura ambiente en agitación. Se realizaron 3 lavados con PBS

por 5 min en agitación a temperatura ambiente y 1 lavado con PBS-tritón 0.2% 5 min. El bloqueo por 30 minutos en una solución de PBS-Tritón-SFB 3% en agitación a temperatura ambiente. El anticuerpo primario se incubó en solución de PBS-Tritón-SFB 2% [1:1000] en agitación a 4 °C. Se realizaron 3 lavados con PBS y 1 con PBS -tritón 5 min a temperatura ambiente. Se incubó el anticuerpo secundario 1: 500 por 1h 30 min a temperatura ambiente. Y se incubó con DAPI (diluido?) 3 min en agitación. Se realizaron 2 lavados con PBS -tritón y uno con PBS. Las muestras se montaron sobre cubreobjetos.

Retrotranscripción

Se utilizaron cultivos de neuronas granulares de cerebelo 7DIV, hipocampo 14 DIV y línea celular MNS Neuroblastoma sembradas en cajas plásticas de 35 y 60 mm. Se añadió 1ml de TRIzol por muestra en las cajas 35 mm y 1,5 ml para las cajas de 60 mm. Se agregaron 200 µl de cloroformo. Se centrifugaron las muestras por 15 min a 4°C a 12,000g. Se tomó la primera fase y se agregó 500 µl de 2-propanol y 1µl de glicógeno. Las muestras se mantuvieron 45 min en hielo para permitir la precipitación del RNA. Se realizó una centrifugación durante 1 h a 4 °C a 17,000 g. Se removió el sobrenadante y se agregó 80 % de etanol frío, se centrifugo por 5 min a 4 °C a 17,000 g se removió el isopropanol y el pellet se dejó secar a temperatura ambiente. El pellet se resuspendió en 80 µl de agua DEPC esterilizada. La retrotranscripción se realizó con 500 ng de RNA. Se utilizó un mix con OligoDT 1 µl /reacción, dNTPS 2 µl (10 mM) y DNA 500 ng a un volumen final de 11 µl con agua DEPC. Se colocó en Thermomixer 3 min a 62 °C. El segundo mix se realizó con 4 µl de buffer 5X RT Thermo Scientific, 0,5 µl de ribolock (Thermo Scientific RNA inhibitor) y 1µl Reverse aid Reverse Transcriptase (Thermo Scientific). La retrotranscripción se realizó a 25 °C por 5 min, 42 °C/ 1 h y 75 °C/15 min.

PCR cuantitativa

La reacción en cadena de la polimerasa se realizó con placas Microamp Applied Biosystem de 96 pozos con micas adheribles. Se utilizaron 50 ng del producto de la retrotranscripción cDNA, se utilizó la enzima MasterMix qPCR ROx PyroTaq EvaGreen

El papel de las especies reactivas de oxígeno en la señalización de Txnip y sus efectos en la muerte neuronal

5x que contiene polimerasa pyrotaq, dNTPs, MgCl₂ y ROX dye 4 µl /reacción. Se agregaron 0.5 µl de forward primers (10 mM) y 0.5 µl de reverse primers (10 mM). El protocolo fue de 40 ciclos 95 °C, 15 s 60 °C/ 29 s, 72 °C /29 s.

Los oligonucleótidos utilizados fueron *Txnip* (forward 5' GGCTGGGGGTGTTGTTTA
Reverse 5' GCGCAGGAAAATAAGATGA) y GAPDH Foward
CTCATGACCACAGTCCATGC Reverse - TTCAGCTCTGGGATGACCTT

Inmunoprecipitación de la cromatina con anticuerpos FOXO 1 y FOXO 3

Se utilizaron 1X10⁷ neuronas granulares de cerebelo de 7DIV por condición: K25, K5 por 30 min, 1 h y peróxido de hidrógeno 1h (100 µM). Se realizó la fijación en temperatura ambiente con formaldehído 1.1 % en medio Hans por 10 minutos. La fijación se detuvo con glicina 0.125 M 5 min a temperatura ambiente. Se realizaron 2 lavados con Hans médium frio y las células se resuspendieron con 500 µl de RIPA buffer (Tris HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 150 mM, NP-40 1 % , deoxicolato de sodio 0.5 % , SDS 0,1 % adicionado con inhibidor de proteasas complete). La sonicación se realizó con el sonicador Branson 450 analógico con potencia de 400 w, punta plana de ½ mm, potencia de salida 10 % 8 ciclos de 15 s on/ 30 s off. La cromatina sonicada se centrifugó 15 min a 13, 000 rpm. El sobrenadante se tomó y se hizo una dilución 1:10 con buffer de unión (Tris-HCl 10 mM pH8.0, NaCl 300 mM, EDTA 5mM pH 8.0, SDS 0.5%) se tomó 10% de la muestra para el *Input* del ensayo y el resto se dividió en dos tubos, uno se incubó con ab FOXO 1 o FOXO 3 (5ug / condición) y el otro con anticuerpo hecho en conejo para obtener *background* del ensayo. El anticuerpo se incubó toda la noche a 4°C en rotación.

Se utilizaron perlas dynabeads (Thermo Scientific) para inmunoprecipitar, se tomaron 35 µl de dynabeads por condición. Las perlas se lavaron 3 veces con buffer de unión, se precipitaron en la banda magnética y se resuspendieron en el mismo volumen tomado con buffer de unión. Se colocaron 35 µl de dynabeads a cada tubo previamente incubado con el anticuerpo. Las perlas con la cromatina y el anticuerpo se incubaron por 4 h a 4 °C en rotación. Posterior a la incubación, las muestras se colocaron sobre la banda magnética, se

precipitaron las perlas y se retiró el resto de sobrenadante. Las perlas se lavaron 1 vez con 1 ml de low salt buffer (Tris-HCl 50 mM pH 8.1, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, SDS 0.1%, triton X-100 1 %, deoxicolato de sodio 0.1 %) por 5 min a temperatura ambiente en rotación, 1 vez con 1 ml de high salt buffer (Tris-HCl 50 mM pH 8.1, NaCl 500 mM, EDTA 1mM, SDS 0.1%, triton X-100 1%, deoxicolato de sodio 0.1%) 1 vez con LiCl salt buffer (Tris-HCl pH 8.1 50mM, EDTA 1mM pH 8.0, NP-40 1 % , deoxicolato de sodio 0.7 %, LiCl₂ 500 mM) y 2 veces con TE buffer (Tris- HCl 10mM pH8.0, EDTA 1mM pH 8,0). Las perlas se precipitaron en la banda magnética y se resuspendieron con 300 µl de buffer (10% NaHCO₃ [1M], 10% SDS [1%] dH₂O), a las muestras input también se les agregó 300 µl del buffer. A todas las muestras se les añadió 16 µl de NaCl [5M]. Las muestras se incubaron a 65 °C toda la noche en agitación para quitar la interacción proteína-DNA. Se agregó 1µl de RNasa A (1mg/ml) y se incubaron a 37 °C por 30 min. Las perlas magnéticas se precipitaron en la banda magnética, se recuperó el sobrenadante y se agregó 1µl de proteinasa K, se incubó 4 h a 55 °C. Para purificar el DNA se agregó un volumen de fenol: cloroformo incluyendo a las muestras inputs. Las muestras se centrifugaron por 10 min a 4 °C a 13,300 rpm. Se tomó la primera fase y se colocó en un tubo con el mismo volumen de cloroformo se centrifuga a 13,300 rpm por 10 min a 4°C. Este paso se realizó dos veces. Se recuperó la primera fase y se agregó un volumen de la solución acético 0.1vol [3 M pH5.3], etanol 2.5 vol [100 % frío] glicógeno 1µl (Thermo Scientific). Las muestras se guardaron a -80°C toda la noche para precipitar el DNA. Se realizó una centrifugación de 1h a 4 °C a 14,000 rpm. Se lavó el pellet con etanol 80 % frío y se resuspender con 20 µl de agua mili Q estéril. La PCR se realizó de la forma antes descrita.

Electroporación

La línea celular MSN Neuroblastoma se transfectó con shRNA *Txnip* mediante la técnica de electroporación por nucleofección con el kit Amaxa VP1003 empleando el programa C-13. Se transfectaron 4 diferentes shRNA con *target* al mRNA de *Txnip* y una secuencia control *scramble* (Src) obtenidos por la compañía Genecopoeia (RSH045604-31). Se utilizaron 5µg del plásmido purificado mediante Maxiprep por cada 4 millones de células. Se realizó un

pulso de electroporación y las células se sembraron en cajas costar de 35 mm. La eficiencia de transfección fue evaluada a las 48 h con el microscopio de epifluorescencia.

Viabilidad Celular por Calceína / yoduro de propidio

La viabilidad celular se evaluó con calceína-AM que tiñe células vivas que son capaces de transformar calceína-AM, por acción de las esterasas endógenas a calceína que es un producto fluorescente a $\lambda = 495/515$ nm. Como contraparte, el yoduro de propidio (IP) es un compuesto que marca de forma indirecta células que comenzaron en proceso de muerte y que perdieron la integridad de la membrana plasmática. En condiciones normales, el yoduro no tiene la capacidad de difundir a través de la membrana. Su unión a DNA produce un incremento en su fluorescencia $\lambda = 493/636$ nm. Las neuronas granulares de cerebelo fueron cultivadas por 7DIV con medio K25, a esta edad se cambió el medio a medio con bajo potasio (K5) por diferentes tiempos hasta 24 h o se realizó el tratamiento con estaurosporina (0.5 μ M), también se realizaron ensayos de viabilidad con el inhibidor de la cinasa JNK, SP600125 (200 nM- 10 μ M) en medio K5. Después del tratamiento, las células se incubaron con calceína- AM (1 μ M) y IP (40 μ M) por 30 min a 37°C. Posteriormente las células fueron observadas y fotografiadas en microscopio de fluorescencia. El análisis de imágenes se realizó con Image J. Se consideró la marca de las células positivas a cada condición. La viabilidad también se evaluó en la línea celular de neuroblastoma humano MSN utilizando los marcadores previamente mencionados con el mismo tiempo de incubación. Se realizaron tratamientos con estaurosporina 1 μ M, la viabilidad se cuantificó 24 h después.

Detección de ERO por DHE

El compuesto dihidroetidio (DHE) es un marcador de las especies reactivas de oxígeno. Tiene la capacidad de difundir a la célula y ser oxidado por la presencia de especies reactivas de oxígeno que se encuentran en el citosol. La oxidación de la molécula produce etidio y 2-hidroxietidio que se une al DNA de doble cadena y aumenta su fluorescencia

(Ex λ = 405 nm, Em λ = 590 nm). Con esta técnica, se mide la intensidad de fluorescencia como un parámetro indirecto de los niveles de ERO (Zaragoza-Campillo y Morán, 2017)

Las neuronas granulares de cerebelo se mantuvieron en medio K25 durante 7 DIV, cuando se les realizó cambio de medio a medio con bajo potasio (K5) y el estímulo con H₂O₂ 100 μ M durante 1h. Después del tratamiento, las células se incubaron con 10 μ M de DHE por 30 minutos a 37°C. Posteriormente, las células fueron observadas en el microscopio de fluorescencia con un filtro para detectar rodamina (longitud de onda 488-515 nm) el análisis de imágenes se realizó con el programa Image J, se cuantificó la densidad integrada normalizada respecto a la condición de alto potasio.

Análisis de datos

Los datos son presentados como la media \pm el error estándar de la media. Se utilizó el programa Prism Graph 8.1 para realizar el análisis estadístico de los experimentos. La distribución normal de los datos se determinó con una prueba de Shapiro-Wilks. Los experimentos de viabilidad se presentan como porcentaje normalizado a K25. Los datos de qPCR se encuentran normalizados respecto al control relativo a 1. La significancia estadística se determinó como $p < 0.05$ mediante una prueba de análisis de varianza (ANOVA) seguido de prueba post hoc de Dunnett. Para los datos con múltiples variables como el ensayo de CHIP y de viabilidad con el shRNA de *Txnip* se utilizó un ANOVA de dos vías seguido de una prueba de Tukey o Sidak respectivamente.

PARTE 3

Resultados

El bajo potasio y estaurosporina inducen la muerte de las NGC a las 24 h

Con el objetivo de determinar la ventana temporal en la que ocurre la muerte de las NGC, se realizaron ensayos de viabilidad con calceína y yoduro de propidio en cultivo de NGC de rata de 7 DIV. Las neuronas se trataron con estaurosporina (0.5 μ M) en medio depolarizante KCl 25 mM (K25) o se cambiaron a medio con bajo potasio (KCl 5 mM; K5) durante 6, 18 y 24 h en ambos casos. Bajo estas condiciones encontramos que alrededor del 50 y 60% de la población neuronal muere 24h después con los estímulos de K5 y Sts respectivamente en comparación con K25 (Figura 10). En K5 la viabilidad se reduce significativamente desde las 18 h mientras que el tratamiento con Sts induce la muerte hasta 24 h después (Figura 10).

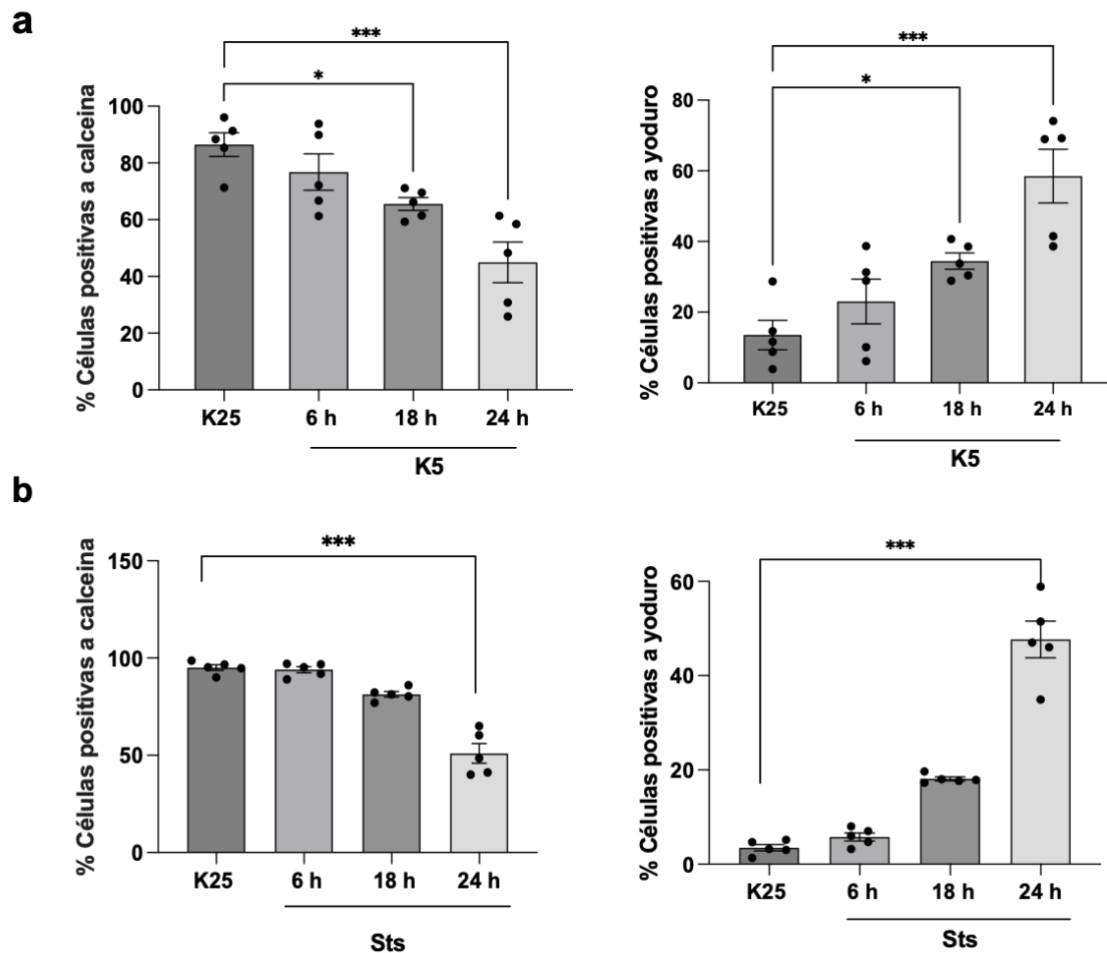


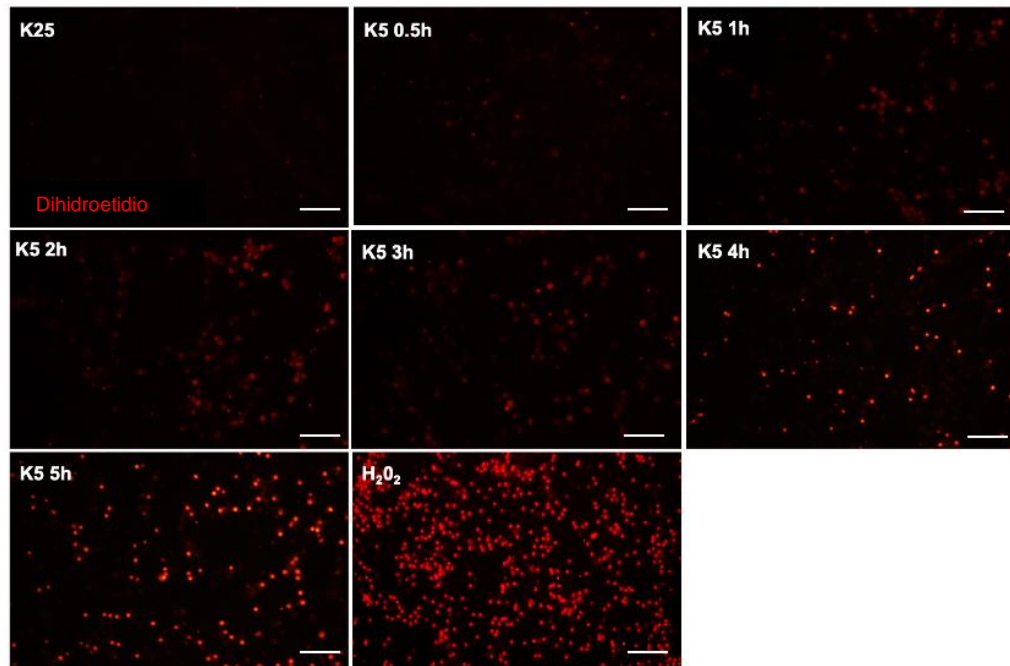
Figura 10. La viabilidad celular disminuye después de 18 o 24 h con el tratamiento de K5 o Sts. Se utilizaron NGC cultivadas por 7DIV con medio despolarizante K25mM. Se realizó un cambio de medio a K5 mM sin suero durante 6, 18 y 24h. (a) o tratamiento con estaurosporina 0.5 μ M en medio K25 por los mismos tiempos. (b) Se utilizaron calceína AM y yoduro de propidio, ambos se incubaron por 30 min a 37°C con 95% aire y 5% de CO₂. Las células fueron observadas en el microscopio de epifluorescencia con un filtro de 488 nm de longitud de onda y de 550 nm para determinar su viabilidad. Los datos son representados como porcentaje de células positivas a calceína o IP respecto al total (la suma de ambas marcas por condición). Se utilizó el programa Image J para la cuantificación manual de las fotografías. Las barras representan la media \pm el error estándar de 5 experimentos independientes. * $p < 0.033$, *** $p < 0.001$. Los datos fueron analizados con una ANOVA de una vía seguido de un test de comparación múltiple de Dunnett.

El tratamiento con K5 y Sts induce la generación temprana de ERO

Para determinar el efecto del bajo potasio y la estaurosporina en la formación de ERO, las NGC cultivadas en un medio K25 durante 7 DIV se transfirieron a medio K5 o se trataron con Sts durante 30 min, 1, 2, 3, 4 ó 5 h. Un grupo de células se trató con 100 μM de H_2O_2 durante 1 h, como control positivo. En el caso de las células tratadas con K5, encontramos incremento en las ERO desde las primeras horas posteriores al cambio de medio. La señal de las ERO, detectada por dihidroetidio que fluoresce a una longitud de onda de 590 nm, incrementó significativamente respecto al control a las 4 h y se mantuvo hasta las 5 h. El tratamiento con H_2O_2 indujo el incremento en la fluorescencia nuclear demostrando que este compuesto detecta de forma efectiva las especies reactivas de oxígeno como se describe en métodos (Figura 11). El tratamiento con estaurosporina 0.5 μM durante el mismo tiempo, mostró incremento significativo del contenido de ERO en comparación con K25 a partir de las 3 h y hasta las 5 h (Figura 12).

Estos datos muestran que existe una respuesta temprana al bajo potasio y a la estaurosporina que incrementa las ERO durante las primeras 3- 5h de tratamiento.

a



b

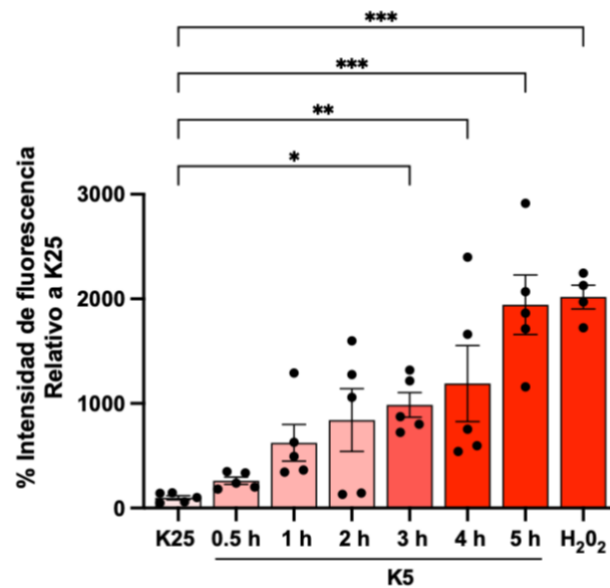
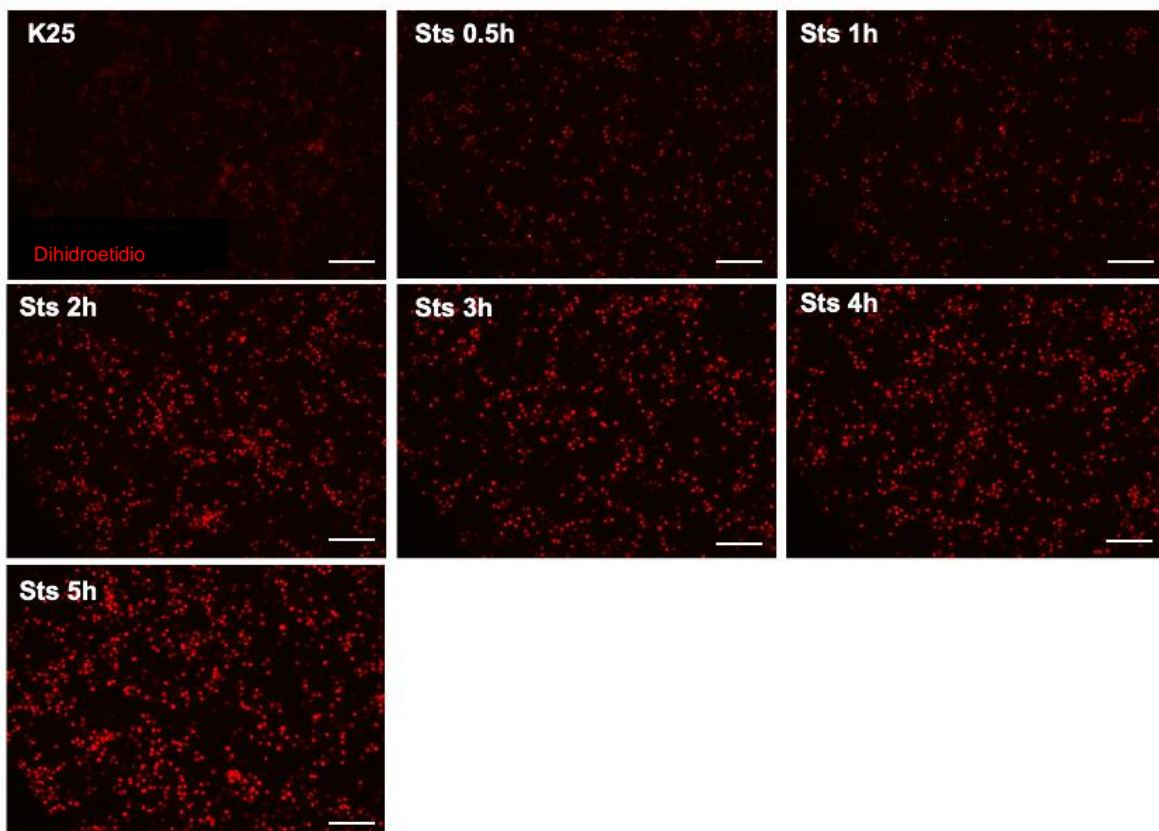


Figura 11. El tratamiento con K5 promueve la formación de ERO. Se evaluó la formación de especies reactivas de oxígeno mediante la técnica de la oxidación de dihidroetidio (DHE). La formación

El papel de las especies reactivas de oxígeno en la señalización de Txnip y sus efectos en la muerte neuronal

de ERO se expresó como intensidad de fluorescencia representado como porcentaje relativo a K25. a) Muestra las micrografías representativas de cada condición, b) cuantificación de intensidad de fluorescencia en las distintas condiciones. Las barras representan la media \pm el error estándar de 5 experimentos independientes llevados a cabo por duplicado. * $p < 0.033$, ** $p < 0.002$, *** $p < 0.001$. Los datos fueron analizados con una ANOVA de una vía seguido de un test de comparación múltiple de Dunnett. La línea en las micrografías representa 100 μm .

a



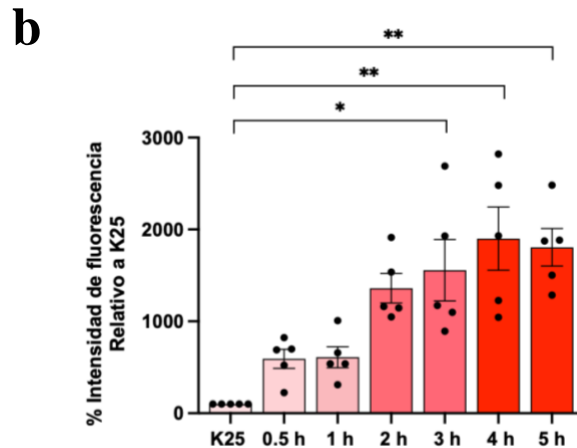


Figura 12. El tratamiento con estaurosporina 0.5 μ M promueve la formación de ERO. La formación de ERO se expresó como intensidad de fluorescencia representado como porcentaje relativo a K25. a) Muestra las micrografías representativas de cada condición, b) muestra la cuantificación de intensidad de fluorescencia en las distintas condiciones. Las barras representan la media \pm el error estándar de 5 experimentos independientes llevados a cabo por duplicado. * $p < 0.033$, ** $p < 0.002$, *** $p < 0.001$. Los datos fueron analizados con una ANOVA de una vía seguido de un test de comparación múltiple de Dunnett. La línea en las micrografías representa 100 μ m.

No hay muerte neuronal por el tratamiento con Sts, K5, H₂O₂ o por la inhibición de Akt durante las primeras 6 h

Para determinar si el incremento en las ERO tiene un efecto inmediato en la viabilidad celular, se realizó un ensayo de calceína - yoduro de propidio a las 4 h, 5 h y 6 h posteriores al cambio de medio. Bajo estas condiciones, no se observaron cambios significativos en la viabilidad celular. Se realizaron pruebas de viabilidad con los tratamientos H₂O₂ 100 μ M ó 200 μ M por 1 h o la inhibición de Akt con el fármaco LY294002 por 4h (30- 50 μ M). Los resultados muestran que no hay cambios en la viabilidad celular durante el periodo de los tratamientos.

Estos datos junto con los observados en la figura 10 demuestran que la muerte inducida por K5 y Sts ocurre en una ventana temporal amplia como se había reportado previamente (Zaragoza- Campillo y Morán, 2017) y que la concentración alta de peróxido o la

inhibición farmacológica de Akt no afectan la viabilidad celular durante las primeras horas de tratamiento (Figura 13) demostrando que el proceso de muerte es gradual y no es una respuesta aguda al estímulo de bajo potasio.

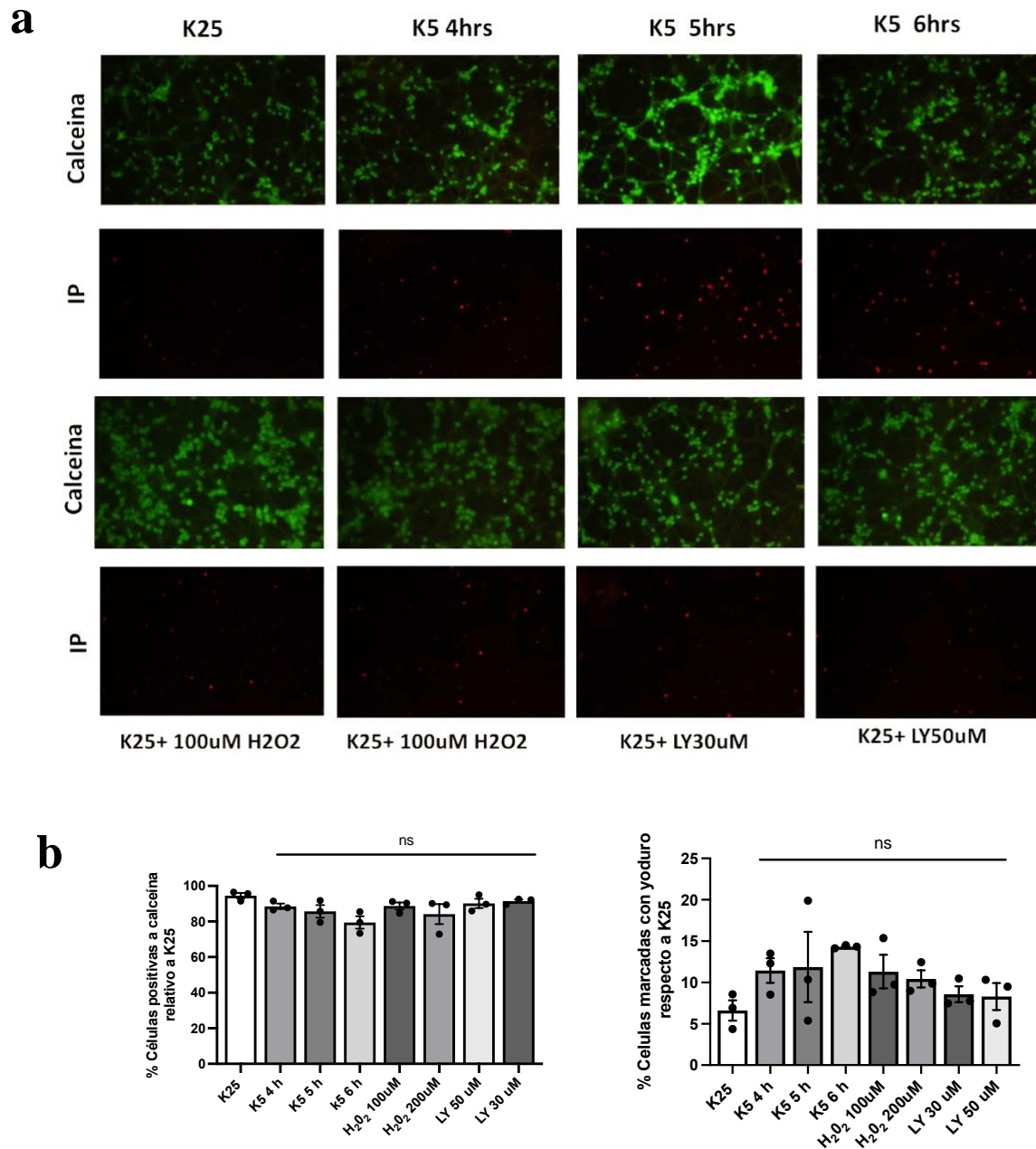


Figura 13. K5, H₂O₂ y la inhibición de Akt no afectan la viabilidad celular en corto tiempo. Se utilizó calceína-AM y yoduro de propidio como marcadores de viabilidad y muerte celular como se describió en el apartado de métodos. Cada compuesto se incubó por 15 minutos. Se realizó el cambio

El papel de las especies reactivas de oxígeno en la señalización de Txnip y sus efectos en la muerte neuronal

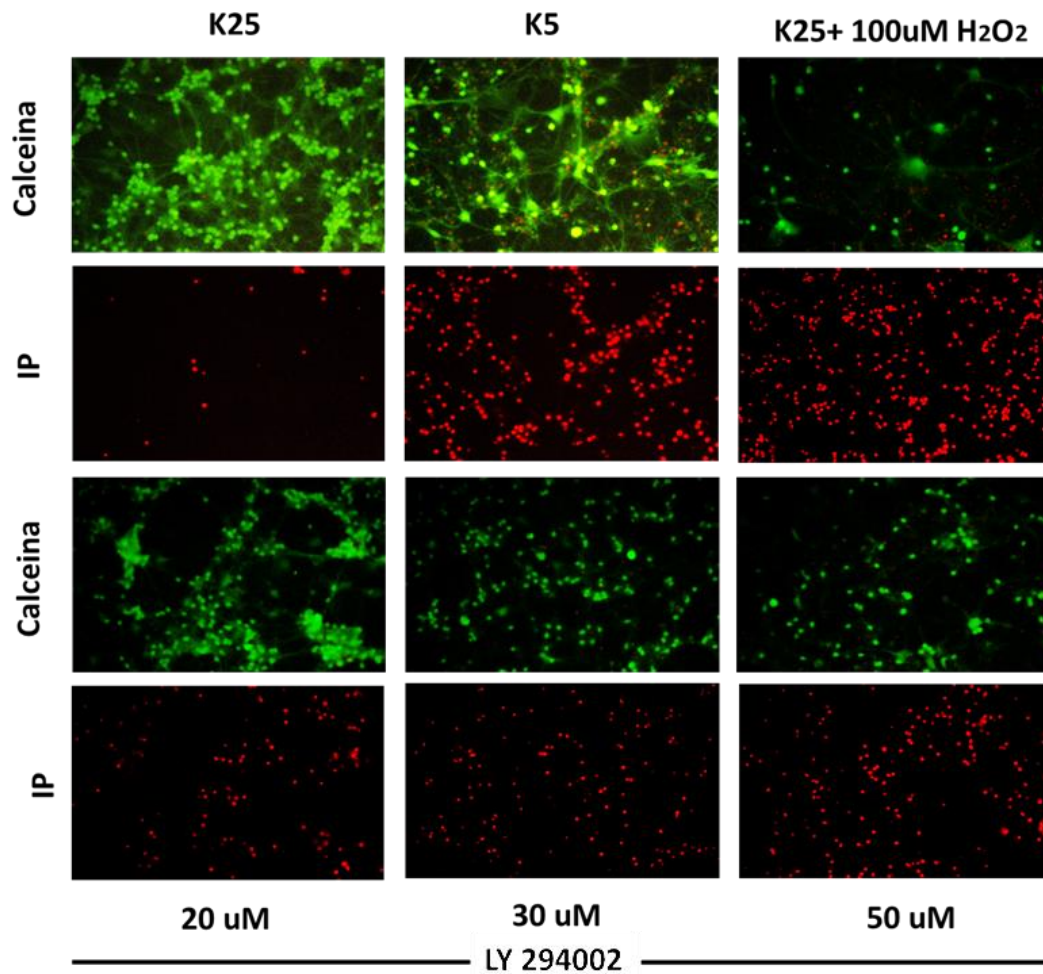
de medio KCl 5mM (K5) durante 4, 5 y 6 h. El tratamiento con peróxido de hidrógeno (100 y 200 μ M, final) fue durante 1 h. El tratamiento con LY294002 se realizó durante 4 h (30 μ M y 50 μ M). a) Muestra las micrografías representativas de cada condición con ambos marcadores b) muestra la cuantificación de los datos. Los datos se expresan en porcentaje de células positivas a calceína o IP relativo a la suma de ambos que se consideró como 100%. Las barras representan la media \pm el error estándar de 3 experimentos independientes. Los datos fueron analizados con una ANOVA de una vía seguido de un test de comparación múltiple de Dunnett.

El peróxido de hidrógeno y la inhibición de la vía PI3K/Akt inducen muerte neuronal a las 24h de tratamiento

Para determinar el efecto del tratamiento prolongado con peróxido de hidrógeno o la inhibición de Akt sobre la viabilidad después de 24 h, se trató a las NGC en medio K25 con peróxido de hidrógeno (100 ó 200 μ M) o con LY294002 (20, 30 ó 50 μ M) por 24h. Los resultados muestran que la muerte neuronal ocurre 24 h después del estímulo e incrementa de acuerdo a la dosis utilizada con ambos tratamientos (Figura 14).

a

El papel de las especies reactivas de oxígeno en la señalización de Txnip y sus efectos en la muerte neuronal



b

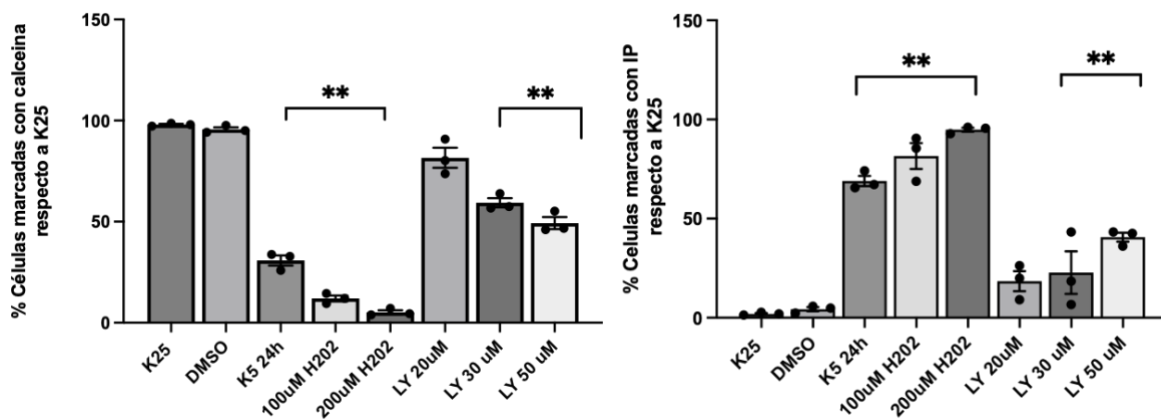


Figura 14. K5, H₂O₂ y la inhibición de Akt reducen la viabilidad celular a las 24 h dependiente a la dosis. El cambio de medio K5mM, el tratamiento con peróxido de hidrógeno (100μM y 200μM) y

El papel de las especies reactivas de oxígeno en la señalización de Txnip y sus efectos en la muerte neuronal

con LY294002 (20, 30 y 50 μM) se realizaron por 24 h. Se utilizó DMSO como solvente control de LY294002. Los tratamientos con peróxido de hidrógeno y LY294002 se realizaron en medio despolarizante K25. a) Muestra las micrografías representativas para cada condición, b) Muestra la cuantificación de los datos. Los datos se expresan en porcentaje de células positivas, en ambos casos, relativo a la suma de ambos marcajes en K25. Las barras representan la media \pm el error estándar de 3 experimentos independientes. Los datos fueron analizados con una ANOVA de una vía seguido de un test de comparación múltiple de Dunnett. * $p < 0.033$, ** $p < 0.002$, *** $p < 0.001$.

El tratamiento con bajo potasio, estaurosporina o peróxido de hidrógeno durante 1- 4 horas es suficiente para inducir la muerte neuronal a las 24h

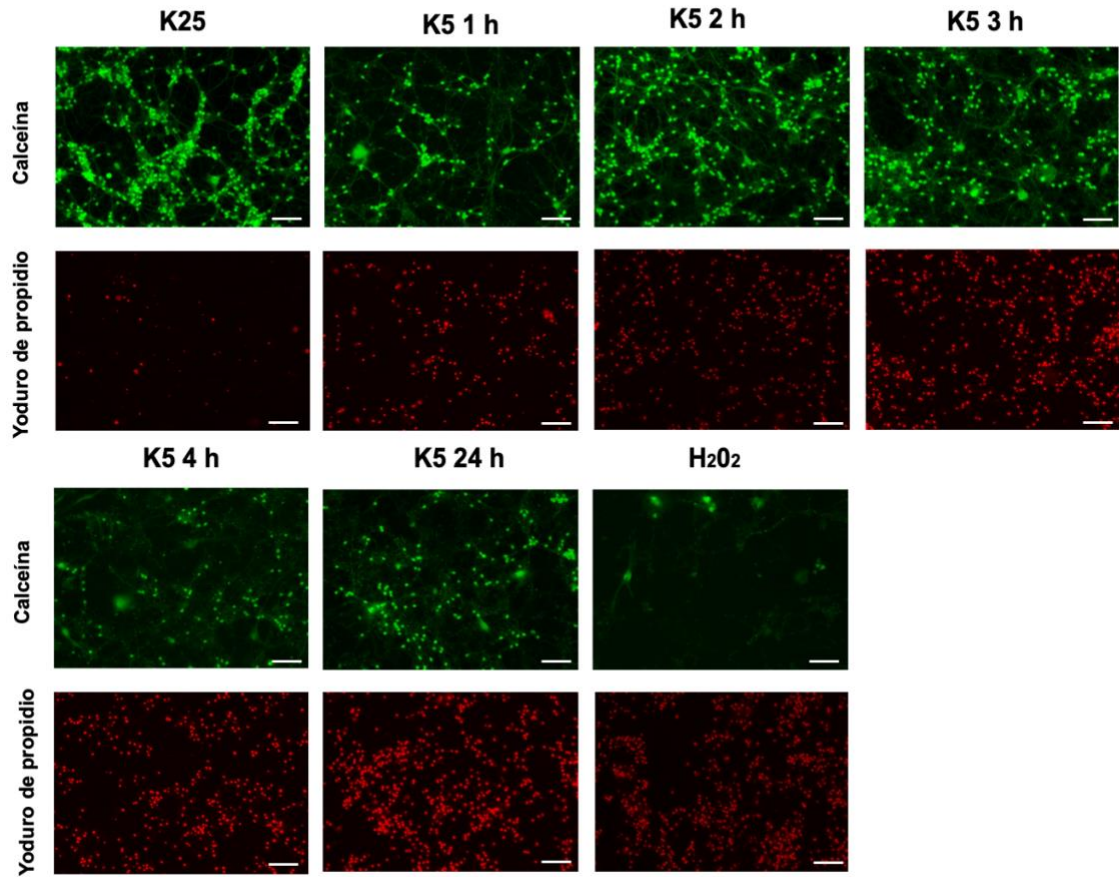
El bajo potasio incrementa las ERO en las primeras horas 4- 6 h del cambio de medio (Figura 11) pero no se genera daño neuronal evidente a esos tiempos (Figura 13). El estímulo continuo por 24 h con K5 tiene efectos significativos en la inducción de la muerte neuronal (Figura 14). Para establecer el tiempo mínimo requerido para que la célula comprometa su viabilidad (Fase de compromiso), se realizaron ensayos de viabilidad con calceína y con IP con tratamientos con K5 o Sts por 1, 2, 3 y 4 h o con H_2O_2 (100 μM 1h). Después de este tiempo las neuronas se cambiaron a medio despolarizante K25 condicionado (medio de mantenimiento de neuronas hermanas en cultivo) y se evaluó la viabilidad a las 24 h. Debido a que las NGC son sensibles a la manipulación del medio, el control K25 son neuronas que también sufrieron cambio de medio K25 a K25 condicionado.

Los resultados obtenidos muestran que mantener a las células con bajo potasio (1-4 h), con estaurosporina (1-4 h) o H_2O_2 100 μM por 1h es suficiente para inducir la muerte neuronal de manera similar al tratamiento con estas mismas condiciones por 24h. Estos datos sugieren que la señalización que activa la muerte ocurre en esta ventana temporal de 1-4 h, aunque se

El papel de las especies reactivas de oxígeno en la señalización de Txnip y sus efectos en la muerte neuronal

ejecute de manera gradual induciendo la muerte 24 h después.

a



b

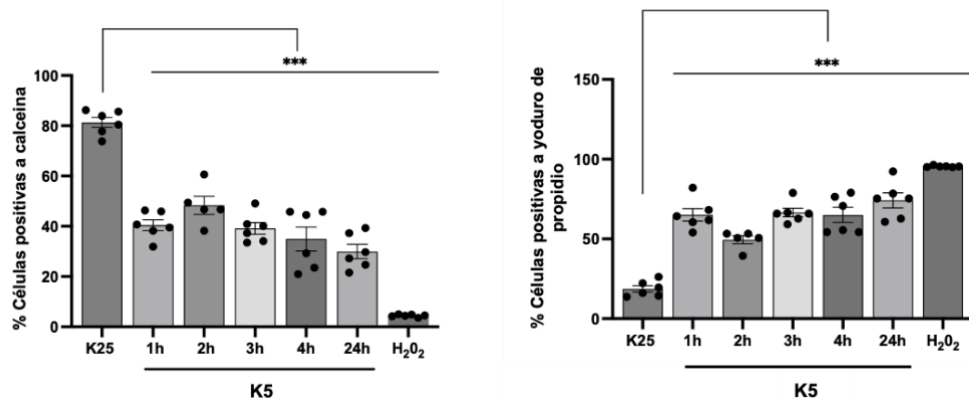


Figura 15. Las NGC mueren al realizar el estímulo con bajo potasio desde las primeras 1-4 h tal como ocurre al mantener el estímulo por 24h. El cambio de medio K5 mM se realizó por 1, 2, 3, 4 y 24 h; el tratamiento con peróxido de hidrógeno (100 μ M) se realizó por 1 h . Los tratamientos se realizaron por 1- 4 h y posteriormente fueron retirados, las células se cambiaron nuevamente a medio K25. Debido a que las NGC son sensibles a la manipulación del medio, se utilizó como control el medio condicionado K25 de neuronas de la misma edad. El control K25 son neuronas que sufrieron cambio de medio K25 a K25 condicionado. A) En el panel se muestran las micrografías representativas de cada condición, las imágenes fueron tomadas en microscopio de epifluorescencia con el objetivo 20X. b) Muestra la cuantificación de los datos en todas las condiciones. Los datos se expresan en porcentaje de células positivas, en ambos casos, relativo a la suma de ambos marcajes con calceína y yoduro de propidio por condición. Las barras representan la media \pm el error estándar de 6 experimentos independientes llevados a cabo por duplicado. Los datos fueron analizados con una ANOVA de una vía seguido de un test de comparación múltiple de Dunnett. * $p < 0.033$, ** $p < 0.002$, *** $p < 0.001$. La línea en las micrografías representa 100 μ m.

El papel de las especies reactivas de oxígeno en la señalización de Txnip y sus efectos en la muerte neuronal

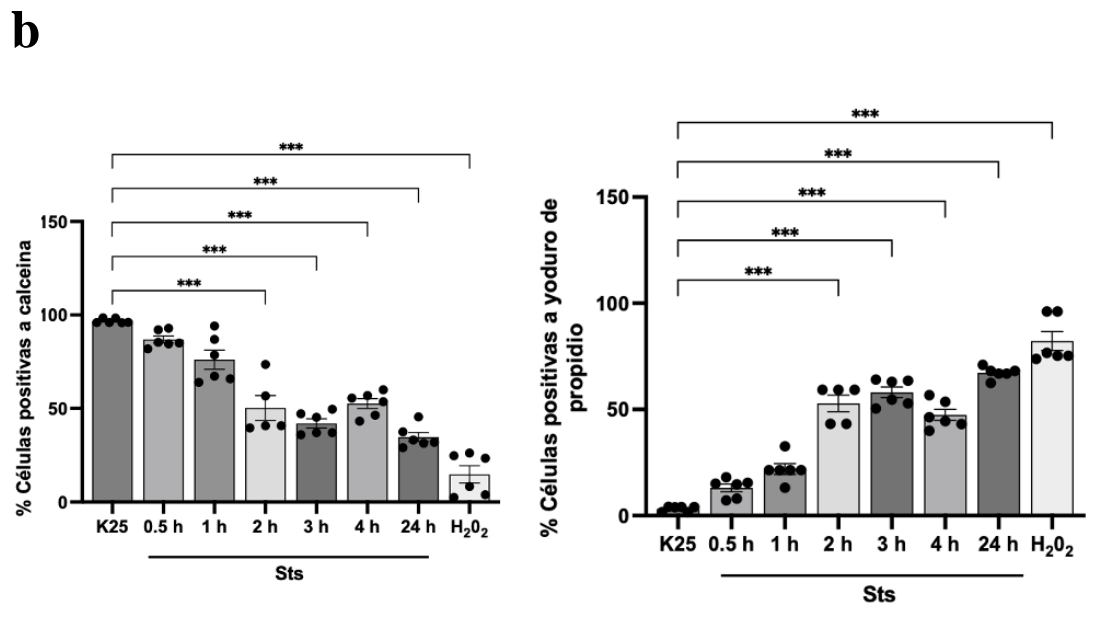
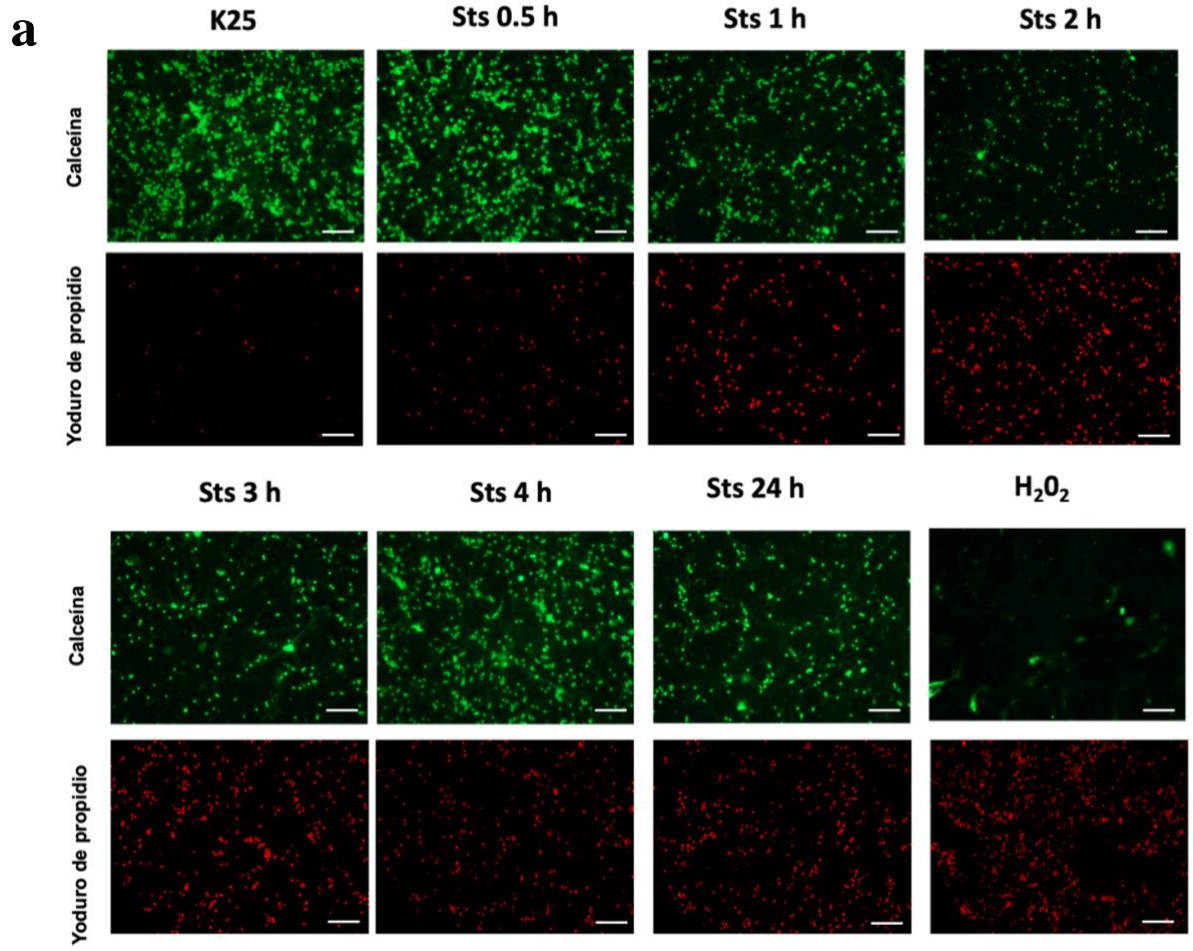
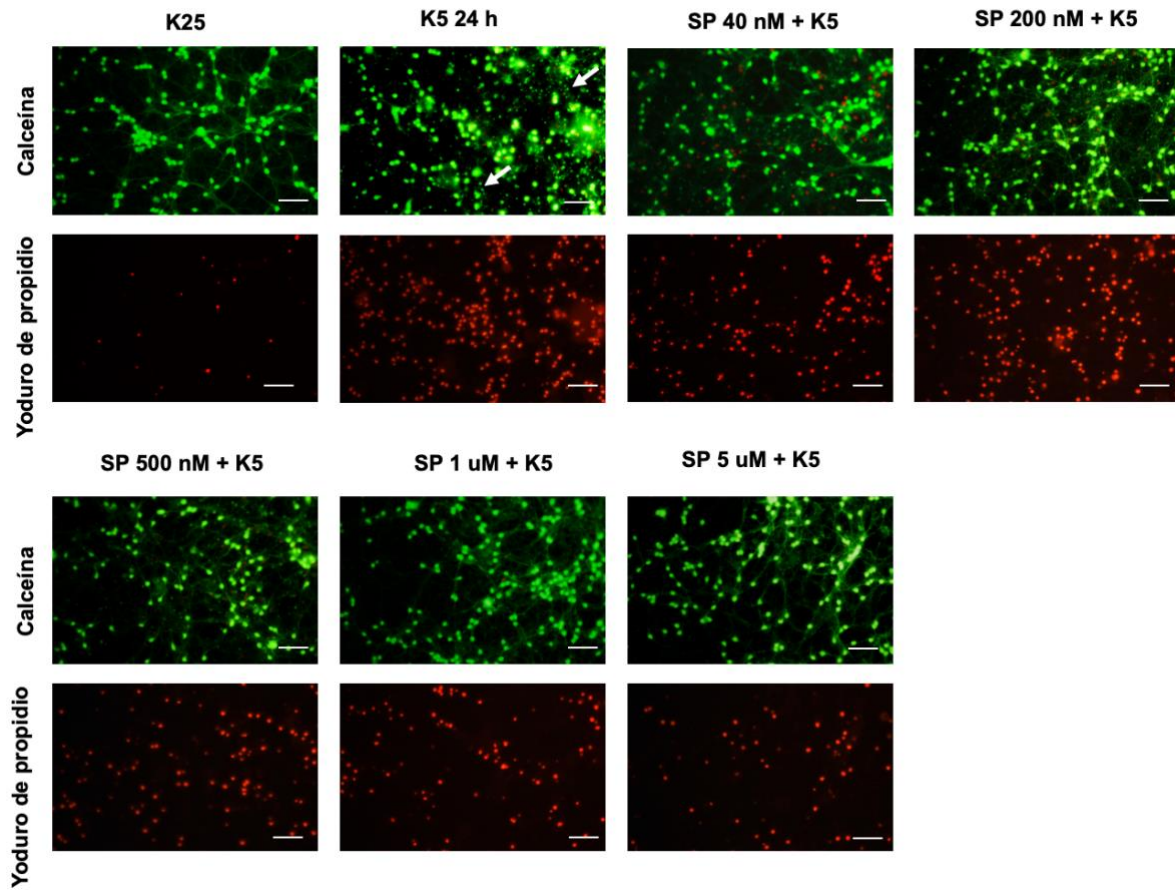


Figura 16. Las NGC mueren al realizar el estímulo con estaurosporina desde las primeras 2 - 4 h tal como ocurre al mantener el estímulo por 24 h. El tratamiento con estaurosporina se realizó por 30min, 1, 2, 3 y 24h. a) En el panel se muestran las micrografías representativas de cada condición, las imágenes fueron tomadas en microscopio de epifluorescencia con el objetivo 20X. Los tratamientos fueron retirados a las horas indicadas y las células se cambiaron a medio K25 condicionado. b) Muestra la cuantificación de los datos todas las condiciones. Las barras representan la media \pm el error estándar de 6 experimentos independientes llevados a cabo por duplicado. Los datos fueron analizados con una ANOVA de una vía seguido de un test de comparación múltiple de Dunnett. $*p < 0.033$, $**p < 0.002$, $***p < 0.001$. La línea en las micrografías representa 100 μm .

JNK participa en la muerte por bajo potasio en las NGC

Se analizó la participación de JNK en la muerte por bajo potasio en las NGC. Se utilizó el fármaco SP600125 (Abcam), un inhibidor selectivo de las cinasas JNK 1/2/3. Como parte de nuestra hipótesis y tomando en cuenta los datos publicados previamente por (Ramiro-Cortés y Morán, 2009) la activación de esta vía es necesaria para la muerte de las NGC. Se realizaron curvas de dosis respuesta con diferentes concentraciones del inhibidor en medio K5. La cuantificación de la viabilidad por calceína y yoduro de propidio a las 24 h mostró que la actividad de esta cinasa conduce a la muerte de las NGC. El tratamiento con 500 nM del inhibidor SP600125 reduce significativamente la muerte y la concentración de 5 μ M del inhibidor tiene el efecto más importante sobre la viabilidad con 80% de células positivas a calceína en comparación con la condición de K5 24 h en la cual se observa 25% de neuronas vivas (Figura 17).

a



b

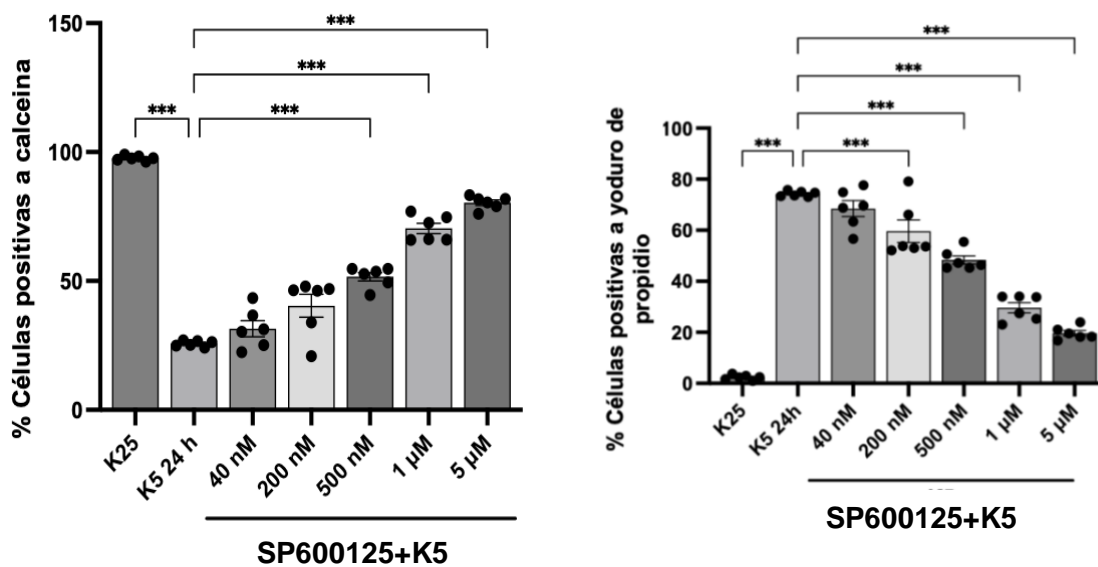


Figura 17. La inhibición de la vía JNK reduce la muerte neuronal inducida por K5. Se realizaron ensayos de viabilidad con calceína y yoduro de propidio con K25, K5 24 h y K5 + SP600125 24 h. El inhibidor se utilizó como co-tratamiento (40nM- 5µM) con el cambio de medio a K5. En el panel se muestran las micrografías representativas de cada condición. a) las imágenes fueron tomadas en microscopio de epifluorescencia con el objetivo 20X. b) Muestra la cuantificación de los datos todas las condiciones. Las barras representan la media \pm el error estándar de 6 experimentos independientes llevados a cabo por duplicado. Los datos fueron analizados con una ANOVA de una vía seguido de un test de comparación múltiple de Dunnett. * $p < 0.033$, ** $p < 0.002$, *** $p < 0.001$. La línea en las micrografías representa 50 µm.

K5, Sts, el peróxido de hidrógeno y la inhibición de Akt inducen la expresión de Txnip

Parte de la hipótesis propuesta es que el incremento de TXNIP encontrado en NGC tratadas con Sts o K5 (Zaragoza- Campillo y Morán, 2017) se lleva a cabo mediante la transcripción del gen. Para abordar esto, se realizó una RT-qPCR de *Txnip*. Se encontró que el mensajero incrementa de significativamente 26 y 23 veces con K5 durante las primeras 2 y 3h respectivamente (Figura 18 a), la estimulación con Sts 0.5 µM también incrementa los niveles de mensajero por 12 veces a partir de las 3h y se mantiene en valores similares hasta las 5h (Figura 18 b). El tratamiento con peróxido de hidrógeno 100 µM durante 1h induce 5 veces el incremento del mensajero en comparación con la condición K25. El tratamiento con LY294002 100 µM, inhibidor indirecto de la cinasa Akt, incrementa la expresión de *Txnip* 8 veces. (Figura 18 c).

Dado que el porcentaje de TXNIP inducido por H₂O₂ 100 µM a 1 h reportado por Zaragoza-Campillo y Morán, 2017 es de 500% en comparación con la condición K25, resultó inesperado que los niveles de mensajero en la misma condición no reflejaran un incremento similar al observado en la proteína, por ello, se realizó un curso temporal con el mismo estímulo durante 10, 20, 30, 40, 50 y 60 min, suponiendo que el mRNA puede ser regulado rápidamente durante los primeros minutos. Se encontró que, el peróxido de hidrógeno induce la expresión de *Txnip* desde los 10 y 20 min. Posteriormente los niveles de mRNA se mantienen 5 veces por arriba de los niveles en K25 (Figura 18 d).

En conjunto, estos datos sugieren que K5 y Sts inducen la expresión de *Txnip* desde las 2 y 3h en el caso de K5 y 3-5 h con Sts. La expresión también es promovida por peróxido de hidrógeno durante los primeros minutos, lo que sugiere una relación entre la expresión del gen y las concentraciones de ERO en la célula. Además, los resultados con el tratamiento con LY muestran que la expresión de *Txnip* es inducida por la inactivación de Akt.

Expresión de *Txnip*

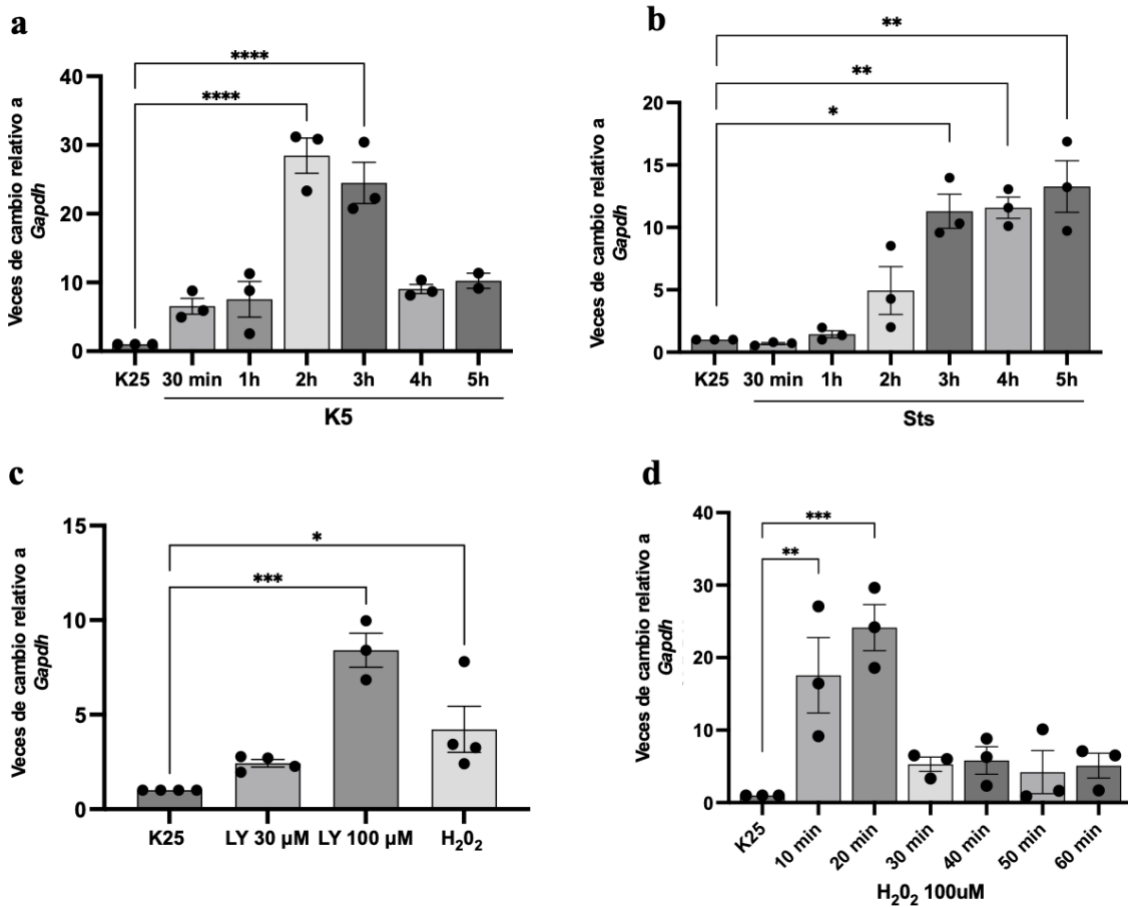


Figura 18. La expresión de *Txnip* es inducida por K5, Sts, H₂O₂ y la inhibición de Akt. Datos relativos a las veces de cambio del mensajero de *Txnip* ajustado con *Gapdh* y normalizados respecto a K25. Las muestras se obtuvieron de cultivos de NGC de 7DIV tratadas con K5 (a) por 0.5 h- 5h, con Sts (b) 0.5 h – 5 h, con H₂O₂ 100 μM 1h y LY294002 30 μM, 100 μM por 4h (c) o con un curso temporal de H₂O₂ 100 μM por 10,20,30,40,50 y 60 min (d) . Las barras representan la media ± el error estándar

El papel de las especies reactivas de oxígeno en la señalización de Txnip y sus efectos en la muerte neuronal

de 3 experimentos. Los datos fueron analizados con una ANOVA de una vía seguido de un test de comparación múltiple de Dunnett. * $p < 0.033$, ** $p < 0.002$, *** $p < 0.001$ comparado contra K25.

Evaluación de los motivos FOXO 1 y FOXO 3 en el promotor de Txnip

El promotor de *Txnip* comparte motivos en común para diferentes factores de transcripción, incluyendo FOXO (Baker *et al.*, 2008; Tsubaki *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2006), cuya actividad transcripcional depende de la inactivación de Akt. Un trabajo previo mostró que FOXO 1 y FOXO 3 se unen al promotor de *Txnip* en neuronas corticales (Papadia *et al.* 2013). Además, en progenitores neurales, FOXO 3 se encuentra enriquecido en el promotor de *Txnip* (Webb *et al.* 2013). Esto sugiere que, en nuestro modelo, FOXO puede estar regulando la expresión del gen.

Para evaluar lo anterior, se realizó el análisis del promotor de *Txnip*. Para delimitar el promotor se utilizó la secuencia de *Txnip* para rata, y la base de datos de libre acceso Eukaryotic Promoter Database (<https://epd.epfl.ch//index.php>) El promotor se encuentra 5kb río arriba del sitio de inicio de la transcripción. Se utilizó la base de datos JASPAR (<https://jaspar.genereg.net>) para obtener los motivos de interacción de FOXO 1, 3, 4 y 6.

De acuerdo a lo anterior, encontramos que dentro de la región que comprende 1kb río arriba se encuentran dos motivos conservados, uno próximo al gen que es considerado en motivo canónico de los factores FOXO 1/3 y un segundo motivo localizado río arriba del anterior que es considerado un motivo exclusivo para FOXO 1 (Figura 19). Además, encontramos que ambos motivos se encuentran conservados en humano, ratón y rata, lo que robustece la idea de que puedan estar participando en la regulación del gen.

El papel de las especies reactivas de oxígeno en la señalización de Txnip y sus efectos en la muerte neuronal

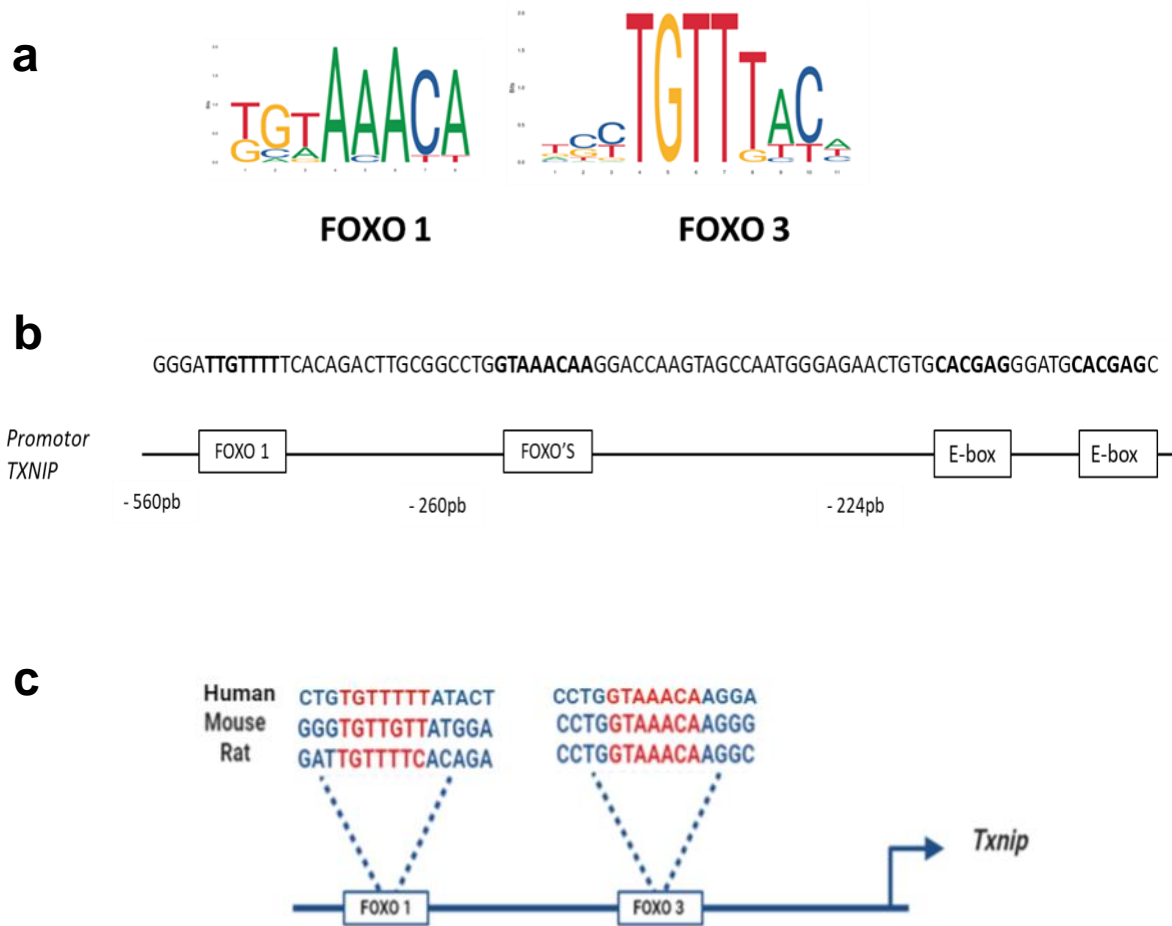


Figura 19. El promotor de *Txnip* contiene sitios de interacción con FOXO 1 y FOXO 3. a) En rojo se muestran los motivos para FOXO 3/1 y FOXO 1 conservados dentro de la región promotora del gen de acuerdo con la base de datos Eukaryotic Promoter Database. Los motivos buscados se encuentran en el panel a y son los reportados por la base de datos JASPAR. Estos motivos fueron obtenidos con Chip seq de distintos tipos celulares. b) Muestra la secuencia del promotor de *Txnip* en rata y los motivos de FOXO. c) Los motivos localizados en el promotor de *Txnip* se encuentran conservados en ratón y humano.

K5 y Sts promueven la traslocación de FOXO 3 al núcleo.

En la literatura está bien descrito que en varios modelos la fosforilación de FOXO por Akt promueve la inhibición del factor. Akt induce la interacción con la proteína 14-3-3 y la salida del núcleo o reclutamiento de FOXO en el citoplasma (Kloet *et al.* 2011). Aún existe evidencia contradictoria sobre el espacio subcelular donde se lleva a cabo la fosforilación, algunos trabajos mencionan que es en el núcleo y que esto promueve la salida de FOXO (Daitoku *et al.* 2011), mientras que otros afirman que es en el citoplasma e impide la traslocación de FOXO al núcleo (Tzivion *et al.* 2011), Independiente de esta discusión, se sabe que la regulación es directa porque los factores FOXO cuentan con motivos específicos de fosforilación por Akt (Tzivion *et al.* 2011).

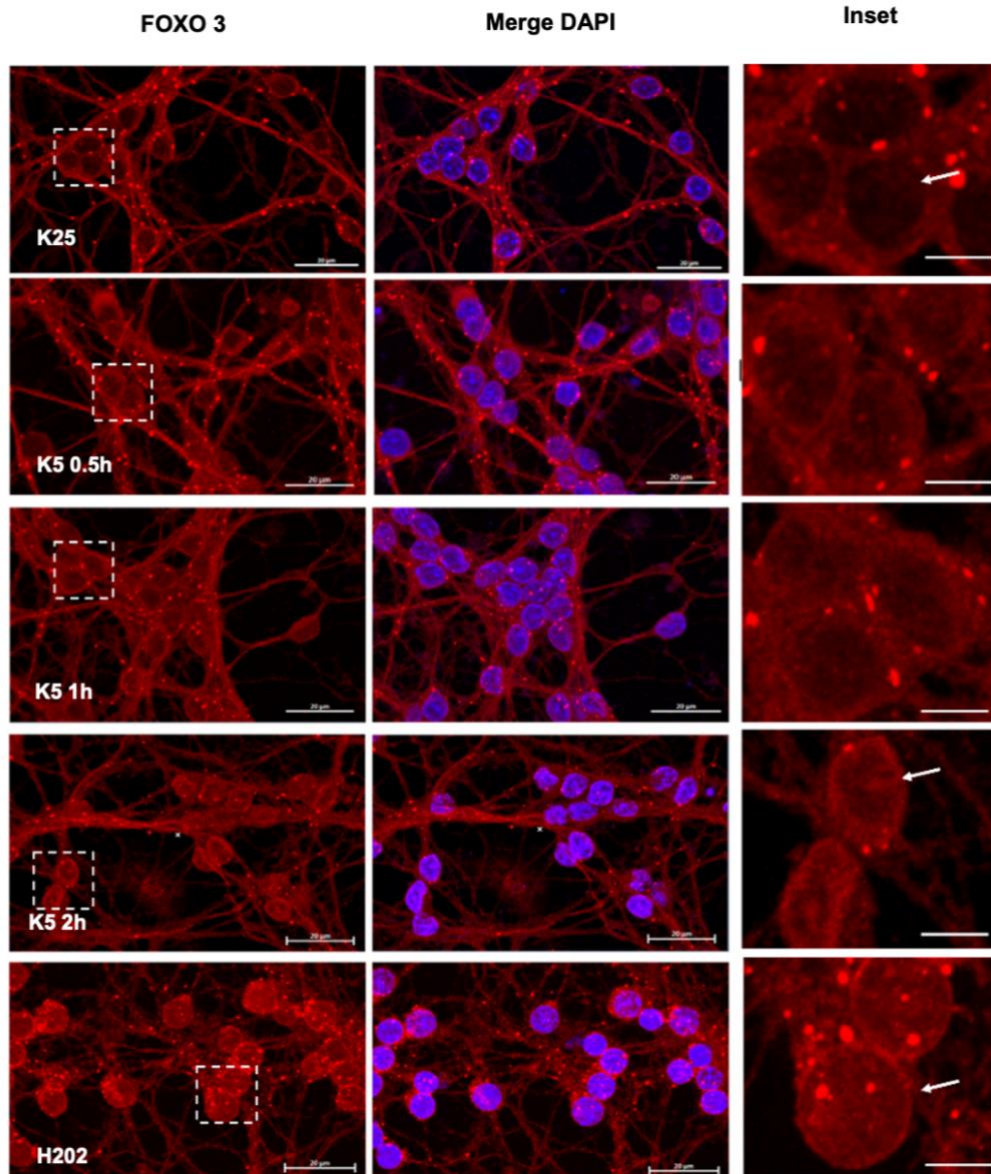
Para determinar el efecto de K5 y Sts en la localización intracelular de FOXO, se realizó una inmunofluorescencia en NGC en condiciones de K25, K5 30 min, 1 ó 2 h y Sts por 30 min, 1, 2 y 3 h. Se utilizó en anticuerpo FOXO3 (D19A7). Para analizar la colocalización se utilizó la marca emitida por el anticuerpo secundario Alexa 488 y la tinción nuclear con DAPI. Las micrografías fueron analizadas con el plugin JaCOP de Image J para determinar el coeficiente de correlación de Pearson de ambas señales. Como se ha reportado en trabajos previos (Papadia *et al.*, 2017) la distribución de FOXO 3 en condiciones basales se encuentra en el citoplasma mayoritariamente. De forma interesante también encontramos puntos de localización que parecen diferir de la localización citoplasmática podrían reflejar la distribución mitocondrial de FOXO 3 previamente reportada por Tseng *et al.*, 2013 en condiciones de estrés. Los resultados obtenidos muestran que en K5 2h, la localización de FOXO 3 incrementa en el núcleo en comparación con K25 y muestra un mayor coeficiente de correlación con la señal nuclear DAPI 0.4 vs 0.2 (Figura 20 a). Estos datos correlacionan con los observados en el incremento de los niveles de mRNA con K5 a las 2h y 3h (Figura 18 a).

El tratamiento con Sts incrementa la localización de FOXO 3 en el núcleo 3 h después del estímulo, igualmente, estos datos correlacionan con el incremento del mensajero (Figura 18 b). Por otra parte, los tratamientos con H₂O₂ 100 µM 1h y LY294002 4h también

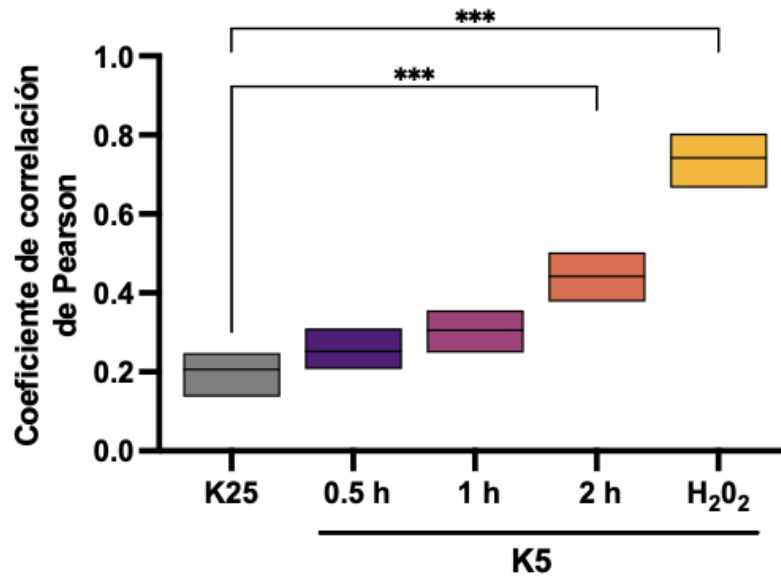
El papel de las especies reactivas de oxígeno en la señalización de Txnip y sus efectos en la muerte neuronal

aumentan la señal nuclear de FOXO 3. Estos datos muestran que la traslocación de FOXO 3 del citoplasma al núcleo es promovida en K5 y Sts y que las ERO y la inhibición de Akt participan en el proceso.

a

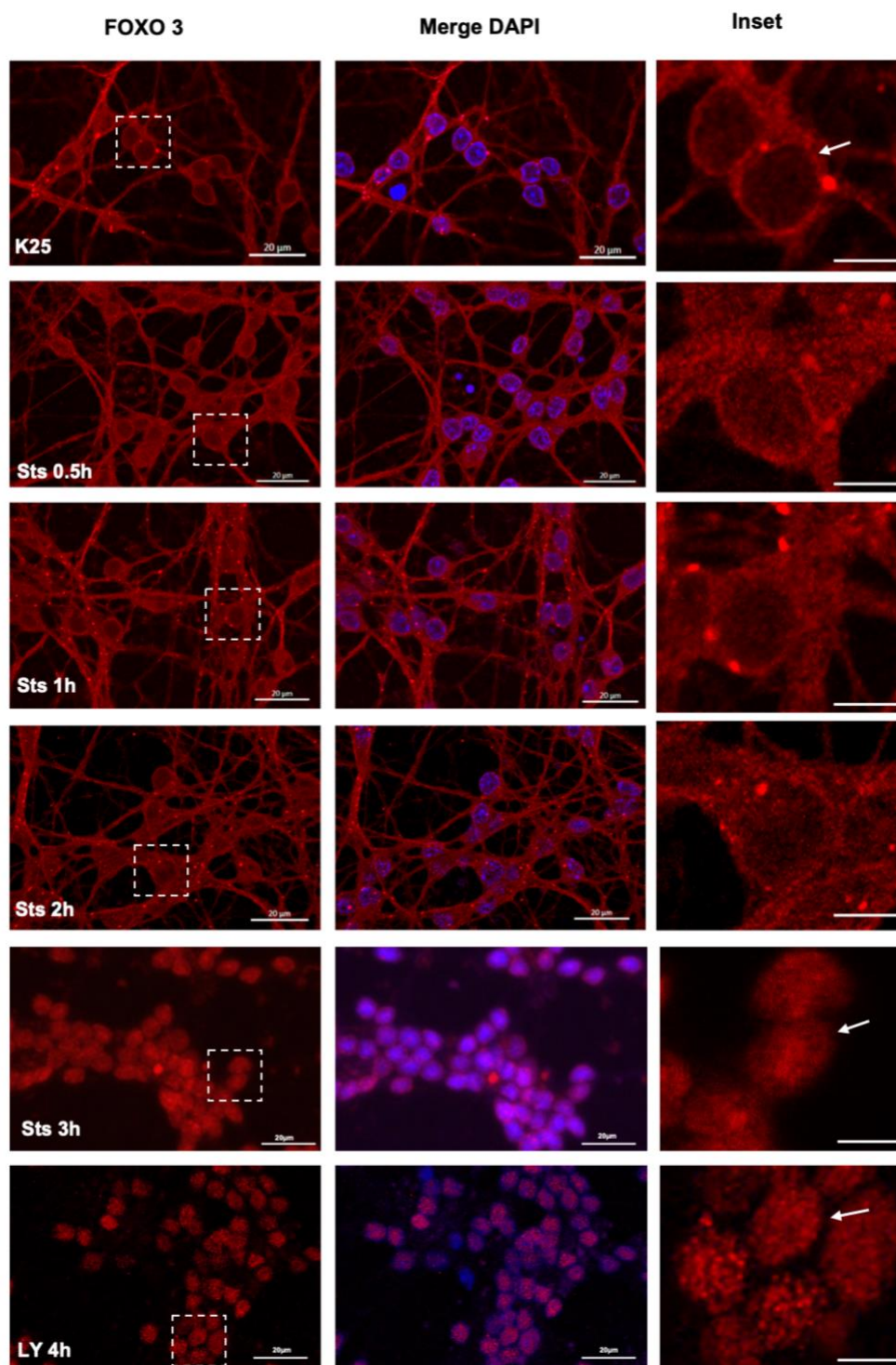


Colocalización DAPI y FOXO3



El papel de las especies reactivas de oxígeno en la señalización de Txnip y sus efectos en la muerte neuronal

b



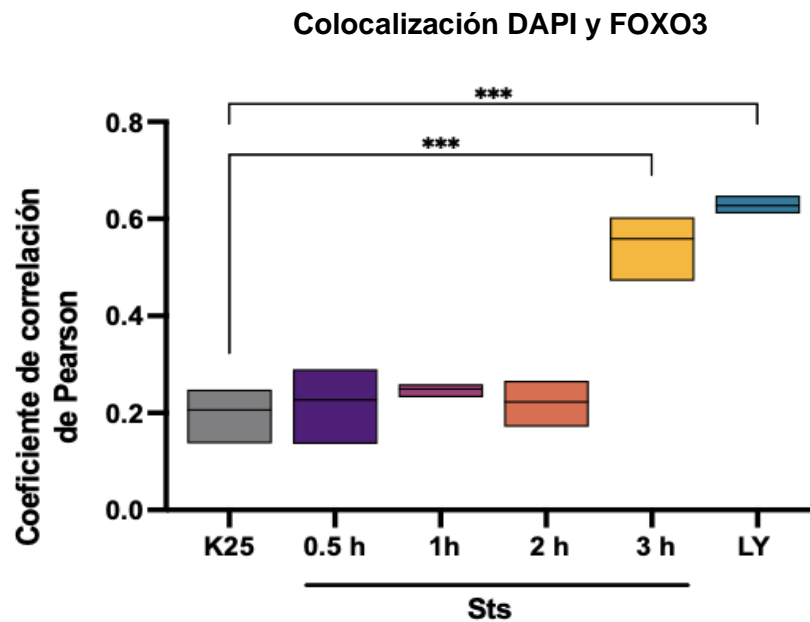


Figura 20. FOXO 3 transloca al núcleo en respuesta a K5 y Sts. Ensayo de inmunofluorescencia en neuronas granulares de cerebelo. En azul se encuentra la marca de DAPI, en rojo pseudocolor de la señal de FOXO 3. El panel de la derecha es una ampliificación de que corresponde a las líneas punteadas de las micrografías de la izquierda. Los estímulos con K5 (a) y Sts (b) se realizaron a los 30 min, 1 h y 2 h. El estímulo con peróxido de hidrogeno se colocó por 1h a 100 μ M 1h (a). El estímulo con LY se realizó por 4h em médio K25 (b). Las imágenes se tomaron en microscopio confocal a 40X, la barra de los dos primeros páneles representa 20 μ m, mientras que la del panel derecho representa 10 μ m de escala. Las flechas blancas muestran el enriquecimiento de la señal de FOXO 3 al interior del nucleo. La grafica muestra el coeficiente de correlación de Pearson de 3 experimentos independientes para cada condicion, la linea media muestra el promedio \pm el error estandar. Los datos fueron analizados con una ANOVA de una vía seguido de un test de comparación múltiple de Dunnett. $*p < 0.033$, $**p < 0.002$, $***p < 0.001$ comparado contra K25.

FOXO 1 y FOXO 3 en ratón

Debido a que los motivos de FOXO se encuentran conservados en ratón, rata y humano y dado que TXNIP tiene un alto grado de homología entre estas especies, decidimos evaluar mediante inmunoprecipitación de cromatina la interacción directa de FOXO con el promotor de *Txnip* en los diferentes motivos en un modelo de ratones C57BL/6. En NGC de ratón, K5 y peróxido de hidrógeno inducen la expresión de *Txnip*, como se observó en rata (Figura 21 b). Además, se hizo una validación de la eficiencia de los anticuerpos mediante inmunofluorescencia mostrando la localización de ambos factores en las NGC (Figura 21 a).. Con esto, se estandarizaron las condiciones de sonicación de la cromatina para llevar a cabo en ensayo (Figura 21 c).

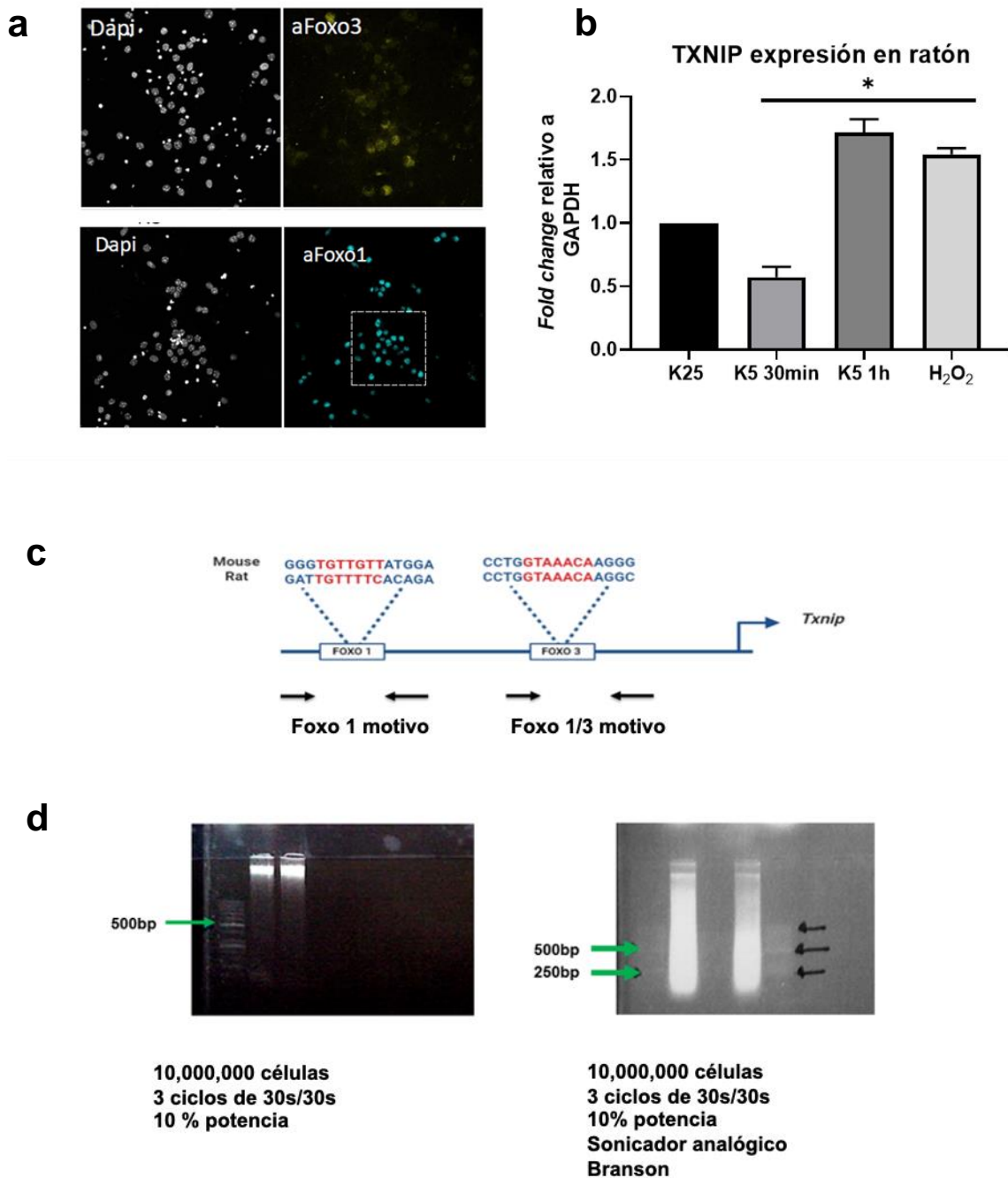


Figura 21. FOXO 1 y FOXO 3 en ratón. FOXO 1 y 3 se expresan en NGC de ratón. En blanco se encuentra la marca de DAPI, en amarillo FOXO3 y en cian FOXO 1 en NGC de ratón mantenidas en K25 por 7DIV (panel a). En este modelo, el K5 y H₂O₂ inducen la expresión de *Txnip* como se observa en NGC de rata. Los datos relativos al *fold change* del mensajero de *Txnip* fueron ajustados con GAPDH y

El papel de las especies reactivas de oxígeno en la señalización de Txnip y sus efectos en la muerte neuronal

normalizados respecto a K25. Las muestras se obtuvieron de cultivos de NGC de ratón 7DIV tratadas con K5 por 30min, 1h y con H₂O₂ 100 µM 1 h (panel b). Los motivos encontrados en el promotor de *Txnip* están conservados en ratón las flechas negras indican los *primers* diseñados para el análisis del ChIP (Panel c). La fragmentación de la cromatina se estandarizó utilizando diferentes ciclos con tiempo variable hasta obtener fragmentos de alrededor de 200 nucleótidos (Panel d).

FOXO 3 regula la expresión de Txnip en la condición de bajo potasio mediante la interacción con el motivo cercano al promotor

Para evaluar la participación de FOXO en la expresión de *Txnip* se analizó la interacción de FOXO 1 y 3 mediante un ensayo de ChIP tomando en cuenta los motivos previamente descritos. No se encontró interacción específica entre FOXO1 y el promotor de *Txnip* (datos no mostrados). Respecto a FOXO3, el tratamiento de K5 por 1h induce el posicionamiento en el promotor de *Txnip* (Figura 22). Además, se encontró que la interacción se lleva a cabo en el motivo 1/3, el más cercano al cuerpo del gen (Figura 22). De forma interesante, el tratamiento con peróxido de hidrogeno por 1h parece no inducir enriquecimiento significativo de FOXO3 en esta región, sin embargo, consideramos que este resultado puede deberse a que en ese tiempo FOXO 3 ya no está posicionado en el promotor porque la transcripción del mRNA ocurre en los primeros 10 y 20 min (Figura 18 d).

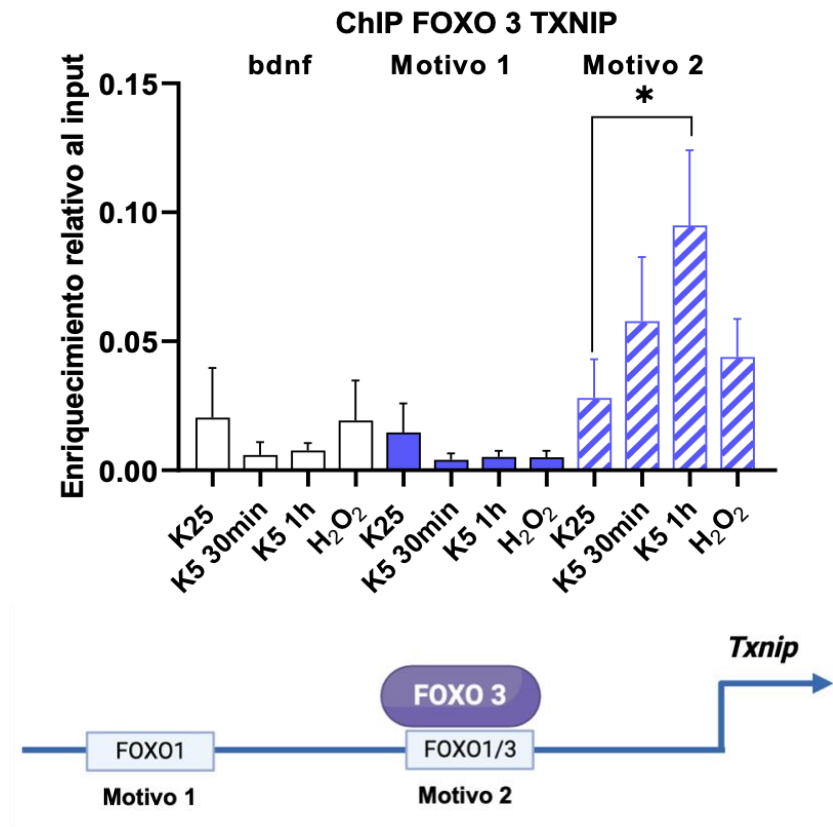


Figura 22. FOXO 3 regula la expresión de *Txnip* con el tratamiento con K5 1 h. Ensayo de inmunoprecipitación de cromatina con el anticuerpo FOXO 3 en neuronas granulares de cerebelo en switch de K5 y H₂O₂. En porcentaje de enriquecimiento presenta valores de enriquecimiento relativos al input de la muestra. El enriquecimiento más alto se encontró en el motivo 1/3 cercano al sitio de inicio de la transcripción a la 1 h posterior al cambio a medio K5. Se utilizaron *primers* para *bdnf* como control de la técnica. Los valores se expresan en porcentaje normalizado respecto al input \pm error estándar de dos experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó con ANOVA de dos vías seguido de una prueba de Tukey * $p < 0.033$, comparado contra K25.

El Silenciamiento de Txnip impide la muerte celular inducida por estaurosporina

Las NGC son sensibles a la transfección por electroporación y no presentan alta eficiencia con métodos menos agresivos como la lipofección. Por esta razón, se utilizó la línea celular de neuroblastoma humano MSN para llevar a cabo el silenciamiento de *Txnip* y evaluar su participación en la muerte. Las células MSN no responden al estímulo de muerte por bajo potasio debido a que no requiere la despolarización como señal de supervivencia como ocurre en las NGC. Sin embargo, la Sts, al ser un inhibidor general de proteínas cinasas, induce muerte en este modelo (Pan *et al.*, 2022).

Se utilizaron 4 secuencias de shRNA dirigidas a diferentes regiones del mensajero de *Txnip*. Todas tienen alta homología de reconocimiento de la secuencia de *Txnip* de humano (Figura suplementaria 3). El plásmido fue transfectado mediante electroporación. Las células transfectadas con los interferentes fueron reconocidas por la expresión de EGFP que se encuentra inserto en el mismo vector que el shRNA (Figura 23 a). Se transfectaron las secuencias de shRNA y se utilizó como control una secuencia *scramble* (src) que no es complementaria al mRNA de interés. La eficiencia de transfección fue de 20-30% con 5 µg de plásmido purificado a 3 millones de células por condición (Figura 23 b,c). Tanto las células *scramble* como las que expresan los interferentes tienen una viabilidad del 80% después del proceso de transfección.

Para determinar la sensibilidad a Sts en estas células, se realizó una curva de dosis creciente de Sts (0.1- 1 µM) por 24h en células *scramble* y se encontró que las concentraciones de 0.5 y 1µM reducen 50 % la viabilidad celular en comparación con el control con DMSO (Figura 22 d). Se evaluó a viabilidad con el tratamiento con Sts 1µM 24h en las células transfectadas con las 4 secuencias interferentes y se comparó con el contro Scr. Las células transfectadas con la secuencia 1 muestran significativamente menor porcentaje de muerte en comparación con el control y con las otras secuencias (Figura 24 a)

Se evaluó el *knockdown* con la secuencia 1 del interferente mediante *western blot* y se encontró que las células MSN expresan TXNIP de forma basal (Figura 24 b) y que esta expresión se reduce 10 % con el interferente en condiciones basales.

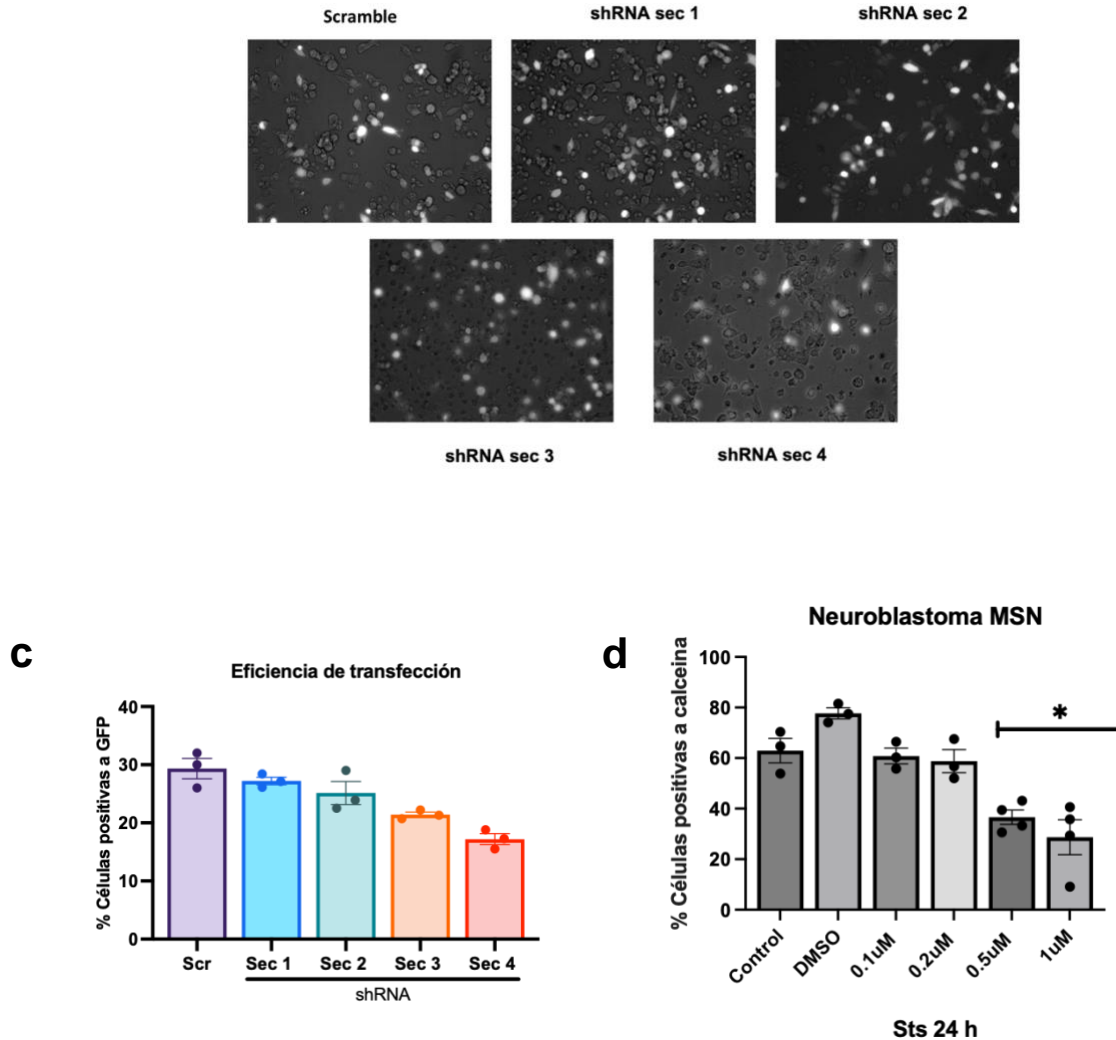


Figura 23. Transfección del shRNA en cultivo de células de neuroblastoma MSN. Panel a, se muestra un esquema de la construcción de las interferentes de TXNIP, plásmido contiene elementos de resistencia a ampicilina y a puomicina como elementos de selección, además de EGFP como marcador de transfección bajo el promotor de CMV. Se transfectaron 3 millones de células con 5 µg de plásmido mediante electroporación con el kit de Amaxa. Las células se sembraron en cajas de 60mm y se realizó cambio de medio a las 2hrs. b) Las micrografías fueron tomadas en microscopio de epifluorescencia. c) La cuantificación de la eficiencia de transfección se realizó como el número de células positivas a GFP respecto a todas las células en campo claro. Los datos se expresan como porcentaje del total para cada transfección, d) Se realizó una curva de sensibilidad a la estaurosporina con dosis crecientes por 24 h desde 0.1 a 1 µM. e) Las células transfectadas con la secuencia *scramble* o las 4 secuencias del

shRNA se trataron con Sts 0.5 y 1 μ M por 24 h, la viabilidad se cuantificó como el número de células positivas a calceína. Las gráficas muestran la media \pm el error estándar; n= 3. Los datos fueron analizados con una ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparación múltiple de Dunnett. $*p < 0.033$, $**p < 0.002$, $***p < 0.001$ comparado contra K25.

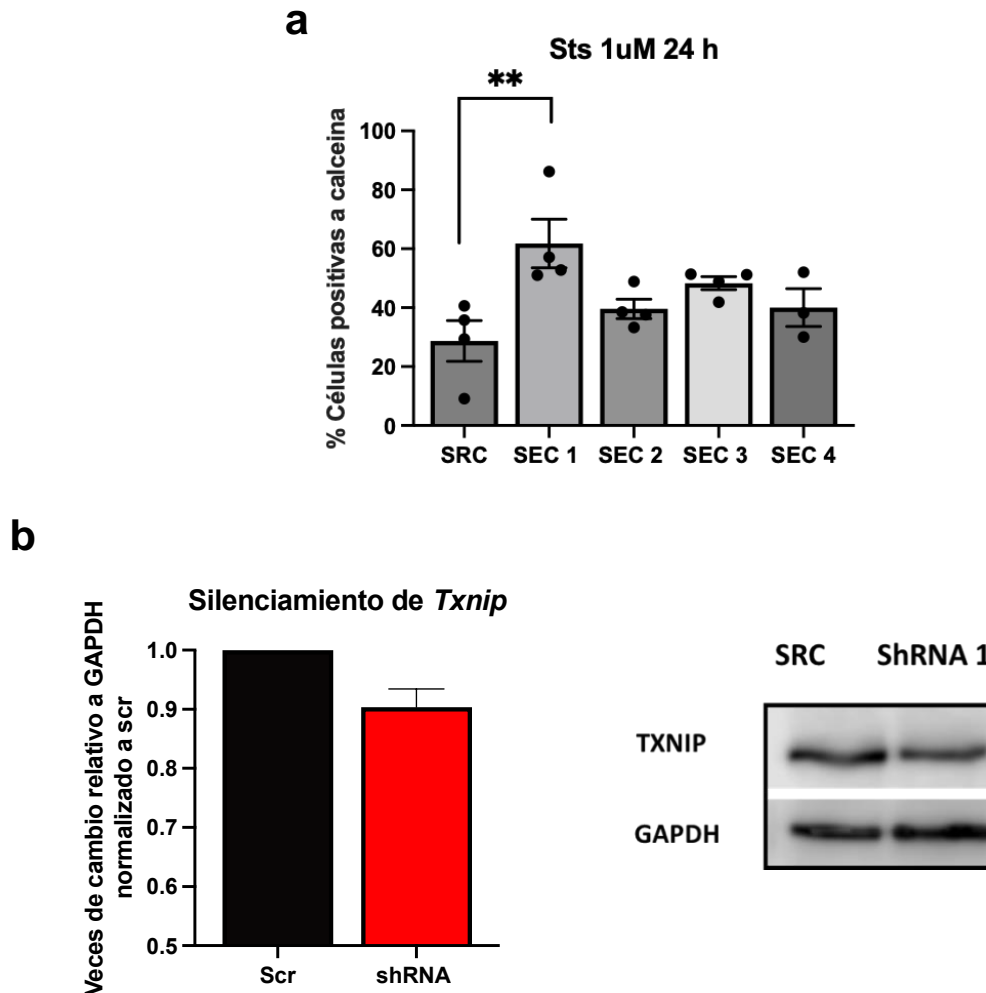


Figura 24. TXNIP se expresa de forma basal en las células MSN, el interferente 1 promueve el knockdown de Txnip 48h posteriores a la transfección. a) El tratamiento con estaurosporina se realizó 48 h después de la transfección, se utilizaron las 4 secuencias de shRNA; b) Determinación del silenciamiento de Txnip con la secuencia 1 de shRNA. Las gráficas muestran la media \pm el error estándar N=3. Los datos fueron analizados con una ANOVA de una vía seguido de un test de comparación múltiple de Dunnett. $***p < 0.002$ comparado contra SCR.

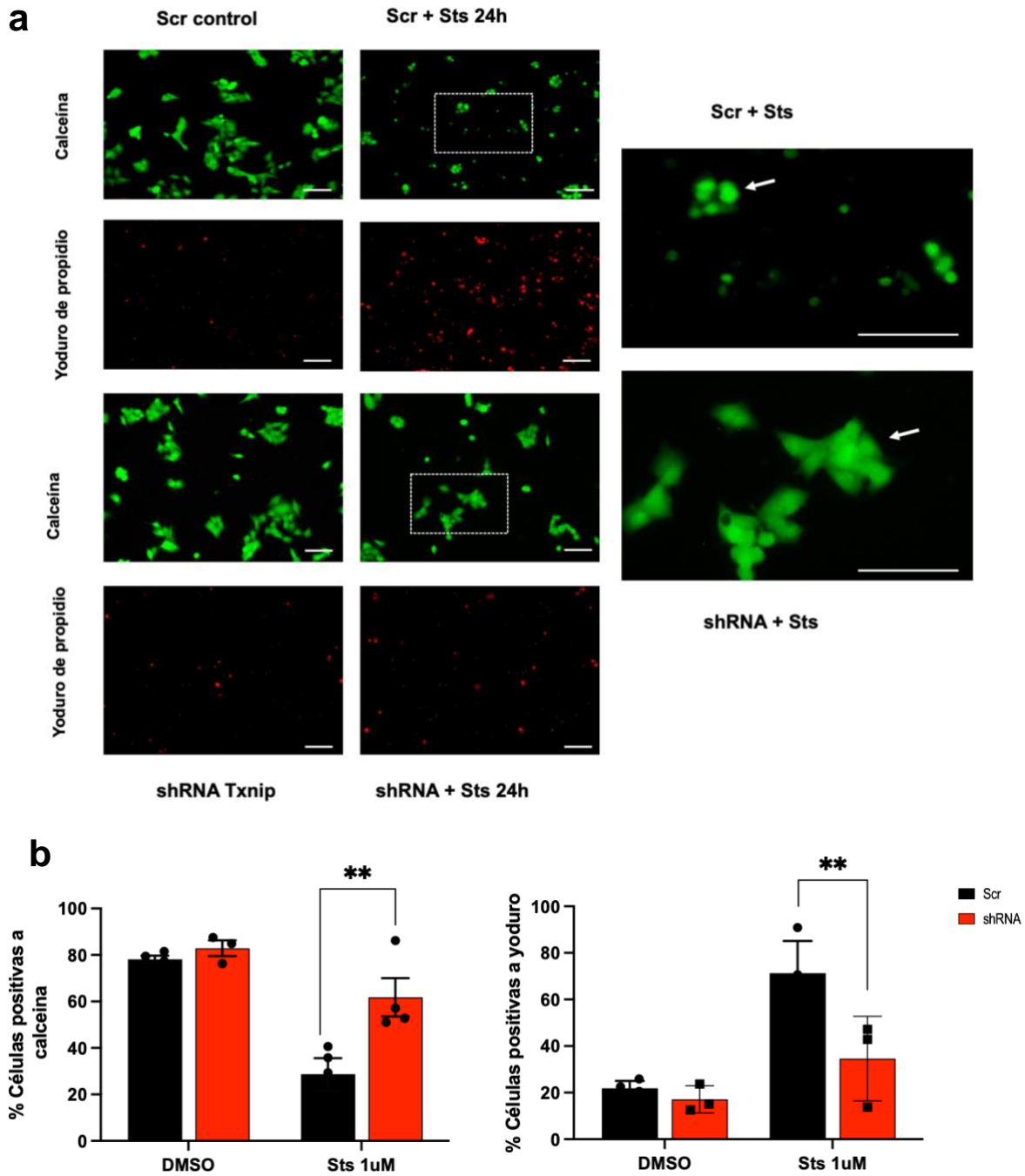


Figura 25. La expresión de *Txnip* es necesaria para inducir la muerte celular. Las células MSN de neuroblastoma humano se transfectaron con 5ug de plásmidos con secuencia scramble o shRNA. 48 h después se realizaron estímulos con estaurosporina 1 μ M y en la condición control se trató a las células con DMSO, el vehículo en el que se disuelve la estaurosporina. La viabilidad se determinó por calceína y yoduro de propidio a las 24 h. a) Muestra las micrografías representativas para cada condición, b) Muestra

El papel de las especies reactivas de oxígeno en la señalización de Txnip y sus efectos en la muerte neuronal

la cuantificación de los datos todas las condiciones. Los datos se expresan como porcentaje de células positivas a calceína o yoduro comparadas con el total por condición. Las micrografías fueron tomadas en microscopio de epifluorescencia con el objetivo 20X, la barra representa 50 μm . Los datos están expresados como la media \pm el error estándar de 4 experimentos independientes *** $p < 0.002$. Los datos fueron analizados con una prueba ANOVA de dos vías seguida de una prueba de comparación múltiple de Sidak.

Las células MSN producen ERO en respuesta al tratamiento con Sts

Para determinar si el tratamiento con Sts induce la producción de ERO en las células MSN de manera similar a lo descrito en NGC, se realizó un curso temporal con Sts por 0.5-6 h. Encontramos que 5h posteriores al tratamiento, los niveles de ERO incrementan de manera significativa en comparación con el control y este efecto aumenta a las 6h (Figura 26). Estos datos muestran que hay una respuesta similar en cuanto al incremento en las ERO en ambos modelos a tiempos similares.

a

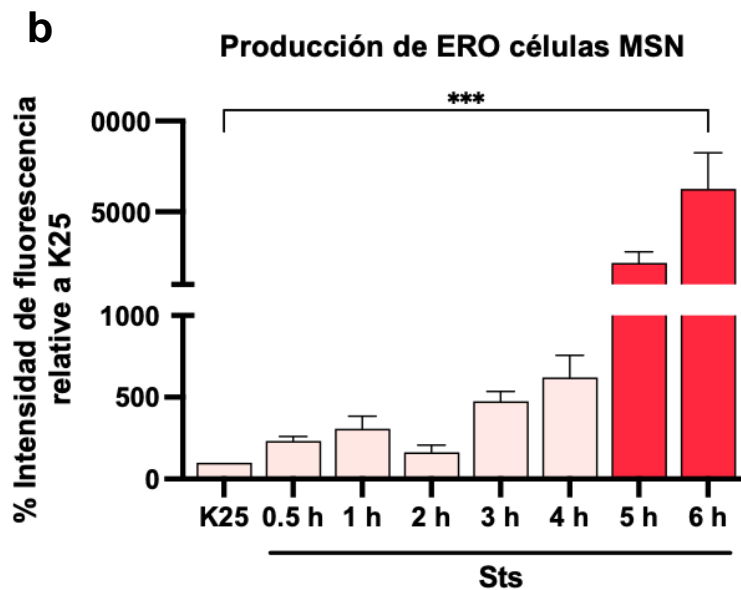
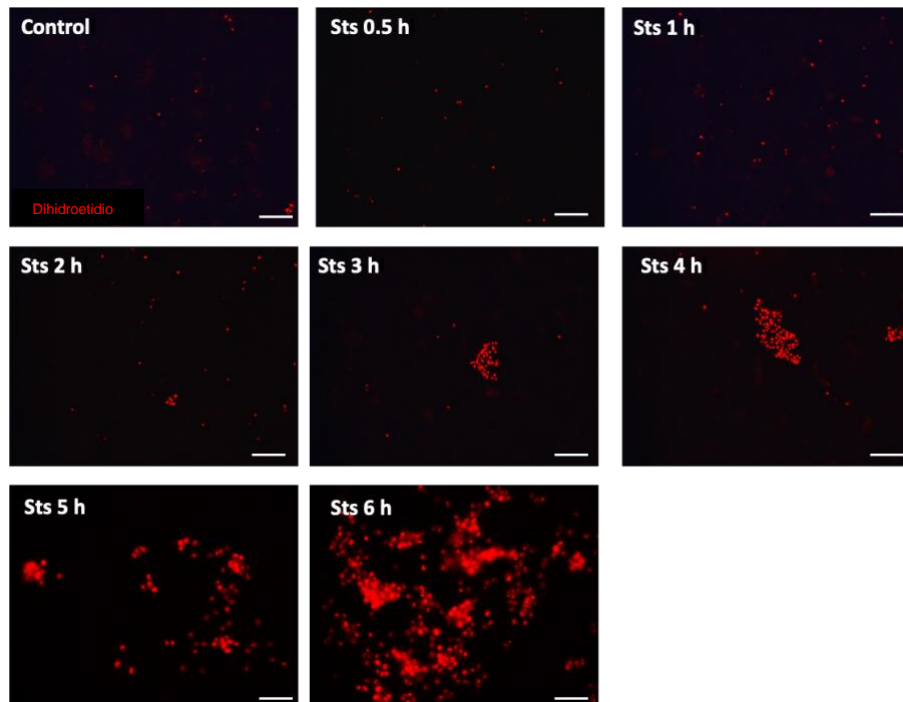


Figura 26. El tratamiento con estaurosporina en células de neuroblastoma humano MSN incrementa la producción de ERO. Las células se trataron con estaurosporina Sts, por 0.5 h- 6 h, el contenido de ERO se determinó mediante un ensayo de DHE, los valores se expresan como porcentaje de intensidad de fluorescencia relativo a K25. El dihidroetidio fue utilizado como se describe en métodos. a) Muestra las microfografías representativas para cada condición, b) Muestra la cuantificación de los datos

todas las condiciones. Las barras representan la media \pm el error estándar de 3 experimentos independientes, *** $p < 0.001$. Los datos fueron analizados con una prueba ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparación múltiple de Dunnett. Las líneas en las micrografías representan 100 μm .

PARTE 4

Discusión

La muerte apoptótica es un proceso caracterizado por una fase inicial en la cual las células se comprometen y son destinadas a morir al iniciarse cascadas de señalización específicas (Belmokhtar *et al.*, 2001). Se ha sugerido que, durante el desarrollo embrionario de humano, rata y ratón una proporción de neuronas granulares de cerebelo mueren por apoptosis causada por la ausencia de estimulación presináptica glutamatérgica. Este evento puede ser replicado in vitro al cambiar a las neuronas en cultivo de un medio despolarizante de alto potasio (25 mM KCl) a una condición hiperpolarizante de bajo potasio (5 mM KCl) (Belmokhtar *et al.*, 2001; Contestabile, 2002; Valencia y Morán, 2001; Ramiro-Cortés and Morán, 2009; Gomez-Gamboa and Morán, 2009; Zaragoza-Campillo y Morán, 2017; Cid-Castro y Morán, 2021). Igualmente, la apoptosis de las NGC puede ser inducida con el tratamiento con estaurosporina, que actúa como inhibidor general de cinasas e induce la muerte por una vía de señalización similar a K5 (Saitoh *et al.*, 2001; Valencia y Morán, 2001).

En la presente tesis, se estudió la señalización involucrada en la expresión de *Txnip* y el papel de esta en la fase apoptótica de compromiso celular. Encontramos que 50 y 60% de las NGC mueren con los estímulos de K5 y Sts respectivamente después de 24h y que la fase de compromiso ocurre alrededor de las 3-5 h posteriores al estímulo, momento en el cual el proceso es mayormente irreversible y las células no pueden ser rescatadas de la muerte inducida.

Estos datos, indican que existe una ventana temporal corta que se requiere para activar el proceso de muerte, en dicha ventana, hay incremento en la producción de ERO que juegan un papel fundamental (Valencia y Morán, 2001; Ramiro-Cortés y Morán, 2009; Cid-Castro

y Morán, 2021) así como la activación de la vía de señalización MAPK (Ramiro-Cortés y Morán, 2009; Ramiro-Cortés *et al.*, 2011). En este sentido, había evidencia de que las ERO inducían la muerte mediante una cascada de señalización que incluye la activación de ASK1 y las cinasas JNK río abajo. En el presente trabajo, se confirmó que la inhibición de la vía JNK reduce la muerte inducida por K5.

Estudios previos mostraron que cuando las NGC son tratadas con antioxidantes durante las primeras 0-2 h posteriores a la incubación con K5 hay prevención en la activación de caspasas y en la muerte neuronal medida a las 24 h (Valencia y Morán, 2001). En el presente trabajo, se detectó el incremento en ERO después de 0.5 h posteriores al tratamiento K5 pero la diferencia fue estadísticamente significativa después de 3-5 h. Aunado a lo anterior, un trabajo previo realizado por nuestro grupo se encontró que con K5 y Sts hay una producción muy temprana de ERO mitocondriales (10-15min) que participan en la progresión de la muerte desde etapas muy tempranas (Cid-Castro y Morán, 2021). Debido a que el DHE solo detecta las ERO citoplasmáticas, considero que este pico de ERO no forman parte los resultados obtenidos debido a la sensibilidad de la prueba utilizada pero si pueden participar en la activación de la vía de muerte.

Un dato que apoya la idea de que la muerte inducida por K5 y Sts se genera durante las primeras horas después del tratamiento es el resultado que se obtuvo tratando a las neuronas con los inductores de muerte exclusivamente las primeras 1-4 horas y midiendo la viabilidad 24 h después. Previamente ya se había demostrado que se requiere un tiempo mínimo de 4 h aproximadamente de tratamiento con K5 para inducir a muerte. Si las células se tratan solo 3 horas, no es suficiente observar pérdida en la viabilidad. (Valencia y Moran, 2001). En el presente trabajo de tesis se complementaron estos estudios y se encontró que mantener a las células con bajo potasio (1-4 h), con estaurosporina (1-4 h) o H₂O₂ 100 µM por 1h es suficiente para inducir la muerte neuronal 24 h después.

Respecto a TXNIP, se ha propuesto que juega un papel importante en la activación irreversible de la señalización que induce la muerte. Se ha descrito como un supresor de tumores debido a que su ausencia correlaciona con células que evaden la muerte. Zaragoza-Campillo y Morán (2017) reportaron que ésta proteína incrementa después de 2 y 3 h con el

tratamiento de K5 y Sts respectivamente. Asimismo, el H₂O₂ y la inactivación de Akt inducen su incremento y el tratamiento con antioxidantes previene su expresión, sugiriendo que la proteína se regula por ERO y Akt. Basado en estos antecedentes, se exploró el papel de la regulación transcripcional de *Txnip* en ambas condiciones en NGC, y se encontró que el mRNA incrementa 20 veces después de 2 h con K5 y 12 veces después de 3-5 h con Sts. De igual manera, se observó que la inhibición de Akt por LY294002 induce la expresión de *Txnip* de forma dosis dependiente.

La inactivación de Akt por ERO ha sido descrita en varios modelos, este evento se debe a la oxidación específica de las cisteínas 297 y 311 que promueve la formación de un puente disulfuro en el dominio cinasa lo que induce su desfosforilación, este evento podría explicar la inactivación de Akt reportada en ambos modelos en respuesta al incremento en las ERO (Ahmad *et al.*, 2014; Chetram *et al.*, 2012; Murata *et al.*, 2003).

El tratamiento con peróxido de hidrógeno por 1h incrementa 4 veces la expresión de *Txnip*. Cuando realicé una curva temporal de peróxido de hidrógeno por 10- 60 min, encontré que el mensajero de incrementa 17 y 24 veces durante los primeros 10-20 min y posteriormente disminuye a 5 veces y se mantiene estable hasta los 60 min, mostrando que la regulación de la transcripción de *Txnip* por las ERO es un evento rápido.

El mecanismo por el cual la inactivación de Akt lleva a la expresión de *Txnip* ha sido sugerido por Papadia *et al.* (2008) en neuronas corticales. Ellos reportaron la vía Akt-FOXO-*Txnip* basados en la evidencia que muestra motivos de FOXO en el promotor de *Txnip*, al igual que la fosforilación de FOXO por Akt que lleva al su reclutamiento por la proteína 14-3-3 que inhibe sus funciones nucleares (Kloet y Burgering, 2011; Tzivion *et al.*, 2011).

Estos datos son consistentes con la evidencia reportada por Webb *et al.* 2013 donde muestran que FOXO 3 induce la expresión de *Txnip* en progenitores neurales utilizando ChIP seq.

Con el objetivo de explorar si la inactivación de Akt promueve la expresión de *Txnip* por regulación de los factores FOXO, realicé un ensayo de ChIP en NGC de ratón en los dos motivos encontrados en el promotor, los resultados mostraron que FOXO 3 se posiciona en el motivo 2 cercano al TSS después de 1h con K5. El tratamiento con peróxido por 1h no

mostró enriquecimiento significativo de FOXO 3, sin embargo, considero que esto se debe a que hay una respuesta transcripcional rápida en esta condición que promueve el incremento del mensajero desde los 10 y 20 min, por lo tanto, al tiempo analizado, FOXO 3 ya no se encuentra interaccionando con el promotor.

En cuanto a la localización subcelular de FOXO 3, observamos que el tratamiento con K5 y Sts inducen la traslocación al núcleo después de 2 y 3h, respectivamente. Resultados similares fueron observados cuando tratamos a las células con peróxido de hidrógeno o el inhibidor de Akt.

La importancia de *Txnip* en la progresión de la muerte fue demostrada utilizando la línea MSN de neuroblastoma humano en la cual se probaron diferentes secuencias de shRNA para disminuir la expresión de *Txnip*. Las células MSN no responden a condiciones hiperpolarizantes (K5). Por ello, utilizamos Sts como estímulo apoptótico, ya que se ha mostrado que induce la muerte en células humanas de neuroblastoma SY5Y (López y Ferrer, 2000); en esa misma línea celular se encontró que TXNIP se expresa de forma basal probablemente participando en el metabolismo celular. El tratamiento con H₂O₂ 50 µM por 24 h incrementa 5 veces los niveles de TXNIP e induce la muerte apoptótica. El interferir con la función de FOXO 3 o reducir su expresión disminuye la expresión de TXNIP y reduce el porcentaje de apoptosis (Pan *et al.*, 2022).

En el modelo de células MSN, observé la expresión basal de TXNIP como lo reportado por Pan *et al.* 2022 y que ésta disminuye cuando se transfecta el shRNA. La producción de ERO incrementa en respuesta a Sts de forma similar a lo encontrado en NGC. Los datos muestran que la regulación a la baja de *Txnip* previene en un 40% la muerte neuronal inducida por Sts. Considero que esto sucede porque previene la expresión *de novo* de *Txnip* que estaría participando en la activación de la vía induciendo el compromiso celular a la muerte.

Finalmente, estos resultados muestran que *Txnip* participa en la muerte de las neuronas granulares de cerebelo en la fase inicial de compromiso celular. También corroboran que su expresión es dependiente de la producción de ERO y la inactivación de Akt. Un dato de interés es que nuestros resultados sugieren que la inactivación de Akt por una condición prooxidante como K5 ó Sts lleva a la translocación de FOXO 3 al núcleo donde interacciona con

el promotor de *Txnip* en el motivo 2 cercano al TSS. De esta forma TXNIP puede entonces activar a ASK1 de manera indirecta mediante el reclutamiento de Trx, promover la vía JNK con ello llevar a la muerte (Figura 26).

En conclusión, conocer la vía de señalización que induce a la expresión de TXNIP en neuronas resulta importante para abordar a esta proteína como posible blanco terapéutico en patologías donde el estrés oxidante y la muerte apoptótica representen los principales mecanismos de daño celular. Por ejemplo, se ha observado que el estrés oxidante juega un papel importante en la fisiopatología del Alzheimer. En un modelo de ratones (A β PP/PS1) que desarrollan características similares a la enfermedad, se observó que los niveles de TXNIP incrementan en el hipocampo y en la corteza frontal. En cultivos primarios de neuronas corticales y en la línea celular de hipocampo HT22, los niveles de TXNIP incrementan en respuesta al tratamiento con la proteína β -amiloide y su regulación a la baja mediante el sistema Crispr/Cas9 disminuye el daño citotóxico (Wang *et al.*, 2019). En este modelo, la expresión de TXNIP es probablemente el factor que conduce a la activación de la apoptosis, posiblemente por una vía similar a la descrita en el presente trabajo. Otro ejemplo es el reportado en un modelo murino de daño isquémico por oclusión de la arteria cerebral media (MCAO). En este, se observó que la expresión de TXNIP incrementa en respuesta al daño isquémico. Al utilizar ratones *knockout* de TXNIP se observó que el volumen de la lesión disminuye 40% en comparación con los ratones *wildtype* (Ishrat *et al.*, 2015).

En respuesta a la evidencia creciente que relaciona a TXNIP con la muerte celular, recientemente, Choi y Park (2023) reportaron una lista de los potenciales inhibidores directos e indirectos de TXNIP. De forma interesante, entre ellos se encuentra SRI-37330, una molécula pequeña de administración oral biodisponible y no tóxica que fue recientemente identificada por suprimir la expresión de TXNIP al obstruir a su promotor. Hasta ahora, esta molécula se ha probado en células INS-1 y tejido periférico donde TXNIP tiene funciones metabólicas claras. Sin embargo, abre una discusión sobre su posible uso terapéutico en patologías asociadas al sistema nervioso central en donde la muerte neuronal es pronunciada (Thielen *et al.*, 2020; Tsubaki *et al.* 2020).

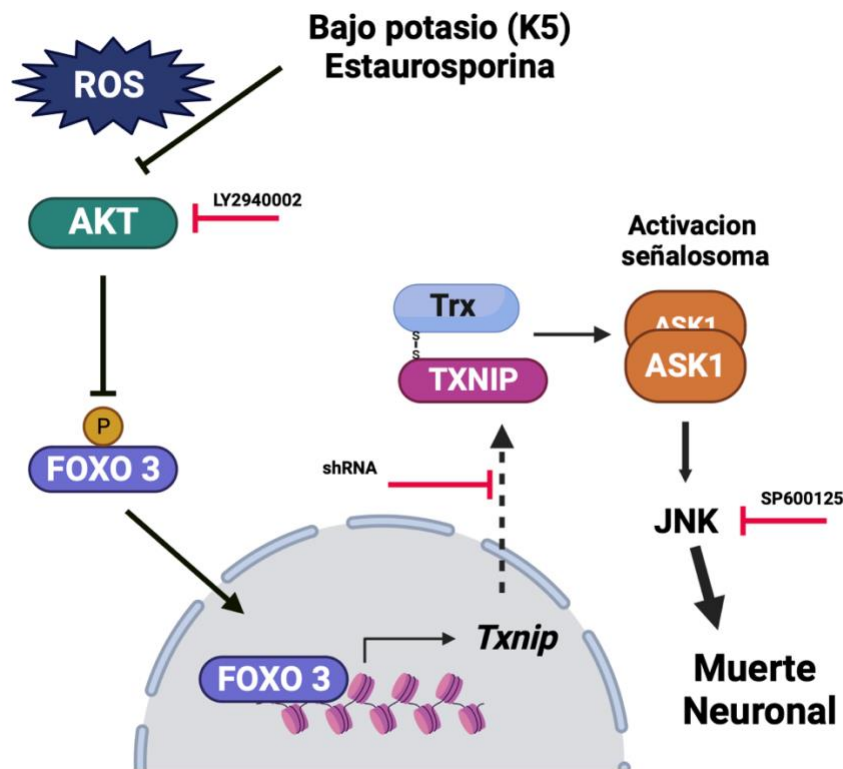


Figura 27. Vía de señalización propuesta en la presente tesis. El bajo potasio induce la producción de ERO que inactiva Akt, esto permite que FOXO migre al núcleo y promueva la transcripción de *Txnip*. El mensajero de *Txnip* incrementa a las 2 h del estímulo y la proteína a las 4 h. La inhibición de la vía JNK interrumpe todo el proceso de muerte. TXNIP es necesario para la ejecución de la muerte porque el uso un interferente inhibe el proceso de muerte por estaurosporina en células MSN.

Bibliografía

- Apel, K., & Hirt, H. (2004b). Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. In *Annual Review of Plant Biology* (Vol. 55, pp. 373–399). <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>
- Atlante, A., Bobba, A., Calissano, P., Passarella, S., & Marra, E. (2003). The apoptosis/necrosis transition in cerebellar granule cells depends on the mutual relationship of the antioxidant and the proteolytic systems which regulate ROS production and cytochrome c release en route to death. *Journal of Neurochemistry*, 84(5). <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01613.x>
- Belmokhtar, C. A., Hillion, J., & Ségal-Bendirdjian, E. (2001). Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Oncogene*, 20(26). <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204436>
- Benítez-Rangel E., Olgún-Albuérne M., López-Méndez M.C., Domínguez-Macouzet G., Guerrero-Hernández A. and Morán J. (2020). Caspase-3 activation correlates with the initial mitochondrial membrane depolarization in neonatal cerebellar granule neurons. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8:544. doi: 10.3389/fcell.2020.00544
- Blancas, S., & Moran, J. (2011). Role for apoptosis-inducing factor in the physiological death of cerebellar neurons. *Neurochemistry International*, 58(8), 934–942. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2011.03.017>
- Boulton, T. G., Nye, S. H., Robbins, D. J., Ip, N. Y., Radziejewska, E., Morgenbesser, S. D., et al. (1991). ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* 65, 663–675.
- Caballero-Benítez, A., & Morán, J. (2002). *Caspase Activation Pathways Induced by Staurosporine and Low Potassium: Role of Caspase-2*.
- Circu, M. L., & Aw, T. Y. (2008). Glutathione and apoptosis. In *Free Radical Research* (Vol. 42, Issue 8, pp. 689–706). <https://doi.org/10.1080/10715760802317663>
- Circu, M. L., & Aw, T. Y. (2010a). Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. In *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 48, Issue 6, pp. 749–762). <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.022>
- Di Meo, S., Reed, T. T., Venditti, P., & Victor, V. M. (2016). Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 2016). Hindawi Publishing Corporation. <https://doi.org/10.1155/2016/1245049>
- Dickinson, D. A., & Jay Forman, H. (2002.). *Cellular glutathione and thiols metabolism*.
- Chiyo, Taiga, Koji Fujita, Hisakazu Iwama, Shintaro Fujihara, Tomoko Tadokoro, Kyoko Ohura, Takanori Matsui, Yasuhiro Goda, Nobuya Kobayashi, Noriko Nishiyama, and et al. 2019. "Galectin-9 Induces Mitochondria-Mediated Apoptosis of Esophageal Cancer In Vitro and In Vivo in a Xenograft Mouse Model" *International Journal of Molecular Sciences* 20, no. 11: 2634. <https://doi.org/10.3390/ijms20112634>

El papel de las especies reactivas de oxígeno en la señalización de Txnip y sus efectos en la muerte neuronal

- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 2007 ; 35(4): 495–516
- Finkel, T & Hoolbrook, N. (2000). ROS in aging. *Nature.* Vol. 408
- Finkel, T. (2011). Signal transduction by reactive oxygen species. In *Journal of Cell Biology* (Vol. 194, Issue 1, pp. 7–15). <https://doi.org/10.1083/jcb.201102095>
- Frémont, S., Romet-Lemonne, G., Houdusse, A., & Echard, A. (2017). Emerging roles of MICAL family proteins - from actin oxidation to membrane trafficking during cytokinesis. In *Journal of Cell Science* (Vol. 130, Issue 9). <https://doi.org/10.1242/jcs.202028>
- Giorgio, M., Trinei, M., Migliaccio, E., & Pelicci, P. G. (2007). Hydrogen peroxide: A metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 8, Issue 9, pp. 722–728). <https://doi.org/10.1038/nrm2240>
- Gorin, Y. (2013). Nox4 as a potential therapeutic target for treatment of uremic toxicity associated to chronic kidney disease. In *Kidney International* (Vol. 83, Issue 4). <https://doi.org/10.1038/ki.2012.434>
- Gorin, Y., & Block, K. (2013). Nox as a target for diabetic complications. In *Clinical Science* (Vol. 125, Issue 8). <https://doi.org/10.1042/CS20130065>
- Grintsevich, E. E., Ahmed, G., Ginosyan, A. A., Wu, H., Rich, S. K., Reisler, E., & Terman, J. R. (2021). Profilin and Mical combine to impair F-actin assembly and promote disassembly and remodeling. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25781-3>
- Heneka, M. T., Kummer, M. P., Stutz, A., Delekate, A., Schwartz, S., Vieira-Saecker, A., Griep, A., Axt, D., Remus, A., Tzeng, T. C., Gelpi, E., Halle, A., Korte, M., Latz, E., & Golenbock, D. T. (2013). NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature*, 493(7434), 674–678. <https://doi.org/10.1038/nature11729>
- Hernández-Enríquez, B., Arellano, R. O., & Morán, J. (2010). Role for ionic fluxes on cell death and apoptotic volume decrease in cultured cerebellar granule neurons. *Neuroscience*, 167(2), 298–311. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.01.046>
- Ibi, M., Liu, J., Arakawa, N., Kitaoka, S., Kawaji, A., Matsuda, K. ichi, Iwata, K., Matsumoto, M., Katsuyama, M., Zhu, K., Teramukai, S., Furuyashiki, T., & Yabe-Nishimura, C. (2017). Depressive-like behaviors are regulated by NOX1/NADPH oxidase by redox modification of NMDA receptor 1. *Journal of Neuroscience*, 37(15). <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2988-16.2017>
- Ishrat, T.; Mohamed, I.N.; Pillai, B.; Soliman, S.; Fouda, A.Y.; Ergul, A.; El-Remessy, A.B.; Fagan, S.C. Thioredoxin-Interacting Protein: A Novel Target for Neuroprotection in Experimental Thromboembolic Stroke in Mice. *Mol. Neurobiol.* **2015**, 51, 766–778
- Jordán, J. (2003). Apoptosis: muerte celular programada ÁMBITO FARMACÉUTICO. In *OFFARM* (Vol. 22).
- Johnson GL, Nakamura K. (2007). The c-jun kinase/stress-activated pathway: regulation, function and role in human disease. *Biochim Biophys Acta* 1773: 1341–1348.

- Kamata, H., & Hirata, H. (1999). Redox Regulation of Cellular Signalling. *Cell. Signal*, 11(1), 1–14.
- Kamata, H., Oka, S. I., Shibukawa, Y., Kakuta, J., & Hirata, H. (2005). Redox regulation of nerve growth factor-induced neuronal differentiation of PC12 cells through modulation of the nerve growth factor receptor, TrkA. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 434(1 SPEC. ISS.), 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.07.036>
- Kishida, K. T., Pao, M., Holland, S. M., & Klann, E. (2005). NADPH oxidase is required for NMDA receptor-dependent activation of ERK in hippocampal area CA1. *Journal of Neurochemistry*, 94(2). <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03189.x>
- Koundouros, N., & Poulogiannis, G. (2018). Phosphoinositide 3-Kinase/Akt signaling and redox metabolism in cancer. In *Frontiers in Oncology* (Vol. 8, Issue MAY). <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00160>
- Kumar, P., Nagarajan, A., & Uchil, P. D. (2018). Analysis of cell viability by the MTT assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(6), 469–471. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095505>
- Kwon, J., Lee, S. R., Yang, K. S., Ahn, Y., Kim, Y. J., Stadtman, E. R., & Rhee, S. G. (2004). Reversible oxidation and inactivation of the tumor suppressor PTEN in cells stimulated with peptide growth factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(47). <https://doi.org/10.1073/pnas.0407396101>
- Lambeth, J. D. (2004). NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 4, Issue 3, pp. 181–189). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri1312>
- Lambeth, J. D. (2007). Nox enzymes, ROS, and chronic disease: An example of antagonistic pleiotropy. In *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 43, Issue 3, pp. 332–347). <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.027>
- le Belle, J. E., Orozco, N. M., Paucar, A. A., Saxe, J. P., Mottahedeh, J., Pyle, A. D., Wu, H., & Kornblum, H. I. (2011). Proliferative neural stem cells have high endogenous ROS levels that regulate self-renewal and neurogenesis in a PI3K/Akt-dependant manner. *Cell Stem Cell*, 8(1). <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.11.028>
- Lee, N. K., Choi, Y. G., Baik, J. Y., Han, S. Y., Jeong, D. W., Bae, Y. S., Kim, N., & Lee, S. Y. (2005). A crucial role for reactive oxygen species in RANKL-induced osteoclast differentiation. *Blood*, 106(3), 852–859. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-09-3662>
- Lee, S. R., Yang, K. S., Kwon, J., Lee, C., Jeong, W., & Rhee, S. G. (2002). Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H₂O₂. *Journal of Biological Chemistry*, 277(23). <https://doi.org/10.1074/jbc.M111899200>
- Leto, T. L., Morand, S., Hurt, D., & Ueyama, T. (2009). *Targeting and Regulation of Reactive Oxygen Species Generation by Nox Family NADPH Oxidases*. DOI:10.1089/ARS.2009.2637
- Li, J., Stouffs, M., Serrander, L., Banfi, B., Bettiol, E., Charnay, Y., Steger, K., Krause, K.-H., & Jaconi, M. E. (2006). The NADPH Oxidase NOX4 Drives Cardiac Differentiation: Role in Regulating Cardiac Transcription Factors and MAP Kinase Activation. *Molecular Biology of the Cell*, 17, 3978–3988. <https://doi.org/10.1091/mbc.E05-06>

- Li, X., Rong, Y., Zhang, M., Wang, X. L., LeMaire, S. A., Coselli, J. S., Zhang, Y., & Shen, Y. H. (2009). Up-regulation of thioredoxin interacting protein (Txnip) by p38 MAPK and FOXO1 contributes to the impaired thioredoxin activity and increased ROS in glucose-treated endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 381(4). <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.02.132>
- Lindermayr, C., Deswal, R., Reichheld, J.-P., Martins, L., & Abraham Trujillo-Hernandez, J. (2018). Thiol Based Redox Signaling in Plant Nucleus. *Front. Plant Sci*, 9, 705. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00705>
- Marí, M., Morales, A., Colell, A., García-Ruiz, C., & Fernández-Checa, J. C. (n.d.). *Mitochondrial Glutathione, a Key Survival Antioxidant*.
- McIlwain, D. R., Berger, T., & Mak, T. W. (2013). Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(4), 1–28. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008656>
- Munnamalai, V., Weaver, C. J., Weisheit, C. E., Venkatraman, P., Agim, Z. S., Quinn, M. T., & Suter, D. M. (2014). Bidirectional interactions between NOX2-type NADPH oxidase and the F-actin cytoskeleton in neuronal growth cones. *Journal of Neurochemistry*, 130(4). <https://doi.org/10.1111/jnc.12734>
- Murata, H., Ihara, Y., Nakamura, H., Yodoi, J., Sumikawa, K., & Kondo, T. (2003). Glutaredoxin Exerts an Antiapoptotic Effect by Regulating the Redox State of Akt. *Journal of Biological Chemistry*, 278(50). <https://doi.org/10.1074/jbc.M310171200>
- Nayernia, Z., Jaquet, V., & Krause, K. H. (2014). New insights on NOX enzymes in the central nervous system. In *Antioxidants and Redox Signaling* (Vol. 20, Issue 17). <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5703>
- Newsholme, P., Rebelato, E., Abdulkader, F., Krause, M., Carpinelli, A., & Curi, R. (2012a). Reactive oxygen and nitrogen species generation, antioxidant defenses, and β -cell function: A critical role for amino acids. In *Journal of Endocrinology* (Vol. 214, Issue 1, pp. 11–20). <https://doi.org/10.1530/JOE-12-0072>
- Newsholme, P., Rebelato, E., Abdulkader, F., Krause, M., Carpinelli, A., & Curi, R. (2012b). Reactive oxygen and nitrogen species generation, antioxidant defenses, and β -cell function: A critical role for amino acids. In *Journal of Endocrinology* (Vol. 214, Issue 1, pp. 11–20). <https://doi.org/10.1530/JOE-12-0072>
- Noctor, G., & Foyer, C. H. (2016). Intracellular redox compartmentation and ROS-related communication in regulation and signaling. *Plant Physiology*, 171(3), 1581–1592. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00346>
- Olguín-Albuerne, M., & Morán, J. (2018). Redox Signaling Mechanisms in Nervous System Development. In *Antioxidants and Redox Signaling* (Vol. 28, Issue 18, pp. 1603–1625). Mary Ann Liebert Inc. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7284>
- Orrenius, S., Gogvadze, V., & Zhivotovsky, B. (2007). Mitochondrial oxidative stress: Implications for cell death. In *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* (Vol. 47, pp. 143–183). <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105122>

- Papadia, S., Soriano, F. X., Léveillé, F., Martel, M.-A., Dakin, K. A., Hansen, H. H., Kaindl, A., Sifringer, M., Fowler, J., Stefovská, V., Mckenzie, G., Craigon, M., Corriveau, R., Ghazal, P., Horsburgh, K., Yankner, B. A., & Wyllie, D. J. A. (2008). *Synaptic NMDA receptor activity boosts intrinsic antioxidant defenses*. <https://doi.org/10.1038/nn2071>
- Ramiro-Cortés, Y., & Morán, J. (2009). Role of oxidative stress and JNK pathway in apoptotic death induced by potassium deprivation and staurosporine in cerebellar granule neurons. *Neurochemistry International*, 55(7), 581–592. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2009.05.015>
- Ray, P. D., Huang, B. W., & Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. In *Cellular Signalling* (Vol. 24, Issue 5, pp. 981–990). <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.008>
- Reynolds, C. P., Biedler, J. L., Spengler, B. A., Ross, R. A., Frenkel, E. P., & Smith, R. G. (1986). Characterization of human neuroblastoma cell lines established before and after therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, 76(3).
- Reza, H., Ashtiani, A., Karimi Bakhshandi, A., Rahbar, M., Mirzaei, A., Malekpour, A., & Rastegar, H. (2011). Glutathione, cell proliferation and differentiation. *African Journal of Biotechnology*, 10(34), 6348–6363. <https://doi.org/10.5897/AJB10.044>
- Rouse, J., Cohen, P., Trigon, S., Morange, M., Alonso-Llamazares, A., Zamanillo, D., et al. (1994). A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* 78, 1027–1037.
- Rumbaugh, G., Adams, J. P., Kim, J. H., and Haganir, R. L. (2006). SynGAP regulates synaptic strength and mitogen-activated protein kinases in cultured neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 4344–4351. doi: 10.1073/pnas.0600084103
- Sakai, J., Li, J., Subramanian, K. K., Mondal, S., Bajrami, B., Hattori, H., Jia, Y., Dickinson, B. C., Zhong, J., Ye, K., Chang, C. J., Ho, Y. S., Zhou, J., & Luo, H. R. (2012). Reactive Oxygen Species-Induced Actin Glutathionylation Controls Actin Dynamics in Neutrophils. *Immunity*, 37(6), 1037–1049. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.08.017>
- Sastry, P. S., & Rao, K. S. (2000). Apoptosis and the Nervous System. In *J. Neurochem* (Vol. 74).
- Schmidt, E. F., Shim, S. O., & Strittmatter, S. M. (2008). Release of MICAL autoinhibition by semaphorin-plexin signaling promotes interaction with collapsin response mediator protein. *Journal of Neuroscience*, 28(9). <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5646-07.2008>
- Shen, H.-M., & Pervaiz, S. (2006). TNF receptor superfamily-induced cell death: redox-dependent execution. *The FASEB Journal*, 20(10), 1589–1598. <https://doi.org/10.1096/fj.05-5603rev>
- Smith, J., Ladi, E., Mayer-Prö Schel, M., & Noble, M. (2000). *Redox state is a central modulator of the balance between self-renewal and differentiation in a dividing glial precursor cell*. www.pnas.org
- Song, L., Pei, L., Yao, S., Wu, Y., & Shang, Y. (2017). NLRP3 inflammasome in neurological diseases, from functions to therapies. In *Frontiers in Cellular Neuroscience* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00063>

- Sorce, S., & Krause, K. H. (2009). NOX enzymes in the central nervous system: From signaling to disease. In *Antioxidants and Redox Signaling* (Vol. 11, Issue 10). <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2578>
- Sorce, S., Krause, K. H., & Jaquet, V. (2012). Targeting NOX enzymes in the central nervous system: Therapeutic opportunities. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 69, Issue 14). <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1014-5>
- Su, Z., Burchfield, J. G., Yang, P., Humphrey, S. J., Yang, G., Francis, D., Yasmin, S., Shin, S. Y., Norris, D. M., Kearney, A. L., Astore, M. A., Scavuzzo, J., Fisher-Wellman, K. H., Wang, Q. P., Parker, B. L., Neely, G. G., Vafaei, F., Chiu, J., Yeo, R., ... James, D. E. (2019). Global redox proteome and phosphoproteome analysis reveals redox switch in Akt. *Nature Communications*, 10(1).
- Schroeter H, Boyd CS, Ahmed R, Spencer JP, Duncan RF, Rice-Evans C et al. (2003). c-Jun N-terminal kinase (JNK)-mediated modulation of brain mitochondria function: new target proteins for JNK signalling in mitochondrion-dependent apoptosis. *BiochemJ* 372: 359–369.
- Terzi, A., Roeder, H., Weaver, C. J., & Suter, D. M. (2021). Neuronal NADPH oxidase 2 regulates growth cone guidance downstream of slit2/robo2. *Developmental Neurobiology*, 81(1). <https://doi.org/10.1002/dneu.22791>
- Thuret, G., Chiquet, C., Herrag, S., Dumollard, J. M., Boudard, D., Bednarz, J., Campos, L., & Gain, P. (2003). Mechanisms of staurosporine induced apoptosis in a human corneal endothelial cell line. *British Journal of Ophthalmology*, 87(3). <https://doi.org/10.1136/bjo.87.3.346>
- Tsatmali, M., Walcott, E. C., & Crossin, K. L. (2005). Newborn neurons acquire high levels of reactive oxygen species and increased mitochondrial proteins upon differentiation from progenitors. *Brain Research*, 1040(1–2), 137–150. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.01.087>
- Tsatmali, M., Walcott, E. C., Makarenkova, H., & Crossin, K. L. (2006). Reactive oxygen species modulate the differentiation of neurons in clonal cortical cultures. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 33(4), 345–357. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2006.08.005>
- Tournier C, Hess P, Yang DD, Xu J, Turner TK, Nimmual A et al.(2000). Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* 288: 870–874.
- Thielen, L. A. et al. (2020) Identification of an anti-diabetic, orally available small molecule that regulates TXNIP expression and glucagon action. *Cell Metab.* 32, 353–365 e358.
- Tseng, A. H. H., Shieh, S.-S., & Wang, D. L. (2013). *SIRT3 deacetylates FOXO3 to protect mitochondria against oxidative damage*. *Free Radical Biology and Medicine*, 63, 222–234. doi:10.1016/j.freeradbiomed.20
- Tsubaki, Haruka, Ikuo Tooyama, and Douglas Gordon Walker. 2020. "Thioredoxin-Interacting Protein (TXNIP) with Focus on Brain and Neurodegenerative Diseases" *International Journal of Molecular Sciences* 21, no. 24: 9357. <https://doi.org/10.3390/ijms21249357>
- Valencia, A., & Morán, J. (2001). Role of Oxidative Stress in the Apoptotic Cell Death of Cultured Cerebellar Granule Neurons. In *J. Neurosci. Res* (Vol. 64).

- Valencia, A., & Morán, J. (2004a). Reactive oxygen species induce different cell death mechanisms in cultured neurons. *Free Radical Biology and Medicine*, 36(9), 1112–1125. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.02.013>
- Valencia, A., & Morán, J. (2004b). Reactive oxygen species induce different cell death mechanisms in cultured neurons. *Free Radical Biology and Medicine*, 36(9), 1112–1125. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.02.013>
- Vermot, A., Petit-Härtlein, I., Smith, S. M. E., Fieschi, F., & Hernández-Hernández, Á. (2021). *NADPH Oxidases (NOX): An Overview from Discovery, Molecular Mechanisms to Physiology and Pathology*. <https://doi.org/10.3390/antiox10060890>
- Webb, A. E., Pollina, E. A., Vierbuchen, T., Urbán, N., Ucar, D., Leeman, D. S., Martynoga, B., Sewak, M., Rando, T. A., Guillemot, F., Wernig, M., & Brunet, A. (2013). FOXO3 shares common targets with ASCL1 genome-wide and inhibits ASCL1-dependent neurogenesis. *Cell Reports*, 4(3). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.06.035>
- Zaragoza-Campillo, M. A., & Morán, J. (2017a). Reactive Oxygen Species Evoked by Potassium Deprivation and Staurosporine Inactivate Akt and Induce the Expression of TXNIP in Cerebellar Granule Neurons. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8930406>
- Zepeta-Flores, N., Valverde, M., Lopez-Saavedra, A., & Rojas, E. (2018). *Glutathione depletion triggers actin cytoskeleton changes via actin-binding proteins*. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2017-0158>
- Zhao, Y., Liu, H., Zhang, Q., & Zhang, Y. (2020). The functions of long non-coding RNAs in neural stem cell proliferation and differentiation. In *Cell and Bioscience* (Vol. 10, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13578-020-00435-x>
- Zhou, K., Shi, L., Wang, Y., Chen, S., & Zhang, J. (2016). Recent Advances of the NLRP3 Inflammasome in Central Nervous System Disorders. In *Journal of Immunology Research* (Vol. 2016). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2016/9238290>
- Zhu, L., Lu, Y., Zhang, J., & Hu, Q. (2017). Subcellular redox signaling. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 967, pp. 385–398). Springer New York LLC. https://doi.org/10.1007/978-3-319-63245-2_25
- Wang, Y., Wang, Y., Bharti, V., Zhou, H., Hoi, V., Tan, H., ... Wang, J.-F. (2019). *Upregulation of Thioredoxin-Interacting Protein in Brain of Amyloid-β Protein Precursor/Presenilin 1 Transgenic Mice and Amyloid-β Treated Neuronal Cells*. *Journal of Alzheimer's Disease*, 1–12. doi:10.3233/jad-190223

El papel de las especies reactivas de oxígeno en la señalización de Txnip y sus efectos en la muerte neuronal

Sequence Retrieval Tool

Get sequence Txnip_1 from to bp relative to TSS

lower case upstream TSS

```
>FP004291 Txnip_1 :+U EU:NC; range -1000 to 100.
aaggagtgaggttctttttcttctttttctttttctttttctttttatttttatttttttggttt
gtccacctcttggttctctggagaacaaggacgggggagccatcagtgtaaagtaaacac
cctcacaagctgcagtgaggaaacaagggaacatatacaaaaatgttccccaacttcacag
gtacactgaagagatgaggggataagcaacaggatgtggacactcccttactgcttccgc
tccagagaacagaaatagaatgtaattggcgagggaacagtagcagcacataggggatgaa
atgagggggaaatgaggggaaccaccagagcattcaccagaaaggactgaaagccagac
tttaaaatctgacaagttctcgtctctggagagaccgcagcctttttatcttcaatagaa
gtgcaataggagcatatcgggtgggctctttctcactaacacgactgcactctcgccctc
cgctccatcctggagatcctcgggtgcatgggatcggtttttcacaagacttgcaactt
gtgagccaggaataaatgggtcacctcgaatgaaatgctgctggctcaggcgagtcagaa
atcctctcctaagcacatttttctttcactaaaaaaagagggggaaaaaaaaaaaaa
gcacacacccaaataaaccagctcccaagaggagtcccctggatgaggttcagggtccc
gggtcccagcctcccgggggagggagggcaccgctcgccccgggccccgcccctcctgc
tggaaggctgcgcaaccgaacaacaaccattttcccgcctaggagcacaccgtgtccac
gcgccccggggcctcgctgatgggtggaggcctggtaaaacaaggccaagttagcaat
gggagaactgtgcacgagggctgcacgagcctccaggccagcactcgctggagcgccaa
gccagggcggtatataagccgtttccggcagccgcttgacACTCTCTCTCTGGTCTCG
GGGTTTCCAGAGTTTCTCCAGTTGCGGAAGACAGCTGTTATTTTCTCTGAAAGCTTTT
GGCACAGCCGGCAGGCTGAAA
```

Search Motif Tool

Library: Motif:

From: To: bp relative to TSS and a cut-off (p-value) of:

FOXO3 [p-value = 0.001]: -928, -916, -883, -120

El papel de las especies reactivas de oxígeno en la señalización de Txnip y sus efectos en la muerte neuronal

Homo sapiens

General Information	
Promoter ID:	TXNIP_2
Promoter type:	region
Organism:	Homo sapiens (Human)
Gene Symbol:	TXNIP
Description of the gene:	thioredoxin interacting protein
Sequence:	gctcttctggcccgggctactatagagacgtttccgcctctgctgAAACTAACCCC
Position in the genome:	Chromosome [NC_000001.11]; Strand [-]; Position [145996579]
Ensembl:	ENSG00000265972
RefSeq:	NM_006472
NCBI Gene:	TXNIP
GeneCards:	TXNIP

Sequence Retrieval Tool

Get sequence TXNIP_2 from to bp relative to TSS

lower case upstream TSS

```
>FP001593 TXNIP_2 :+U EU:NC; range -1000 to 100.  
gtgaaaagagtgaagcactctttttttcccgcttttctcttttctccagaagcaggtagg  
aagtgggagataatgagcgcctggacacacctcactaaagaggtaatgaggtaaatgggg  
aacacagacaaagtgttccccaaactttgcaggtagaaattgaagagatgacaggataagc  
aacaggatgtaaacacgcccctctatattccggttccacagaacagagagaaacagaagaga  
gggtacaagctgggggtgggtgacgaacagcacaggcaagcagccccagccctagcccc  
aagggtattggaacgggaaggagaagacatcggctctacacacacaatgaggcctgaaagt  
tctcctttccctcagagacgggtggtgtttttatacttaatagggatgcggggcaagaga  
aggacaaaggctgttctgaacagtaacaccaagcattctgcgctccacagcccaaac  
ctgaaagtattcttggagctatgggattttcacacacttgctatttatgagccaggaata  
acgacaggctctaaagtaactgcactggctaaagactaggcatgaaattccctcataagca  
cattttccttttacctcaaaacacccgctctcagaccagaaacgtccacaccgcccctcgg  
atggcctgtcgcctggctaggttttagggteagtgaggatcctccttccactggaccgg  
gagaagacgctcaacagccccctccttcccctccttctccttctccttcccccc  
tccttgcccgctccagagcgcaacaaccattttcccagccaggagcacaccgtgtccac  
gcccacagcgatctcactgattggctcgggctcctggtaaacaaaggaccgggcagccaat  
gggagggatgtgcacgagggcagcagcagcctccgggccagcgtcgcgtggctcttctg  
gcccgggctactatagagacgtttccgcctcctgctgAAACTAACCCCTCTTTTCT  
CCAAAGGAGTGCTTGTGGAGATCGGATCTTTTCTCCAGCAATTGGGGAAAGAAGGCTTT  
TTCTCTGAATTAGCTTAGTGT
```

El papel de las especies reactivas de oxígeno en la señalización de Txnip y sus efectos en la muerte neuronal

Sequence Retrieval Tool

Get sequence TXNIP_2 from to bp relative to TSS
 lower case upstream TSS

```
>FP001593 TXNIP_2 :+U EU:NC; range -1000 to 100.  
gtgaaaagagtgaagcatccttttttcccgcttttcccttttccctccagaagcaggtagg  
aagtgggagataatgagcgcctggacacacctcactaaaggagtaatgaggtaaatgggg  
aacacagacaaaagtgttccccaaactttgcaggtagaaattgaagagatgacaggataagc  
aacaggatgtaaacacgcccctcctatttccgttccacagaacagagagaacagaagaga  
gggtacaagctgggggtgggtgacgaacagcacaggcaacgagccccagccctagcccc  
aagggattggaacgggaaggagaagacatcggtcctacacacacaatgaggcctgaaagt  
tctcctttccctcagagacgggtgggtggtttttatacttaatagggatgctgggcaagaga  
aggacaaaagggctgttcctgaacagtaacaccaagcattctgcgctccacagccccaaac  
ctgaaagtattcttgagctatgggattttcacacacttgcattttatgagccaggaata  
acgacaggctcctaaagtaactgcactggcctaagactaggcatgaaattccctcataagca  
cattttccttttacctcaaacaccgctctcagaccagaaaacgtccacaccgcccctccg  
atggcctgtgcacctggctagggttttagggctcagtggtatcctccttccactggaccgg  
gagaagacgctcaacagccccctccttcccctccttccctctccttcccttccccttccc  
tccctgcccgcctccagagcgaacaaccattttcccagccaggagcaaccggtgtccac  
gcgccacagcgatctcactgattgggtcgggctcctggtaaaacaggaccgggcagccaat  
gggagggatgtgcacgagggcagcacgagcctccgggcccagcgtcgcgtggctcttctg  
gcccgggctactatagagacgtttccgcctcctgcttgAAACTAACCCCTCTTTTCT  
CCAAAGGAGTGCTTGTGGAGATCGGATCTTTTCTCCAGCAATTGGGGGAAAGAAGGCTTT  
TTCTCTGAATTAGCTTAGTGT
```

Search Motif Tool

Library: Motif:
From: To: bp relative to TSS and a cut-off (p-value) of:

FOXO3 [p-value = 0.001]: -120, -611, -808

El papel de las especies reactivas de oxígeno en la señalización de Txnip y sus efectos en la muerte neuronal

Rattus Norvegicus

General Information	
Promoter ID:	Txnip_1
Promoter type:	single
Organism:	Rattus Norvegicus (rat)
Gene Symbol:	Txnip
Description of the gene:	thioredoxin interacting protein
Sequence:	agcgtcaagccaggcggtatataatgccgttccggctcccgtgacACTCTCCTCTT
Position in the genome:	Chromosome [NC_005101.4]; Strand [+]; Position [198683087]
Ensembl:	ENSRNOG00000021201
RefSeq:	NM_001008767
NCBI Gene:	Txnip

Sequence Retrieval Tool

Get sequence Txnip_1 from to bp relative to TSS

lower case upstream TSS

```
>FP002107 Txnip_1 :+U EU:NC; range -1000 to 100.
tgacaggaactcgggaacaaagtaaggagtgcagatcgttttcttctttttcttcccc
cctgtttgttgtttgtaccaccccttgtttctggaggagcagggacgaagggagaga
tcagtgtaaaggtacacacctcactaaaagctacagtgggtaaataagggaacatataca
aaatgttccccaacctcacaggtacactgaagagatgaggggataagcaacaggatgtgg
acactcccttactgcttccgttccagagaacagaaacagaatagaacgtaatgggagga
acaatagcagcacatagggcatggaaacgaaggggtacacaccagaccatgtaccaataag
gactttaagccagacttaaaatatctgacaagtccccgccccgggagatggaagcgtt
ttattcaatagaagtgaatgggagcacatcgggtaggctctttctcactaacacaactg
cactctcgccctccgctccatcctgaagtatccttggggattgtttttcacagacttgcg
aacttgtgagccaggaataaatggtcacgtcgaaatgaattgcgctggctaagacaggca
tgaaatcctctcctaagcacatttttcttttacctaaaaaagaaggggaaaaaaaccaa
caaagcacacacccaaacaaccagctcccagagaggagtaccctggatgaggttcagggt
ctcggggtcccagactcccagggagccaccgctgccccaggccccgcccctcctcct
ggcaaggctgpgcaccgcaacaacaaccattttccccgctaagagcactgtgtccaag
cgctctcgggcctcgctgattggttagaggcctggtaaacaaggaccaagtagccaatg
ggagaactgtgcagagggatgcacgagcctccgggccagcactcgctggagcgtcaag
ccaggcggctatataatgccgttccggctcccgttgcACTCTCCTCTTCTGGTCTTT
GGATATCCAGAGTTCTCCAGTTGCGAGAAAACAGCTGTTATTTTTCTCTGAAAGCTTT
TGGCACAACCAGCTGGTTGAA
```

El papel de las especies reactivas de oxígeno en la señalización de Txnip y sus efectos en la muerte neuronal

```
Get sequence Txnip_1 from -1000 to 100 bp relative to TSS
 lower case upstream TSS

>FP002107 Txnip_1 :+U EU:NC; range -1000 to 100.
tgacaggaactcgggaacaaagtaaggagtgcagatcggttttcttctttttcttcccc
cctgtttgttgtttgtacctcccttcttcttctgaggagcagggacgaaggagaga
tcagtgtaaaggtacacacctcactaaagctacagtgggtaataaggaacatataca
aaatgttccccaacctcacaggtacactgaagagatgaggggataagcaacaggatgtgg
aactcccttactgcttccgttccagagaacagaaacagaatagaacgtaatgggcgagga
acaatagcagcacatagggcatggaacgaaggggtacacaccagaccatgtaccaataag
gactttaagccagacttaaaatctctgacaagtcccccgccccgggagatggaagcgtt
ttattcaatagaagtgaatgggagcacatcggttaggctctttctactaacacaactg
cactctcgccctccgctccatcctgaagtatccttggggattgtttttcacagacttgcg
aactgtgagccaggaataaatggtcacgtcgaaatgaattgcgctggctaagacaggca
tgaatcctctcctaagcacatttttctttacctaataaaagaaggggaaaaaaccaa
caaagcacacacccaacaaccagctcccgagaggagtaccctggatgaggttcagggt
ctcgggtcccagactcccagaggagccaccgctgccccaggcccccccctcctcct
ggcaaggctcgcaccccgaacaacaaccattttccccgctaagagcacactgtgtccacg
cgctctcggcctcgctgatgggttagaggcctggtaacaaggaccaagtagccaatg
ggagaactgtgcacgagggatgcacgagcctccgggccagcactcgcgtaggagcgtcaag
ccaggcggctatataatgccgtttccggctcccgcttgacACTCTCTCTTCTGGTCTTT
GGATATCCAGAGTTCTCCAGTTGCGAGAAAACAGCTGTTATTTTTCTCTGAAAGCTTT
TGGCACACCAGCTGGTTGAA
```

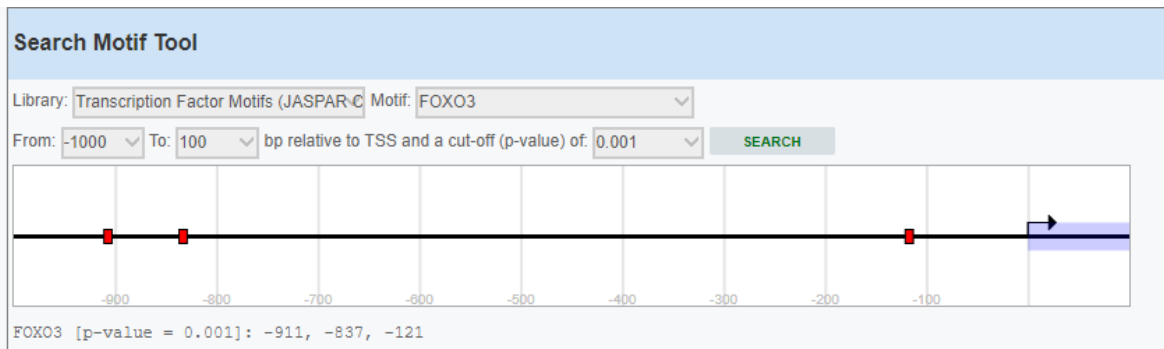


Figura suplementaria 1. Análisis del promotor de Txnip en *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* y *Homo sapiens* utilizando la base de datos Eukariotic promoter database <https://epd.epfl.ch> y los motivos para FOXO 1 y FOXO 3 reportados en JASPAR <https://jaspar.genereg.net>.

El papel de las especies reactivas de oxígeno en la señalización de Txnip y sus efectos en la muerte neuronal

SECUENCIA MENSAJERO DE TXNIP RAT NCBI

```

GGCACAAACCA GCTGGTTGAA ACTTTCAGGC ACCTTTTAGA GAAGTTGTTA AGGTTTTGTT
TGAGGCTTTC TTTGGGTTTT TAAGCCCTCT CTGCCTCACG GAGAGACTTA AGTTCCTAGT
TTGCTGAGAA GGATTCTGAA GAGTTTTTCC TCTCCGGCTT CCGTTTTTCT TGAACCCACT
CGGCTCAATC ATGGTGATGT TCAAGAAGAT CAAGTCTTTT GAGGTGGTCT TCAACGACCC
TGAGAAGGTG TATGGCAGCG GGGAGAAGGT GGCCGGCCGG GTGACAGTGG AAGTGTGTGA
AGTTACCCGA GTCAAAGCCG TCAGGATCCT GGCTTGCCGT GTGGCCAAGG TCCTGTGGAT
GCAAGGGTCT CAGCAGTGCA AACAGACCTT GGACTACTTG CGCTATGAAG ACACCCTTCT
CCTAGAAGAC CAGCCTACAG GTGAGAACGA GATGGTGATC ATGAGACCAG GAAACAAATA
TGAGTACAAG TTCGGCTTTG AGCTTCCTCA AGGGCCCCTG GGAACATCCT TCAAAGGGAA
ATATGGCTGT GTAGACTACT GGGTGAAGGC TTTTCTCGAT CGTCCCAGCC AGCCAACTCA
AGAGGCAAAG AAAA|ACTTTG AAGTGATGGA TCTAGTGGAC GTCAATACTC CTGACTTAAT
GGCACCAGTG TCTGCCAAA AGGAGAAGAA AGTTTCCTGC ATGTTCAATC CTGATGGACG
CGTGTCAATC TCCGCTCGAA TCGACAGAAA AGGATTCTGT GAAGGTGATG ACATTTCCAT
CCACGCTGAC TTTGAGAACA CATGTTCCCG AATCGTGGTC CCCAAAGCAG CTATTGTGGC
CCGGCACACT TACCTTGCCA ATGGCCAGAC CAAAGTGCTC ACTCAGAAGC TGTCCTCAGT
CAGAGGCAAT CACATTATCT CAGGGACTTG CGCATCATGG CGTGGCAAGA GTCTCCGAGT
GCAGAAGATC AGACCGTCCA TTCTGGGCTG CAACATCCTC AGAGTTGAAT ACTCCTT|GCT
GATCTATGTT AGTGTCCC|TG GCTCCAAGAA AGTCATCCTC GATCTGCCCC TAGTGATTGG
CAGCAGGTCT GGCCTAAGCA GCCGGACATC CAGCATGGCT AGCCGGACAA GCTCTGAAAT
GAGCTGGATA GACCTAAACA TCC|CAGACAC CCCAGAAGCT CCACCTTGCT ATATGGACGT
GATTCCTGAA GATCACAGAC TGGAGAGCCC CACCACCCCC CTGCTAGATG ATGTGGATGA
TTCTCAAGAC AGCCCTATCT TTAGTACGC CCCCAGATTG CAGTTCATGC CTCGCCCCAC
TTACTACTGAG GTGGATCCCT GCGTCCTTAA CAACAACAAC AACAAACGTGC AGTGAGCCTT
CAGGGACGAC TCATCTGTAC TACTCAACGC TTTCTGCCTC TCTGCTTGAA CTCCAATGTT
TCAGAGACTC AGTCTCTCCA GTGGGGAGTG GGTACACCCC CGCCTCTGAC TCCACAGATG

```

SECUENCIA CODIFICANTE

SECUENCIA BLANCO DE SIRNA1 RSH045604-31-LVRU6GP CCAACTCA
AGAGGCAAAG AAA|

SECUENCIA BLANCO SIRNA 2 RSH045604-32-LVRU6GP GCTGATCTATGTTAGTGTCCC

SECUENCIA BLANCO SIRNA 3 RSH045604-33-LVRU6GP GCTGGATAGACCTAAACATCC

SECUENCIA BLANCO SIRNA 4 RSH045604-34-LVRU6GP CCTGCGTCCTTAACAACAACA

Figura suplementaria 2. Sitios de reconocimientos de las diferentes secuencias de shRNA de *Txnip* en la secuencia del mRNA

El papel de las especies reactivas de oxígeno en la señalización de Txnip y sus efectos en la muerte neuronal

BLAST ENTRE SECUENCIA ISOFORMA 2 HUMANO (arriba) Y RATA TXNIP (abajo)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1168 bits(632)	0.0	826/923(89%)	0/923(0%)	Plus/Plus
Query 79				
Subject 244				
Query 139				
Subject 304				
Query 199				
Subject 364				
Query 259				
Subject 424				
Query 319				
Subject 484				
Query 379				
Subject 544				

Figura suplementaria 3. Blast entre la secuencia de *Txnip* de humano y rata en el sitio de reconocimiento de la secuencia 1 del shRNA contra *Txnip*. La identidad de las secuencias de *Txnip* de rata y humano es de 89%, los sitios de reconocimiento del shRNA1 se mantienen conservados con solo 1 gap al interior de la secuencia.



OPEN ACCESS

EDITED BY

Angeles Tecalco,
Universidad Autónoma de la Ciudad de México,
Mexico

REVIEWED BY

Eun Hee Ahn,
Hallym University, Republic of Korea
Sung Min Han,
University of Florida, United States

*CORRESPONDENCE

Julio Morán
✉ jmoran@ifc.unam.mx

RECEIVED 23 April 2023

ACCEPTED 06 July 2023

PUBLISHED 20 July 2023

CITATION

García-Hernández B and Morán J (2023) *Txnip* expression promotes JNK-mediated neuronal death in response to reactive oxygen species. *Front. Mol. Neurosci.* 16:1210962. doi: 10.3389/fnmol.2023.1210962

COPYRIGHT

© 2023 García-Hernández and Morán. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Txnip expression promotes JNK-mediated neuronal death in response to reactive oxygen species

Brenda García-Hernández and Julio Morán*

División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

TXNIP is a protein sensitive to oxidant conditions whose expression is related to the progression of death in cancer, diabetes, ischemia, and neurodegenerative diseases, among others. Because of this, many studies propose TXNIP as a therapeutic target in several diseases. Exposure of cerebellar granule neurons to staurosporine or low potassium leads to apoptotic death. Both conditions generate an early production of reactive oxygen species (ROS) that induces the activation of the ASK1 pathway and the apoptotic machinery. In these models, it has been shown an increase in TXNIP protein mediated by ROS. Here, we evaluated the molecular mechanisms involved in the regulation of the *Txnip* expression during neuronal death, as well as the role of the protein in the progression of cell death induced by these two apoptotic conditions. In cultured cerebellar granule neurons, we observed that low potassium and staurosporine induced an early increase in ROS that correlated with an increase in *Txnip* mRNA. When we evaluated the promoter of the gene, we found that the JASPAR-reported FOXO1/3 transcription factor motifs are close to the transcription start site (TSS). We then verified through the Chromatin immunoprecipitation technique (ChIP) that FOXO3 interacts with the *Txnip* promoter after 1 h of low potassium treatment. We also detected FOXO3 nuclear translocation by low potassium and staurosporine treatments. Finally, by using shRNA in the neuroblastoma MSN cell line, we found that *Txnip* downregulation decreased neuronal death induced by staurosporine stimulus. Together, these results suggest that ROS promotes the expression of *Txnip* through the activation of the FOXO3 transcription factor mediated by Akt inhibition. We also demonstrated that TXNIP is necessary for neuronal death progression.

KEYWORDS

Thioredoxin Interacting Protein, FOXO3, reactive oxygen species, apoptosis, cerebellar granule neurons, MAPK, Akt

1. Introduction

Thioredoxin Interacting Protein (TXNIP) is a member of the arresting protein family that presents two arrestin-like domains and four splicing variants in humans (Tsubaki et al., 2020). The gene sequence in humans, mice, and rats is highly conserved. The protein in humans and mice shares close sequence homology (96%) suggesting its relevance in cell signaling (Singh, 2013; Zhou and Chng, 2013). TXNIP is considered a death inductor in pancreatic beta cells and its expression levels correlate with the grade, stage, and metastasis capacity in breast cancer,

hepatocellular cancer, bladder cancer, and leukemia (Zhou et al., 2010; Yoshihara et al., 2013; Zhou and Chng, 2013). For this reason, it is recognized as a tumor suppressor molecule (Zhou and Chng, 2013). TXNIP can bind thioredoxin (Trx) forming a complex that is called redoxosome, which participates in modulating different processes by sensing the redox environment. In previous studies, it was found that TXNIP expression is markedly increased in cerebellar granule neurons (CGN) in response to apoptotic conditions induced by low potassium (K5) (Saitoh et al., 2001; Zaragoza-Campillo and Morán, 2017) or staurosporine (Sts) (Zaragoza-Campillo and Morán, 2017). Furthermore, we have also previously found that TXNIP protein induction is dependent on reactive oxygen species (ROS) production in this model (Zaragoza-Campillo and Morán, 2017).

Reactive oxygen species (ROS) are molecules resulting from the sequential reduction of molecular oxygen (Lambeth, 2004; Covarrubias et al., 2008; Olguín-Albuérne and Morán, 2018). When ROS levels increase above physiological concentrations, generalized cell damage and death occur. This condition is known as oxidative stress. However, under low concentrations, ROS may participate as signaling molecules through the specific and reversible oxidations of several proteins depending on cell type and the cellular context, among others. In this regard, ROS may induce post-translational modifications and modulate several cellular events, including proliferation, differentiation, and cell death (Finkel, 2011; Olguín-Albuérne and Morán, 2018).

In previous studies, we observed an early increase in ROS production during apoptotic death of NGC induced by K5 and Sts (Valencia and Morán, 2001; Cid-Castro and Morán, 2021). In this early phase of apoptotic death, we also observed an Akt inactivation in both models, which was dependent on ROS increase (Zaragoza-Campillo and Morán, 2017). On the other hand, we demonstrated that apoptotic death induced by K5 and Sts also activated the mitogen-activated protein kinases (MAPK) pathway during the first hours of the process, particularly JNK and p38, whose pharmacological inhibition markedly reduced neuronal death (Ramiro-Cortés and Morán, 2009; Ramiro-Cortés et al., 2011).

There is not enough information about the role of TXNIP in neuronal death and whether this molecule could be related to the activation of the MAPK pathway during cell death. It is possible that TXNIP could recruit Trx from ASK1, which would lead to the activation of the MAPK pathway and, consequently, to neuronal death. ASK1 is a member of the MAPK family, which is inactive when bound to Trx. When Trx dissociates from this complex, an active form of ASK1 is produced and then the JNK and p38 signaling pathways are activated (Yoshihara et al., 2013). Together, these cascades of events ultimately lead to the execution of the cell death program. Thus, the ROS-TXNIP-Trx-ASK1-JNK/p38 cascade may play a critical role in the activation of apoptosis (Shen and Pervaiz, 2006; Zhou and Chng, 2013).

It has been established that *Txnip* promoters share common motifs for different transcription factors such as CREB, NFκB, HIF1α, GR, and FOXOs (Wang et al., 2006; Baker et al., 2008; Tsubaki et al., 2020) and direct evidence in neurons shows a possible involvement of the FOXO family of transcription factors in cell development, apoptosis (Papadia et al., 2008; Webb et al., 2016), oxidative stress, and autophagy transcriptional responses (van der Heide et al., 2004; Tzivion and Hay, 2011; Hemmings and Restuccia, 2012). In neurons, FOXO1 and FOXO3 could be responsible for *Txnip*

up-regulation (Papadia et al., 2008; Webb et al., 2016). In addition, FOXOs can be regulated by Akt through the phosphorylation of specific amino acid residues. FOXO3 presents Akt motifs in Thr 32, Ser 253, and Ser 315 and FOXO1 in Ser 256, Thr 24, and Ser 319. Phosphorylated FOXOs are chaperoned by 14-3-3 protein, hiding the FOXO-DNA binding sites, recruiting it in the cytoplasm, and inhibiting its function. Therefore, Akt inactivation is crucial for FOXO transcriptional activity through this pathway. Non-phosphorylated FOXO translocates to the nucleus and induces the expression of target genes (Taylor et al., 2015; Zhang et al., 2019).

As mentioned above, there is not much information on the transcriptional regulation of *Txnip* and the involvement of the protein in CGN death initiation/progression. Thus, the aim of this work is to describe the regulation of its expression during neuronal death induced by K5 and Sts, evaluate the mechanisms of FOXO transcription factors in *Txnip* regulation, and explore the role of TXNIP in neuronal death.

2. Materials and methods

Fetal calf serum, penicillin/streptomycin, basal Eagle's- and RPMI- medium were from GIBCO (Grand Island, NY, United States). Dihydroethidium (DHEt) and calcein-AM were purchased from Molecular Probes (Eugene, OR, United States). Trizol reagent, M-MVL reverse transcriptase and Oligo (dT) were from Invitrogen (Carlsbad, CA, United States). Poly-L-lysine (mol. wt. > 300,000), trypsin, trypsin inhibitor, DNase, cytosine arabinoside, DMSO, staurosporine, and LY294002 were acquired from Sigma (St. Louis, MO, United States). Peroxidase-conjugated anti-mouse was purchased from Jackson Immuno Research (West Grove, PA, United States). Protease inhibitor cocktail tablets (Complete) were purchased from Roche (Mannheim, Germany). TXNIP rabbit antibody (D5F3E) and Alexa 488 antibody (4412S) were acquired from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, United States). Vectashield mounting medium with DAPI was from Vector Laboratories (Burlingame, CA, United States). shRNA *Txnip* (RSH045604) was purchased from GeneCopoeia, and Oligo DT and DNTPs were from Thermo Fisher Scientific (Carlsbad, CA, United States). MasterMix qPCR ROX PyroTaq EvaGreen 5x was from Biotium. Hydrogen peroxide, Dynabeads. FOXO1 (ab39670), FOXO3A (ab12162), and ChIP-grade antibodies were purchased from Abcam. ChIP primers were purchased from Sigma (St. Louis, MO, United States) and FOXO3 antibody for immunofluorescence was acquired from Cell Signaling (Danvers, MA, United States). JNK inhibitor SP600125 was purchased from Tocris (Ellisville, MO, United States). Reverse transcriptase was acquired from Invitrogen™ (Carlsbad, CA, United States). ProSieve QuadColor protein marker and Nucleofector VPI-1003 were from Lonza (Basel, Switzerland).

2.1. Cell culture

All animals used for the experimentation were treated in accordance with the accepted standards of animal care and with the procedures approved by the local Committee of Research and Ethics of the Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (protocol number: JMA175-21). The protocol used

followed the Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience as well as guidelines released by the Mexican Institutes of Health Research and the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals. All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used.

Cerebellar granule neurons (CGN) cultures were prepared as previously described (Moran and Patel, 1989). CGN were obtained from 8-day-old Wistar rats or from 4-day-olds in ICR mice cerebellum and plated at a 265×10^3 cell/cm² density in plastic dishes coated previously with poly-L-lysine (5 µg/mL). The culture medium contained basal Eagle's medium supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum, 2 mM glutamine, 25 mM KCl, 50 µg/mL streptomycin, and 50 U/mL penicillin. Cytosine arabinoside (10 µM) was added 24 h after seeding to prevent the proliferation of nonneuronal cells. Cultures were maintained under these conditions for 8 days and kept at 37°C in an atmosphere of CO₂ (5%) and saturated air with water vapor (95%). At the end of the preparation, CGN cultures contained approximately 95% neurons. Apoptotic death of CGN was induced by two different stimuli: serum-free medium containing 5 mM KCl (K5) or by 0.5 µM staurosporine (Sts) administration. In the CGN viability assays with short exposure to K5 and Sts we used K25 conditioned medium to prevent neuronal death by fresh medium, as has been observed.

A human MSN neuroblastoma cell line was donated by Dr. Clorinda Arias from the Institute of Biomedical Science of the National Autonomous University of Mexico. The cell line was cultured in accordance with Ferrera et al. (2017). Adherent MSN cells were seeded in a monolayer with RPMI 160 medium supplemented with 10% of fetal bovine serum (Gibco, Life Technologies Corporation, Grand Island, NY, United States), 1% of non-essential MEM, and 1% glutamine-serine-asparagine. The cells were maintained in humidified incubation with 95% of air and 5% of CO₂ and 37°C. The cells were seeded in a density of 1×10^6 cells/100 mm dish (Reynolds et al., 1986).

2.2. Reactive oxygen species quantification

ROS levels were quantified by dihydroethidium. DHE is a fluorogenic probe for the detection of intracellular superoxide that is oxidized to ethidium and intercalates into nucleic acids emitting fluorescence at 610 nm (Cho and Hwang, 2011). DHE is irreversibly oxidized and therefore the signal obtained is the result of the sum of the previous accumulation. CGN were seeded in a multi-well plate and treated with 10 µM dihydroethidium (DHEt) for 30 min at 37°C. Cells were observed in an epifluorescence microscope with a rhodamine filter with a wavelength of 488–515 nm. DHEt diffuses into cells and is oxidized by ROS in the cytosol producing ethidium and 2-hydroxy ethidium that binds to the DNA and emits bright red fluorescence. Fluorescence images were acquired, and fluorescence intensity was measured with the Image J Program. The data were normalized with respect to K25 conditions.

2.3. Cell viability

Cell viability was measured by calcein-AM accumulation and propidium iodide (PI) exclusion to stain live and dead cells, respectively. Endogenous esterases in living cells transform

calcein-AM to calcein, a green-fluorescent product. The PI crosses the plasma membrane of damaged cells; it binds to DNA and double-stranded RNA by intercalation and emits an intense red fluorescence signal. This dye shows weak fluorescence when it is not bound and in an aqueous solution. Cells were incubated with calcein-AM (1 µM) and PI (40 µM) for 30 min at 37°C and were observed in an epifluorescence microscope. Stained cells were counted with Image J software.

2.4. RT-qPCR

Cerebellar Granule Neurons cultured for 7 days were used after treatments with K5, staurosporine, LY4002902 (30–100 µM), or hydrogen peroxide 100 µM. After harvesting the cells, total RNA was purified using TRIzol reagent and 0.5 µM of total RNA was reverse transcribed to cDNA by using Reverse aid Reverse Transcriptase (Thermo Scientific) and Oligo DT. A measure of 50 ng cDNA was used for qPCR and the MasterMix qPCR ROx PyroTaq EvaGreen 5x. Primer sequences were used at 10 µM. TXNIP forward 5' GGCTGGGGTGTGTTTGA 3' Reverse 5' GCGCAGGAAAATAAGATGA GAPDH Forward 5' CTCATGAC CACAGTCCATGC 3' Reverse 5' TTCAGCTCTGGGATGACCTT 3'. PCR assays were performed in three replicates in each group. All results were analyzed by the Delta Ct method.

2.5. Promoter analysis

Promoter analysis was performed by using the NCBI database for the Txnip gene sequence. Two motifs reported by the JASPAR database for FOXO1 and FOXO3 in mice were searched. We analyzed the promoter by using NCBI upstream sequence for the *Txnip* gene in mice (accession number NM_023719). First, we localized the E-box sequences in the promoter and determined the transcription start site (TSS) using JASPAR-reported FOXO motifs in mice¹ and we found two motifs close to the TSS -1,000 nt upstream. The first is located at -560 nt and is specific for FOXO1 and we named it motif 1; the second, at -260 nt is common for FOXO1 and FOXO3 and we named it motif 2. We then analyzed promoter sequences in humans and rats (NCBI accession number NM_006472 and NM_001008767) and we found that these motifs are conserved across these species.

2.6. Chromatin immunoprecipitation FOXO 3 in *Txnip* promoter

We used 1×10^7 neurons of 7 DIV for each experimental condition: K25, K5, for 30 and 60 min and 100 µM hydrogen peroxide for 1 h. Cells were crosslinked with 1.1% formaldehyde for 10 min. The formaldehyde linking was quenched by adding 125 mM glycine for 10 min. Cells were pelleted and rinsed once in cold phosphate-buffered saline (PBS). Nuclear pellets were obtained by using RIPA buffer (50 mM Tris HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% deoxycholate 0.1% SDS, and Complete protease inhibitor cocktail

¹ <https://epd.epfl.ch/index.php>

(Roche)) and sonicated with a sonicator (Branson Analog) set at 400 w power and ½ mm point out the power of 10% with 8 cycles of 15 s ON/30 s OFF. Sonicated chromatin was centrifugated at 13,000 rpm for 15 min. A binding buffer was used (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 300 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 8.0, 0.5% SDS). Chromatin was incubated overnight at 4°C with 5 µg/sample of FOXO 1 polyclonal anti-rabbit (ab39670) and FOXO 3 polyclonal anti-rabbit ab12162 or with TFII ab as a control. The antibody was incubated overnight at 4°C in rotation. Dynabeads (Thermo Scientific) was used to immunoprecipitate. The beads were washed three times with binding buffer, precipitated on the magnetic strip, and resuspended in the same volume with binding buffer. The beads were washed with the following buffers: low salt buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.1, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 0.1% sodium deoxycholate), high salt buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.1, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% SDS, 1% triton X-100, 0.1% sodium deoxycholate), LiCl salt buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.1, 1 mM EDTA, pH 8.0, 1% NP-40, 0.7% sodium deoxycholate, 500 mM LiCl₂) and TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0). All samples had 16 µl of 5 M NaCl added. We incubated samples overnight at 65°C with shaking to remove protein-DNA interaction. DNA was purified with phenol: chloroform including the input samples. PCR was performed as described above. Motif 1 FOXO1 forward 5' GGCTGGGGGTGTTGTTTA 3' Reverse 5'GCGCAGGAAAATA AAGATGA 3' Motif 2 FOXO's forward 5' TAAAACAAGGGCCA AGTAGCC 3' Reverse 5' ATATAGCCGCCTGGCTTG 3'.

2.7. Immunofluorescence

Anti-FOXO3 cell signaling antibody (D19A7) and secondary antibody with Alexa Fluor 488 anti-rabbit cell signaling (4412S) were used. Cells were grown on glass coverslips in a 12-well plate over a 5 x PLL layer, maintained in K25 medium for 7DIV, and treated with the PI3K inhibitor LY294002 (100 µM for 4 h) were treated with K5 medium or Sts (0.5 µM) for 30, 60 or 120 min or treated with 100 µM hydrogen peroxide for 1 h. Subsequently, the cells were washed three times with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min at room temperature, washed three times with PBS, and blocked with 3% serum-0.2% triton-PBS for 2 h at room temperature. The primary antibody was incubated (1:500) in 3% goat serum PBS-T solution overnight. The secondary antibody coupled to Alexa 488 (1:1000) was incubated for 1 h at room temperature in the dark. Vectashied mounting medium with DAPI was used. The images were captured in a Zeiss LSM800 confocal microscope and images were taken in Z Pearson's colocalization coefficient was measured by using the JACoP plugin for Image J.

2.8. Cell electroporation

The MSN neuroblastoma cells were transfected before plating with shRNA TXNIP using the nucleofection electroporation technique with the Amaxa VP1003 kit using the C-13 program. GFP reporter-TXNIP shRNA and a scramble control sequence (Scr) were transfected. For every 4 million cells, 5 µg of the Maxiprep-purified plasmid was used. Cells were plated in 35 mm Costar dishes. The transfection efficiency was evaluated at 48 h with an epifluorescence

microscope as the total number of GFP-positive cells relative to the total number of cells. The transfection efficiency was 28% for both scramble and shRNA transfected cells.

2.9. Western blot

Neuroblastoma MSN cells were cultured and transfected as previously described and after 48 h cells were washed with cool PBS buffer and homogenized with RIPA lysis buffer (25 mM Trizma, 50 mM NaCl, 2% Igepal, 0.2% SDS, pH 7.4) with complete protease inhibitor (Roche), phosphatase inhibitor (Roche) and 50 mM NaF. Cells were sonicated for 30 s with 30% of sonication potency and centrifuged at 4,5000 rpm for 5 min. Protein content was determined by Lowry assay. Electrophoresis was performed on 10% SDS-PAGE with 20 µg per well. Gels were transferred onto PVDF membranes at 300 mA for 1 h. Membranes were blocked with TTBS buffer (100 mM Tri-HCl, 150 mM NaCl and 0.1% Tween, pH 7.4) with 5% fat-free milk for 1 h under shaking at room temperature. Cell signaling TXNIP rabbit antibody (D5F3E) (1:1000) and peroxidase-conjugated anti-rabbit (1:10,000) were used.

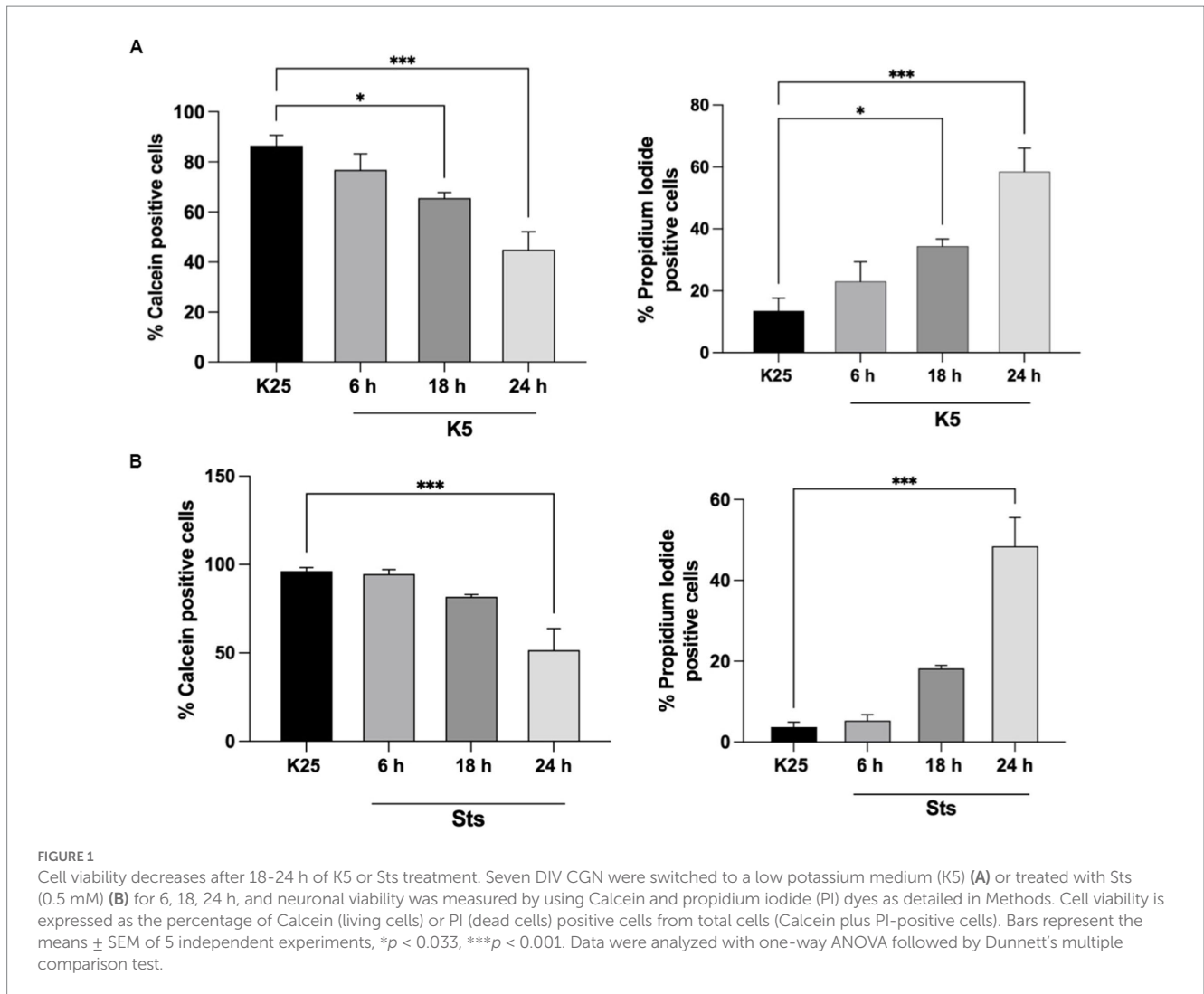
2.10. Statistical analysis

Data are presented as the mean ± the standard error of the mean. The Prism Graph 8.1 program was used to perform the statistical analysis of the experiments. The normal distribution of the data was determined with a Shapiro-Wilks test. Viability experiments are presented as a percentage normalized to K25. PCR data are normalized to the GAPDH levels and the K25 control relative to 1 and ChIP data were normalized to the background. Statistical significance was determined as $p < 0.05$. p values are represented as NEJM style * $p < 0.033$, ** $p < 0.002$, *** $p < 0.001$. Data were analyzed by using the ANOVA test followed by Dunnett's *post hoc* test. For multivariable data such as ChIP and TXNIP shRNA viability assay, a two-way ANOVA followed by Tukey's test or Sidak's test was used.

3. Results

3.1. Staurosporine and low potassium induce neuronal death

CGN was treated with low potassium (5 mM) or staurosporine (0.5 µM) during 6–24 h and then neuronal viability was evaluated with calcein and propidium iodide as indicated in Methods. In line with previous studies (Valencia and Morán, 2001; Guemez-Gamboa and Morán, 2009; Ramiro-Cortés and Morán, 2009; Zaragoza-Campillo and Morán, 2017; Cid-Castro and Morán, 2021) we found a decrease in cell viability of 20% after 6 h of treatment with low potassium (K5) and by 60% after 24 h. In the case of staurosporine, we observed about 60% of cell death after 24 h of treatment. Therefore, the temporary window in which death is executed is from 18 to 24 h after the treatments (Figure 1). To know the minimal time required to activate the death process, we exposed CGN to K5 for short periods of time and then evaluated cell death after 24 h. When we evaluated calcein fluorescence we found that 1–3 h of treatment induce about 40–50%



cell death 24 h later. However, when cells were treated for 5 h the cell death increased to 75–80%, which was similar to the cell death observed for continuous treatment during 24 h (Figure 2). Similar results were observed with Sts treated cultures; however, unlike K5, due to the chemical nature of Sts, it could be more difficult to thoroughly wash off the drug and prevent it from remaining longer in the preparation. When cells were treated with 100 μ M H₂O₂ for 1 h, cell death was about 90% 24 h later.

3.2. Cell death conditions generate ROS

To evaluate ROS dynamics under cell death conditions, neuronal cultures were maintained in K25 medium for 7 DIV and then cells were switched to K5 medium or treated with staurosporine (0.5 μ M) from 30 min to 5 h and ROS levels were measured with dihydroethidium (DHE) according to Material and methods. As previously reported (Valencia and Morán, 2001; Ramiro-Cortés and Morán, 2009; Zaragoza-Campillo and Morán, 2017), neurons treated with K5 showed a tendency to increase ROS levels from 30 min; however, we observed a statistically significant increase of 1,500% after 3 h that continued increasing after 5 h (Figure 3A). Similar results were observed for Sts. In this case, an increase of ROS production was also observed from 30 min,

and after 3 h it was detected a significant increase of 900%, but the maximal ROS production was observed after 4 h (Figure 3B). We used 100 μ M H₂O₂ for 1 h as a positive control and we observed that H₂O₂ increased the DHE signal by 2000% (Figure 3A). These data indicate that ROS are produced early, several hours (15 h) before neuronal death (Figure 3).

3.3. Death conditions and H₂O₂ induce *Txnip* expression

Our group previously found that TXNIP protein expression was induced by K5 and Sts (Zaragoza-Campillo and Morán, 2017). Furthermore, in that study, we demonstrated that TXNIP was also upregulated by ROS and that the antioxidant treatment decreased TXNIP levels induced by K5 and Sts (Zaragoza-Campillo and Morán, 2017). Here, we found that *Txnip* mRNA levels are also regulated by K5, Sts, and H₂O₂ (Figure 4). Cells were treated with K5 or Sts for 30 min to 5 h or with 100 μ M H₂O₂ for 1 h. For K5, we found that *Txnip* levels showed a maximal increase after 2 h (about 20-fold) that decreased at 3 h, reaching an 8-fold increase after 4 and 5 h (Figure 4A).

When cells were treated with Sts, *Txnip* levels increased after 3 h (about 12-fold) and remained without change after 4 and 5 h of

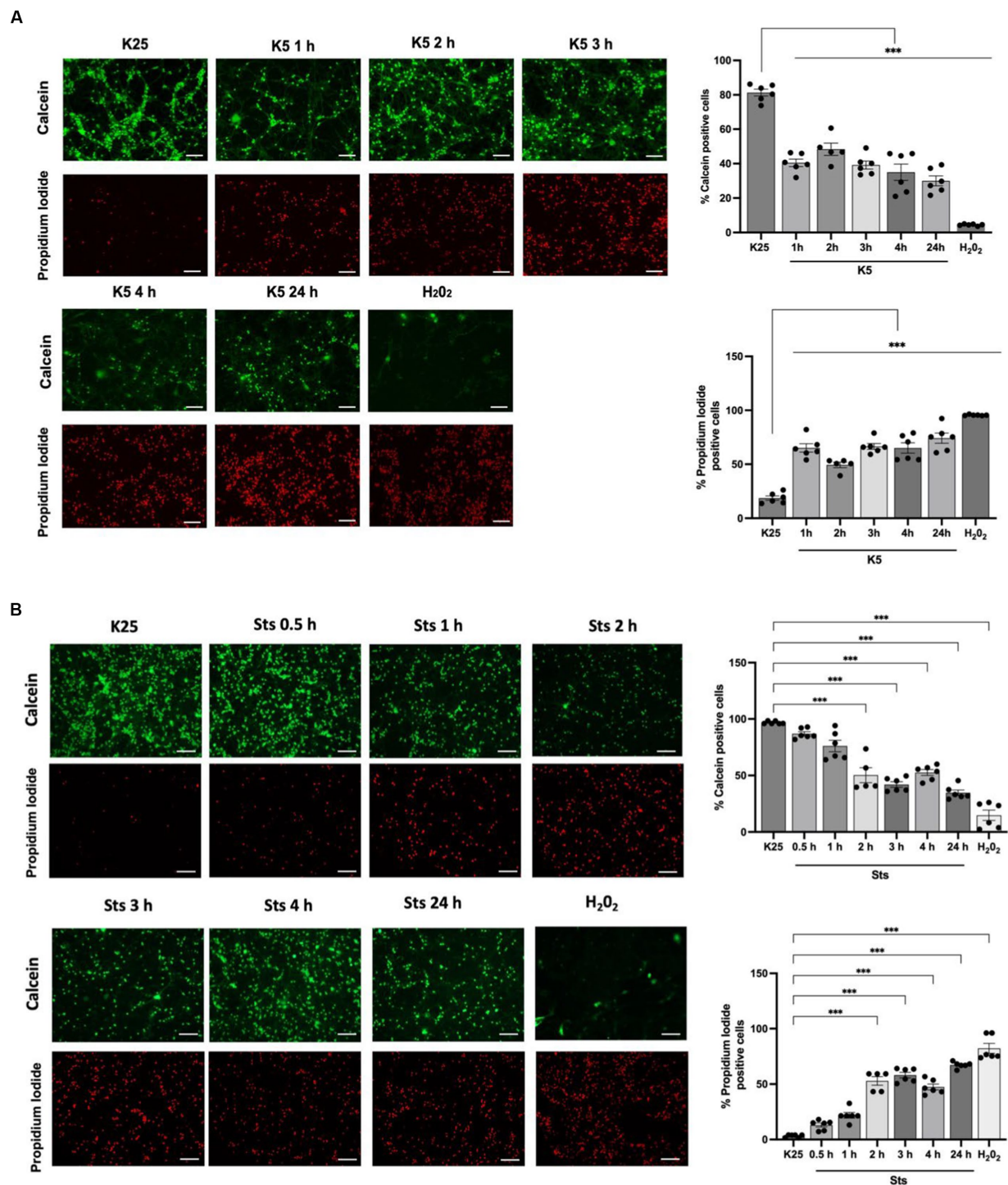


FIGURE 2
 CGN are partially rescued when cells are returned to basal conditions after 1–24h of K5 or Sts treatment. Seven DIV CGN were switched to a low potassium medium (5mM KCl, K5) (A) or treated with Sts (0.5μM) (B) for 1 to 5h or with 100μM H₂O₂ for 1h and then cells were transferred to K25 medium, and neuronal viability was measured at 24h by using calcein and propidium iodide (PI) dyes as detailed in Methods. The panel shows representative micrographs for each condition. Graphs show cell viability expressed as the percentage of calcein (living cells) or PI (dead cells) positive cells from total cells (calcein plus PI-positive cells). Bars represent the means ± SEM and the distribution of 3 independent experiments carried out by duplicate. ****p* < 0.001. Data were analyzed with One way ANOVA followed by Dunnett’s multiple comparison test. Bars in the panels represent 100μm.

treatment (Figure 4B). To explore a possible involvement of Akt in the expression of *Txnip* we tested the effect of LY294002, an inhibitor of the IP3/Akt pathway. The inhibitor showed a dose-dependent increase of the *Txnip* levels (about 2 to 8-fold) after 4h of treatment, supporting

the idea that Akt is part of the signaling pathway (Figure 4C). Finally, we found that *Txnip* is 4-fold upregulated after 1h of H₂O₂ treatment. To determine if there is an earlier response to the H₂O₂ we performed a temporal curve with H₂O₂ from 10 to 60 min. Under these conditions,

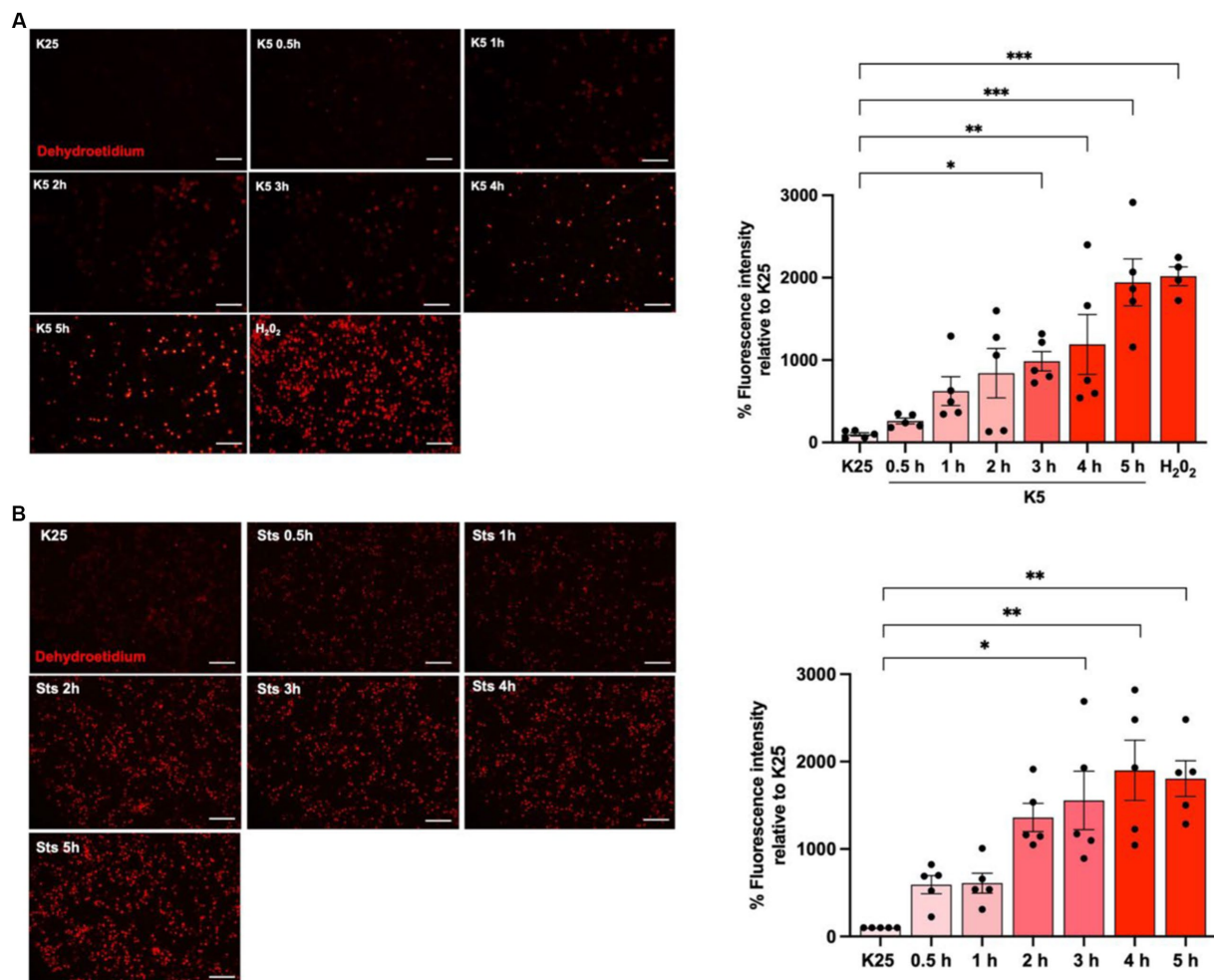


FIGURE 3
K5 and Sts induce reactive oxygen species generation. CGN grown in K25 medium were (A) transferred to a low potassium medium (K5) or (B) treated with staurosporine (0.5 mM, Sts) for 30 min to 5 h. Dihydroethidium was used to detect ROS as detailed in Methods. ROS levels are expressed as the percentage of fluorescence intensity of ethidium relative to K25. Treatment with H₂O₂ for 1 h (100 mM) was used as a positive control. Bars represent the means \pm SEM and the distribution of 3 independent experiments carried out by duplicate. * $p < 0.033$, ** $p < 0.002$, *** $p < 0.001$, significantly different from K25. Data were analyzed with One way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test. The bar in the panels represents 100 μ m.

Txnip levels showed a 17-fold increase after the first 10 min and a 24-fold increase at 20 min and after this time *Txnip* levels remained without change (4 to 5-fold increase) (Figure 4D). These data confirm that *Txnip* regulation is dependent on oxidant conditions and Akt inactivation.

3.4. FOXO 3 interacts with the *Txnip* promoter

As mentioned before, Akt inactivation induces *Txnip* mRNA expression (Figure 4). It is also known that *Txnip* promoters share common motifs for different transcription factors, including FOXO (Wang et al., 2006; Baker et al., 2008; Tsubaki et al., 2020), whose activity seems to depend on the inactivation of Akt. To test a direct regulation of *Txnip* gene by FOXO, we performed a Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay for FOXO1 and FOXO3 in mice

CGN cultures as detailed in Methods. We analyzed the promoter sequences in humans and rats (NCBI accession number NM_006472 and NM_001008767), and we found that these motifs are conserved across these species (Figure 5A). Neurons were switched to K5 medium or treated with 100 μ M H₂O₂ for 1 h. Amplification regions were designed for the two putative FOXO binding sites. The ChIP experiment revealed that endogenous FOXO3 associates with the *Txnip* promoter in motif 2 after 1 h of K5 treatment (Figures 5B,C). We used primers for *Bdnf* motifs and antibodies against TFII as a control. The untreated neurons showed a small enrichment in comparison with K5 after 1 h. We have not found conclusive data for FOXO 1 (data not shown). Interestingly, the enrichment levels with the treatment of 100 μ M H₂O₂ for 1 h did not show a significant difference with K25 (control; Figure 5C). Since the TXNIP protein is increased by the same treatment with H₂O₂ (Zaragoza-Campillo and Morán, 2017), ChIP data suggest that the gene is induced earlier and is a transient response.

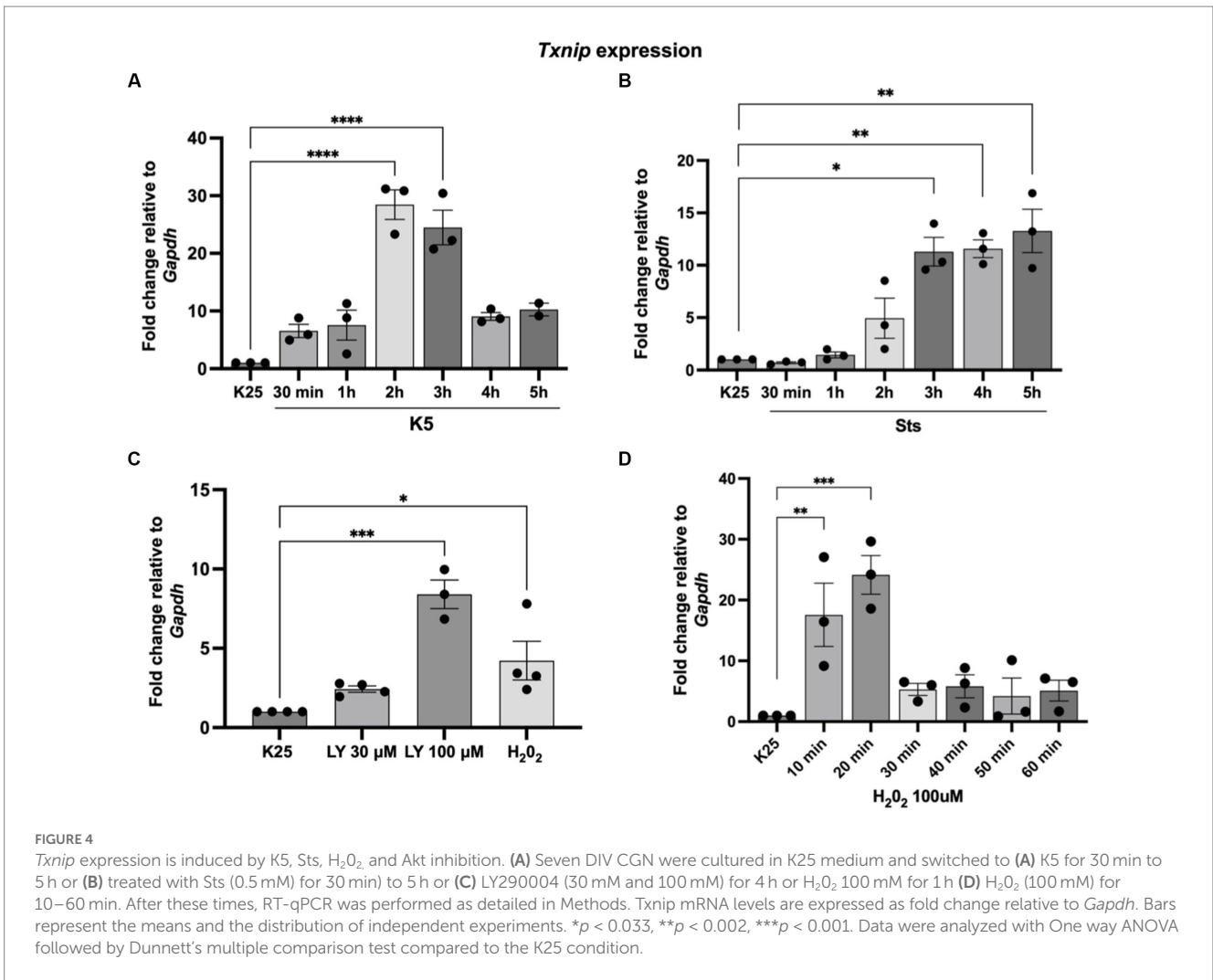


FIGURE 4

Txnip expression is induced by K5, Sts, H₂O₂ and Akt inhibition. (A) Seven DIV CGN were cultured in K25 medium and switched to (A) K5 for 30 min to 5 h or (B) treated with Sts (0.5 mM) for 30 min to 5 h or (C) LY290004 (30 mM and 100 mM) for 4 h or H₂O₂ 100 mM for 1 h (D) H₂O₂ (100 mM) for 10–60 min. After these times, RT-qPCR was performed as detailed in Methods. *Txnip* mRNA levels are expressed as fold change relative to *Gapdh*. Bars represent the means and the distribution of independent experiments. **p* < 0.033, ***p* < 0.002, ****p* < 0.001. Data were analyzed with One way ANOVA followed by Dunnett’s multiple comparison test compared to the K25 condition.

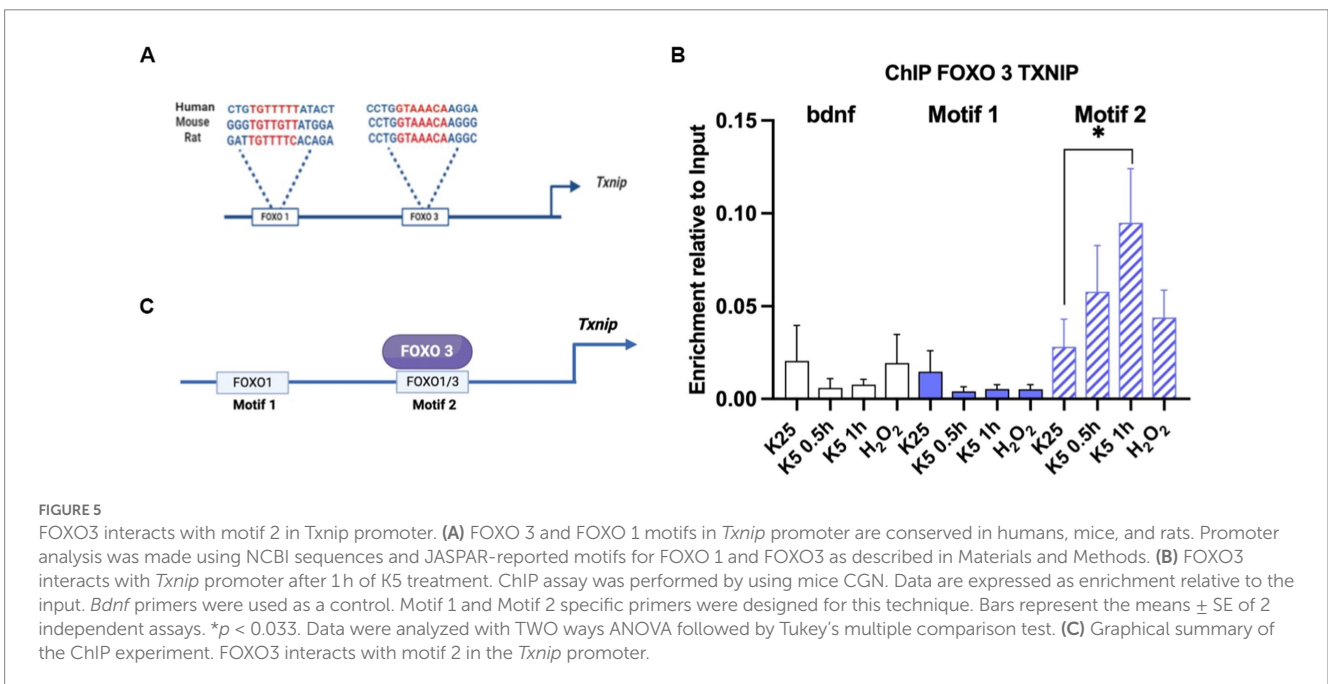


FIGURE 5

FOXO3 interacts with motif 2 in *Txnip* promoter. (A) FOXO 3 and FOXO 1 motifs in *Txnip* promoter are conserved in humans, mice, and rats. Promoter analysis was made using NCBI sequences and JASPAR-reported motifs for FOXO 1 and FOXO3 as described in Materials and Methods. (B) FOXO3 interacts with *Txnip* promoter after 1 h of K5 treatment. ChIP assay was performed by using mice CGN. Data are expressed as enrichment relative to the input. *Bdnf* primers were used as a control. Motif 1 and Motif 2 specific primers were designed for this technique. Bars represent the means \pm SE of 2 independent assays. **p* < 0.033. Data were analyzed with TWO ways ANOVA followed by Tukey’s multiple comparison test. (C) Graphical summary of the ChIP experiment. FOXO3 interacts with motif 2 in the *Txnip* promoter.

3.5. FOXO 3 switches to the nucleus in response to death conditions and H₂O₂

To identify FOXO3 localization during the death conditions and considering the *Txnip* expression data obtained (Figure 4), we performed a FOXO3 immunofluorescence of CGN treated with K5 and Sts during 30-, 60-, 120-, or 180-min. Figure 6A shows that under control conditions (K25) FOXO3 is mainly distributed in the cytoplasm. This is more evident in the inset where nucleus amplification is shown (Figure 6A). Pearson's colocalization coefficient in this condition is 0.2 (Figure 6A graph). When cells were switched to a K5 medium, the FOXO3 signal increased in the nucleus, being evident after 2 h of K5 treatment (Figure 6A, arrows) with a

colocalization coefficient of 0.4 (Figure 6A graph). The localization of FOXO3 in the nucleus after treatment with 100 μM H₂O₂ for 1 h showed a high Pearson's coefficient (0.7) (Figure 6A, panel, graph). The translocation of FOXO3 correlates with the increase in ROS content.

When CGN was treated with staurosporine, cells showed an increase in FOXO3 nuclear localization after 3 h compared to K25. These data coincide with the expression of *Txnip* observed at 2 h with K5 and at 3 h with Sts (Figures 4A,B). To determine Akt participation in FOXO3 nuclear localization, we treated CGN with 100 μM LY294002 and we found a remarkable increase in FOXO3 nuclear distribution with a high Pearson's coefficient (Figure 6B, arrow, and graph), which suggests that Akt inhibition regulates FOXO3 nuclear

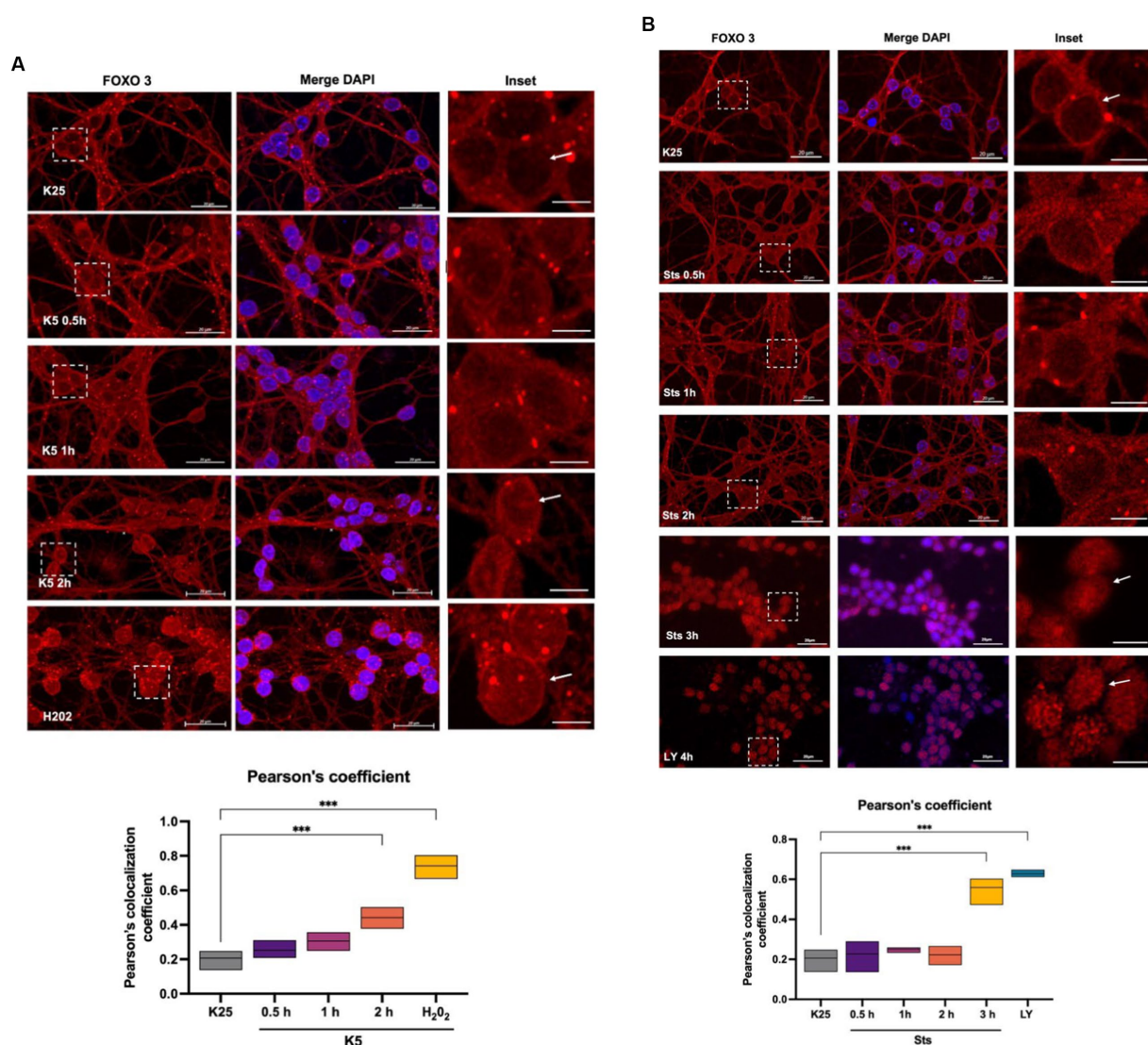


FIGURE 6

FOXO 3 translocates to the nucleus in response to K5, Sts. Representative micrographs of FOXO3 immunofluorescence of CGN treated with (A) K5 medium for 30 min, 1 h, or 2 h or (B) Sts (0.5 μM) for 30 min, 1 h, or 2 h. Immunofluorescence technique is described in Material and Methods. Alexa 488 secondary antibody (red) was used, and nuclei were stained with DAPI (blue). The right columns show the FOXO3 signal, the central panels show FOXO3 and DAPI merge signal and the left column is the dotted inset shown in the left panel. H₂O₂ (100 μM, 1 h) and LY294002 (100 μM, 4 h) were used as positive controls. Bars in the right and central panels represent 20 μm; bars in the left panels represent 5 μm. Pearson's colocalization coefficients were determined in 3 independent experiments for each condition. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Dunnett's test line in the floating bars representing the mean of the data. ****p* < 0.001.

localization. Taking these results together we conclude that FOXO3 is a candidate to promote the *Txnip* expression in response to K5 and Sts in these cells.

3.6. TXNIP silencing decreases cell death

We evaluated the participation of TXNIP in cell death in human MSN neuroblastoma cells treated with Sts. Potassium deprivation does not induce cell death in these cells. *Txnip* from humans and rats share 89% of identity and similar functions have been reported in both species. We found that MSN cells express *Txnip* under basal conditions and that shRNA decreases TXNIP protein levels by 10% 24 h after transfection (Figure 7A). MSN cells are less sensitive to staurosporine (data not shown), therefore we used 1 μ M Sts to induce cell death. Control cells were treated with vehicle (DMSO) and transfection control was made by using an shRNA scramble sequence (Scr). Transfection efficiency was around 30% (data not shown) and no changes in the morphology and viability were found in control Scr or shRNA cells (Figure 7C).

When cells transfected with Scr were incubated for 24 h with Sts we observed a decrease of approximately 75% of cell viability measured as calcein staining (Figures 7A,C). In contrast, in cells transfected with shRNA against *Txnip*, Sts induced a decrease in cell viability of only 25%, which represents a 3-fold difference as compared with cells transfected with Scr sequence (Figures 7A,C). Data obtained with propidium iodide were in close agreement with calcein data (Figure 7C). Interestingly, Scr cells treated with Sts that survived after 24 h (stained with calcein) showed a rounder morphology compared to shRNA cells treated with Sts, which maintained the original morphology (Figure 7B amplification). We interpret this observation as an indication that the surviving Scr cells treated with Sts have already activated the apoptotic death pathway and therefore they will die in the following hours. These results demonstrate that TXNIP is required for cell death and that the lack of this protein increases neuronal viability under death conditions.

3.7. Neuronal death is dependent on JNK activation

The role of JNK activation in apoptosis induced by K5 and Sts was confirmed in CGN by using SP600125, an inhibitor of the JNK protein in dose-dependent concentration (40 nM to 5 μ M). Cell viability was measured 24 h after treatments. The reduction in the number of viable cells with K5 treatment was detected by calcein/propidium iodide technique. When cells were treated with K5 and the JNK inhibitor, CGN were markedly rescued from cell death. K5 treatment resulted in 26% of viable cells, in contrast to 80% of viable cells observed in the presence of SP (5 μ M) (Figure 8). We also observed morphological changes associated with K5 treatment, including soma constriction and axonal degeneration, which were not evident in K5/SP treated cells (Figure 8, panel arrows).

4. Discussion

Apoptosis is a process characterized by an initial commitment phase, during which the cells become irreversibly destined to die

(Belmokhtar et al., 2001). It has been suggested that, during development, a proportion of cerebellar granular neurons undergo physiological apoptosis caused by an absence of presynaptic glutamatergic inputs, which can be replicated *in vitro* by changing CGN from a depolarizing (25 mM KCl) to a hyperpolarized condition (low potassium level; Belmokhtar et al., 2001; Valencia and Morán, 2001; Contestabile, 2002; Guemez-Gamboa and Morán, 2009; Ramiro-Cortés and Morán, 2009; Zaragoza-Campillo and Morán, 2017; Cid-Castro and Morán, 2021). Apoptotic death of CGN can also be induced by staurosporine treatment (Saitoh et al., 2001; Valencia and Morán, 2001).

In the present study, we corroborated that about 50% of CGN die through K5 or Sts treatments. We also found that the commitment phase occurs at around 3–5 h, a time when the process is mainly irreversible, and cells can no longer be rescued from K5-induced death. In the case of Sts, we found similar results; however, due to the impossibility of completely removing Sts from cultures, it is possible that the cells are still exposed to Sts after washing and therefore the calculated times might not be as accurate. These data indicate that an early temporary window is required to activate the whole process of neuronal death and involves early ROS production (Valencia and Morán, 2001; Ramiro-Cortés and Morán, 2009; Cid-Castro and Morán, 2021) and MAPK signaling pathway activation, as previously reported (Ramiro-Cortés and Morán, 2009; Ramiro-Cortés et al., 2011). In the present study, we confirmed that JNK inhibition reduced cell death induced by K5. In a previous study, we observed that p38 inhibition markedly reduced Sts-induced death of CGN (Ramiro-Cortés et al., 2011).

Previous studies showed that when CGN are treated with antioxidants during the first 0–2 h, but not 5 h after K5 incubation, there is a prevention of the caspase activation and neuronal death measured after 24 h (Valencia and Morán, 2001). Here, we also detected a ROS increase after 30 min, but ROS production was statistically significant only after 3–5 h. We measured ROS by using dihydroethidium which detects cytoplasmic ROS. Recently, we detected a significant mitochondrial ROS production during the first 10–15 min of K5 and Sts treatment, which seems to be necessary for the progression of cell death because its inhibition by a mitochondrial antioxidant markedly prevented CGN death (Cid-Castro and Morán, 2021). We, therefore, believe that the mitochondrial ROS production after 10 min and cytosolic ROS produced 3–5 h later by NADPH-oxidase (Coyoy et al., 2008; Guemez-Gamboa and Morán, 2009) required to trigger an early molecular event necessary for cell death progression some hours later.

Zaragoza-Campillo and Morán (2017) reported that TXNIP protein increases after 2 and 3 h of K5 and Sts treatment, respectively. Interestingly, they also found TXNIP is induced by H₂O₂ and Akt inhibition and that antioxidants treatment prevents its expression, thus suggesting that this protein is regulated by ROS and Akt. Based on this evidence, we explored the *Txnip* transcriptional regulation by these two conditions in CGN and we first found that mRNA *Txnip* levels increased by 20 folds after 2 h of K5 treatment and approximately 12 folds after 3–5 h of Sts incubation. In line with previous results, we found that Akt inhibition for 4 h with LY294002 also induced a dose-dependent *Txnip* expression response. At 1 h treatment with H₂O₂ increased *Txnip* levels 4-fold. When we analyzed *Txnip* expression in a temporal curve from 10 min to 60 min with H₂O, we found a rapid *Txnip* expression of 17-fold at 10 min and 24-fold at 20 min, and decreases to 5-fold from 30 min to 1 h. Akt deactivation by ROS has been described in several models, such as prostate cancer cells, cardiac cells, and N2A cells. This event is due to

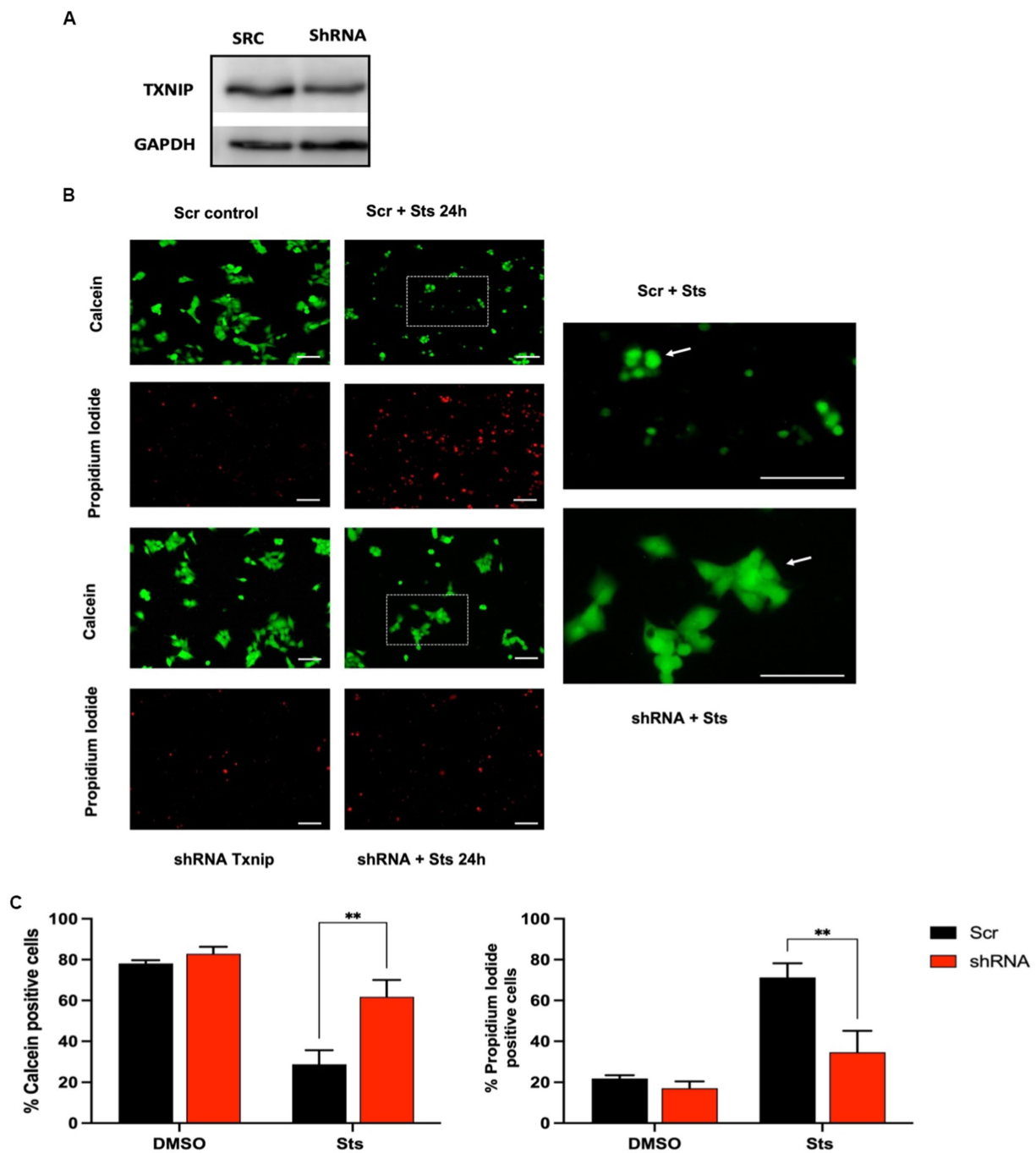
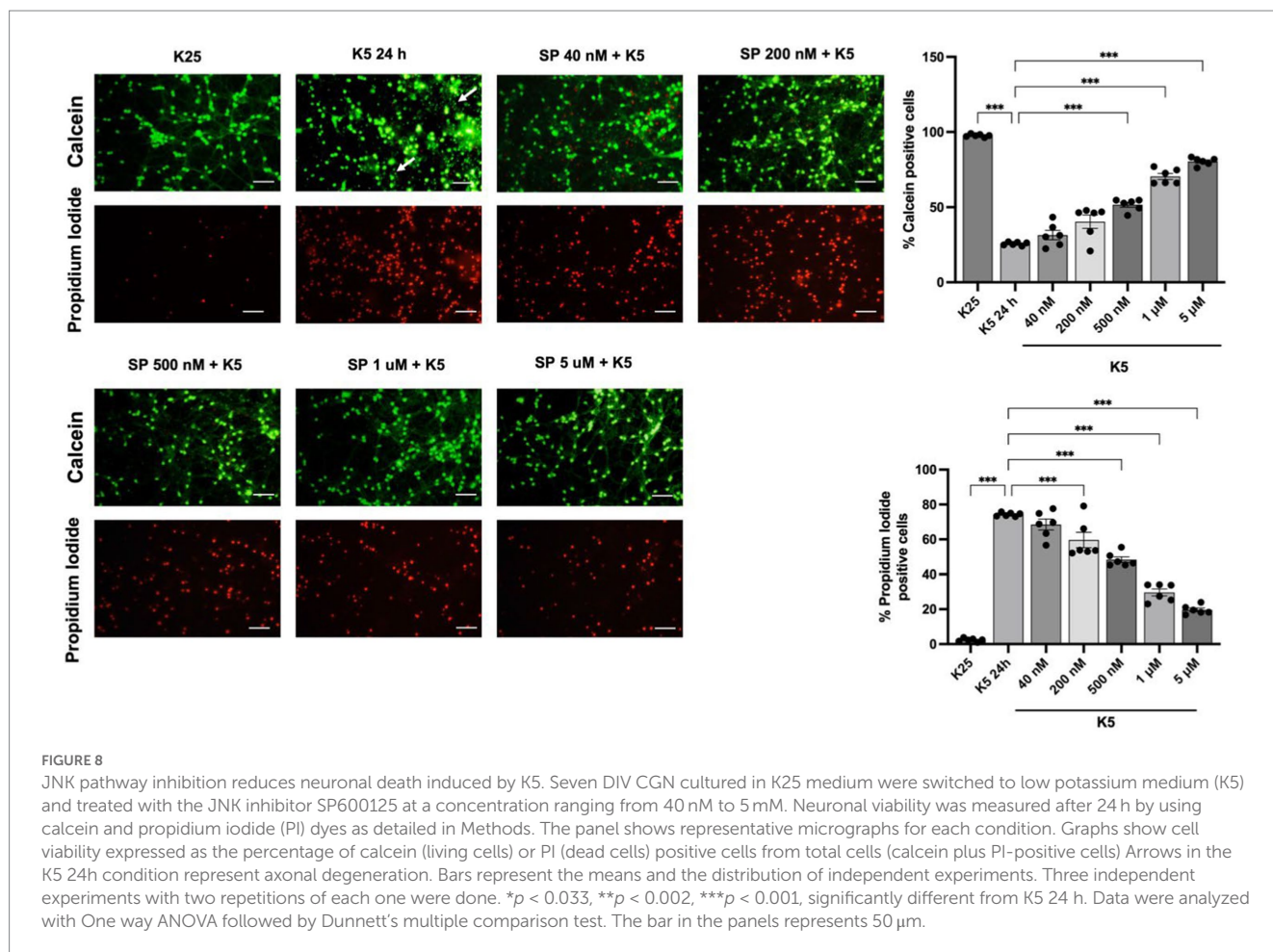


FIGURE 7
 Txnip expression is required to induce cell death. Human neuroblastoma MSN cells were transfected with GFP-reporter scramble shRNA or Txnip shRNA with a transfection efficiency of 28%. After 2 DIV cells were treated with 1 μ M Sts, cell viability was measured after 24 h with calcein/IP as indicated in Methods. **(A)** Representative TXNIP Western blot of cells transfected with Txnip shRNA for 24 h. GAPDH protein was used as control. **(B)** Representative micrographs of calcein/PI fluorescence of Scr or shRNA TXNIP transfected cells treated with Sts or vehicle (DMSO). The right panels show the magnification of the dotted insets shown in the central column. Bars in the right and central panels represent 50 μ m; bars in the left panels represent 50 μ m. **(C)** Quantification of calcein and PI-positive cells transfected with Scr or shRNA Txnip after 24 h of treatment with staurosporine or vehicle (DMSO). Graphs show cell viability expressed as the percentage of calcein (living cells) or PI (dead cells) positive cells from total cells (calcein plus PI-positive cells). Bars are the means \pm SEM of 4 independent experiments. *** p < 0.002. Data were analyzed with two ways ANOVA followed by Sidak's multiple comparison test.

the specific cysteine oxidation and disulfide bond formation between Cys 297 and Cys 311 of the kinase domain, which induces its dephosphorylation and proteasomal degradation (Murata et al., 2003; Chetram et al., 2013; Ahmad et al., 2014).

The mechanism through which Akt inactivation leads to the upregulation of *Txnip* mRNA and protein has been described by Papadia et al. (2008) in cortical neurons. They reported an Akt-FOXO-TXNIP axis based on the evidence of the FOXO motifs found in the

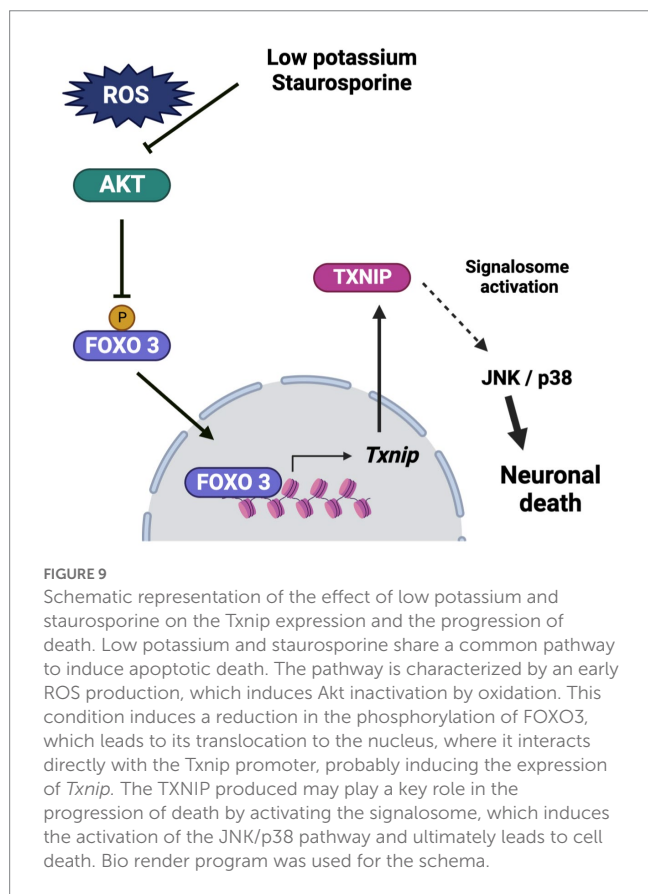


Txnip promoter, as well as the phosphorylation by Akt of FOXO transcription factors that leads to cytoplasmic recruitment by the 14–3–3 scaffold proteins that avoid their nuclear functions (Kloet and Burgering, 2011; Tzivion et al., 2011). This data is consistent with evidence reported by Webb et al. (2016) who found that FOXO 3 induced the expression of *Txnip* in neural progenitor cells NPCs by using a ChIP seq analysis. To explore whether Akt inactivation in our model promotes *Txnip* expression through FOXO transcription factors, we performed a ChIP assay in mice CGN for FOXO1 (data not shown) and FOXO3 for both motifs and we found that FOXO3 is positioned in motif 2 after 1 h of K5 treatment. This data suggests that in this model of cell death of CGN, FOXO3 is a strong candidate for inducing *Txnip* expression.

In agreement with the FOXO3 enrichment assays and *Txnip* mRNA expression, we observed that both K5 and Sts treatments induced FOXO3 redistribution to the nucleus after 2 h and 3 h of treatment, respectively. We also found a high FOXO3 nuclear localization induced by the Akt inhibitor LY294002 and H_2O_2 , reinforcing the evidence that ROS and Akt inactivation induce FOXO3 nuclear translocation. It is noteworthy that the enrichment levels with H_2O_2 treatment for 1 h were not statistically different from controls in the ChIP assays. In a time-curve of *Txnip* transcriptional regulation by H_2O_2 , we found that up-regulation occurs in minutes (10–20), which coincides with the relatively high protein levels observed at 1 h by Zaragoza-Campillo and Morán. Interestingly, at this time (H_2O_2 , 1 h) FOXO3 has a nuclear distribution even though it is no longer positioned in the *Txnip* promoter, probably due to other FOXO3 genes regulated during apoptosis.

The importance of *Txnip* expression in the death progression was demonstrated using human neuroblastoma MSN cells whose *Txnip* levels were reduced by using shRNA. Neuroblastoma cells do not respond to K5 because depolarizing conditions are not needed for their survival. For that reason, we only used staurosporine treatment as an apoptotic stimulus, which has been shown to be a death inductor in several neuroblastoma cell lines (López and Ferrer, 2000). In our model of neuroblastoma MSN cells, we found a basal TXNIP expression that is reduced by around 10% by the shRNA against *Txnip*. Probably this decrease contributes to a reduction in TXNIP levels in response to treatment with staurosporine. Although we do not know exactly how much the *Txnip* levels are reduced by shRNA under conditions of Sts treatment, we found that *Txnip* down expression improves cell viability 24 h after Sts treatment. We observed that 40% of cell death decreased in shRNA cells. It is possible that the observed *Txnip* decrease markedly reduces cell death induced by Sts because it prevents the *de novo* expression of *Txnip* in the presence of the pro-apoptotic stimulus, as occurs in SH-SY5Y cells (Pan et al., 2022). This result shows for the first time that TXNIP might play a critical role in the initial phase of cell death.

In conclusion, these results suggest that *Txnip* participates in cerebellar granule neuron death at early times in the cell death process and that TXNIP expression is dependent on reactive oxygen species production. We observed that ROS induces the inactivation of Akt, leading to the translocation of FOXO3 to the nucleus, where it interacts with the *Txnip* promoter at “Motif 2,” suggesting that FOXO3 is a candidate for TXNIP transcription under these conditions. The observed increase of TXNIP induced by ROS could contribute to the



recruitment of Trx, which would activate ASK1 signaling, leading to the activation of the JNK/p38 pathway (Figure 9) and neuronal death.

Data availability statement

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

Ethics statement

This study was carried out following the accepted standards of animal care and with the procedures approved by the local Animal Care and Use Committee of the Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (protocol number JMA175-21). The protocol used followed the Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience as well as guidelines released by the Mexican Institutes of Health Research and the National Institutes of Health Guide for the care and use of laboratory animals

References

- Ahmad, F., Nidadavolu, P., Durgadoss, L., and Ravindranath, V. (2014). Critical cysteines in Akt1 regulate its activity and proteasomal degradation: implications for neurodegenerative diseases. *Free Radic. Biol. Med.* 74, 118–128. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.06.004
- Baker, A. E., Koh, M. Y., Williams, R. R., James, B., Wang, H., Tate, W. R., et al. (2008). Identification of thioredoxin-interacting protein 1 as a hypoxia-inducible factor 1alpha-

(NIH Publication no. 8023, revised 1978). All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used.

Author contributions

BG-H carried out the experiments, contributed to analyzing and interpreting the data, drafted the manuscript, and participated in the design of the study. JM conceived the study and participated in its design and coordination and contributed to drafting the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) grant number 285184 and by the Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-PAPIIT, UNAM) grants number IN212019 and IN216422. Brenda García-Hernández was supported by a doctoral fellowship from CONACYT fellowship number 463895. This study is part of the requirements for the Ph.D. degree in Biomedical Sciences of Brenda Vianey García Hernández at Universidad Nacional Autónoma de México.

Acknowledgments

The authors are grateful to Guadalupe Dominguez for the technical assistance in the preparation of the CGN cultures. We are also grateful to Angel Barco, and Beatriz Del Barco Blanco of Instituto de Neurociencias, Alicante, Spain for the excellent technical assistance in the ChIP experiments.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

induced gene in pancreatic cancer. *Pancreas* 36, 178–186. doi: 10.1097/MPA.0B013E31815929FE

Belmokhtar, C. A., Hillion, J., and Ségal-Bendirdjian, E. (2001). Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Oncogene* 20, 3354–3362. doi: 10.1038/sj.onc.1204436

- Chetram, M. A., Bethea, D. A., Odero-Marrah, V. A., Don-Salu-Hewage, A. S., Jones, K. J., Hinton, C. V., et al. (2013). ROS-mediated activation of AKT induces apoptosis via pVHL in prostate cancer cells. *Mol. Cell. Biochem.* 376, 63–71. doi: 10.1007/s11010-012-1549-7
- Cho, S., and Hwang, E. S. (2011). Fluorescence-based detection and quantification of features of cellular senescence. *Methods Cell Biol.* 103, 149–188. doi: 10.1016/B978-0-12-385493-3.00007-3
- Cid-Castro, C., and Morán, J. (2021). Differential ROS-mediated phosphorylation of Drp1 in mitochondrial fragmentation induced by distinct cell death conditions in cerebellar granule neurons. *Oxidative Med. Cell. Longev.* 2021, 1–14. doi: 10.1155/2021/8832863
- Contestabile, A. (2002). Cerebellar granule cells as a model to study mechanisms of neuronal apoptosis or survival *in vivo* and *in vitro*. *The Cerebellum*. 1, 41–55. doi: 10.1080/147342202753203087
- Covarrubias, L., Hernández-García, D., Schnabel, D., Salas-Vidal, E., and Castro-Obregón, S. (2008). Function of reactive oxygen species during animal development: passive or active? *Dev. Biol.* 320, 1–11.
- Coyoy, A., Valencia, A., Gumez-Gamboa, A., and Morán, J. (2008). Role of NADPH oxidase in the apoptotic death of cultured cerebellar granule neurons. *Free Radic. Biol. Med.* 45, 1056–1064. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.06.027
- Ferrera, P., Zepeda, A., and Arias, C. (2017). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs attenuate amyloid- β protein-induced actin cytoskeletal reorganization through rho signaling modulation. *Cell. Mol. Neurobiol.* 37, 1311–1318. doi: 10.1007/S10571-017-0467-3/FIGURES/6
- Finkel, T. (2011). Signal transduction by reactive oxygen species. *J. Cell Biol.* 194, 7–15. doi: 10.1083/jcb.201102095
- Gumez-Gamboa, A., and Morán, J. (2009). NOX2 mediates apoptotic death induced by staurosporine but not by potassium deprivation in cerebellar granule neurons. *J. Neurosci. Res.* 87, 2531–2540. doi: 10.1002/jnr.22079
- Hemmings, B. A., and Restuccia, D. F. (2012). PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4:a011189. doi: 10.1101/cshperspect.a011189
- Kloet, D. E. A., and Burgering, B. M. T. (2011). The PKB/FOXO switch in aging and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1813, 1926–1937. doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.04.003
- Lambeth, J. D. (2004). NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 181–189. doi: 10.1038/nri1312
- López, E., and Ferrer, I. (2000). Staurosporine- and H-7-induced cell death in SH-SY5Y neuroblastoma cells is associated with caspase-2 and caspase-3 activation, but not with activation of the FAS/FAS-L-caspase-8 signaling pathway. *Mol. Brain Res.* 85, 61–67. doi: 10.1016/S0169-328X(00)00235-7
- Moran, J., and Patel, A. J. (1989). Effect of potassium depolarization on phosphate-activated glutaminase activity in primary cultures of cerebellar granule neurons and astroglial cells during development. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 46, 97–105. doi: 10.1016/0165-3806(89)90146-6
- Murata, H., Ihara, Y., Nakamura, H., Yodoi, J., Sumikawa, K., and Kondo, T. (2003). Glutaredoxin exerts an Antiapoptotic effect by regulating the redox state of Akt. *J. Biol. Chem.* 278, 50226–50233. doi: 10.1074/jbc.M310171200
- Olguín-Albuerno, M., and Morán, J. (2018). Redox signaling mechanisms in nervous system development. *Antioxid. Redox Signal.* 28, 1603–1625. doi: 10.1089/ars.2017.7284
- Pan, Q., Ma, J., and Guo, K. (2022). miR-223 enhances the neuroprotection of estradiol against oxidative stress injury by inhibiting the FOXO3/TXNIP axis. *Neurochem. Res.* 47, 1865–1877. doi: 10.1007/s11064-021-03490-z
- Papadia, S., Soriano, F. X., Léveillé, F., Martel, M.-A., Dakin, K. A., Hansen, H. H., et al. (2008). Synaptic NMDA receptor activity boosts intrinsic antioxidant defenses. *Nat. Neurosci.* 11, 476–487. doi: 10.1038/nn2071
- Ramiro-Cortés, Y., Gumez-Gamboa, A., and Morán, J. (2011). Reactive oxygen species participate in the p38-mediated apoptosis induced by potassium deprivation and staurosporine in cerebellar granule neurons. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43, 1373–1382. doi: 10.1016/j.biocel.2011.06.001
- Ramiro-Cortés, Y., and Morán, J. (2009). Role of oxidative stress and JNK pathway in apoptotic death induced by potassium deprivation and staurosporine in cerebellar granule neurons. *Neurochem. Int.* 55, 581–592. doi: 10.1016/j.neuint.2009.05.015
- Reynolds, C. P., Biedler, J. L., Spengler, B. A., Ross, R. A., Frenkel, E. P., and Smith, R. G. (1986). Characterization of human neuroblastoma cell lines established before and after therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* 76, 375–387.
- Saitoh, T., Tanaka, S., and Koike, T. (2001). Rapid induction and Ca²⁺ influx-mediated suppression of vitamin D₃ up-regulated protein 1 (VDUP1) mRNA in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis. *J. Neurochem.* 78, 1267–1276. doi: 10.1046/J.1471-4159.2001.00505.X
- Shen, H.-M., and Pervaiz, S. (2006). TNF receptor superfamily-induced cell death: redox-dependent execution. *FASEB J.* 20, 1589–1598. doi: 10.1096/fj.05-5603rev
- Singh, L. P. (2013). Thioredoxin interacting protein (TXNIP) and pathogenesis of diabetic retinopathy. *J. Clin. Exp. Ophthalmol.* 4:10.4172/2155-9570.1000287. doi: 10.4172/2155-9570.1000287
- Taylor, S., Lam, M., Pararasa, C., Brown, J. E. P., Carmichael, A. R., and Griffiths, H. R. (2015). Evaluating the evidence for targeting FOXO3a in breast cancer: a systematic review. *Cancer Cell Int.* 15:1. doi: 10.1186/s12935-015-0156-6
- Tsubaki, H., Tooyama, I., and Walker, D. G. (2020). Thioredoxin-interacting protein (TXNIP) with focus on brain and neurodegenerative diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 21:9357. doi: 10.3390/ijms21249357
- Tzivion, G., Dobson, M., and Ramakrishnan, G. (2011). FoxO transcription factors; regulation by AKT and 14-3-3 proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1813, 1938–1945. doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.06.002
- Tzivion, G., and Hay, N. (2011). PI3K-AKT-FoxO axis in cancer and aging. *Biochimica et Biophysica Acta* 1813:1925. doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.08.014
- Valencia, A., and Morán, J. (2001). Role of oxidative stress in the apoptotic cell death of cultured cerebellar granule neurons. *J. Neurosci. Res.* 64, 284–297. doi: 10.1002/jnr.1077
- van der Heide, L. P., Hoekman, M. F. M., and Smidt, M. P. (2004). The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. *Biochem. J.* 380, 297–309. doi: 10.1042/bj20040167
- Wang, Z., Rong, Y. P., Malone, M. H., Davis, M. C., Zhong, F., and Distelhorst, C. W. (2006). Thioredoxin-interacting protein (txnip) is a glucocorticoid-regulated primary response gene involved in mediating glucocorticoid-induced apoptosis. *Oncogene* 25, 1903–1913. doi: 10.1038/sj.onc.1209218
- Webb, A. E., Kundaje, A., and Brunet, A. (2016). Characterization of the direct targets of FOXO transcription factors throughout evolution. *Aging Cell* 15, 673–685. doi: 10.1111/acel.12479
- Yoshihara, E., Masaki, S., Matsuo, Y., Chen, Z., Tian, H., and Yodoi, J. (2013). Thioredoxin/Txnip: Redoxosome, as a redox switch for the pathogenesis of diseases. *Front. Immunol.* 4. e00514 doi: 10.3389/fimmu.2013.00514
- Zaragoza-Campillo, M. A., and Morán, J. (2017). Reactive oxygen species evoked by potassium deprivation and Staurosporine inactivate Akt and induce the expression of TXNIP in cerebellar granule neurons. *Oxidative Med. Cell. Longev.* 2017, 1–13. doi: 10.1155/2017/8930406
- Zhang, K., Guo, X., Yan, H., Wu, Y., Pan, Q., Shen, J. Z., et al. (2019). Phosphorylation of Forkhead protein FoxO1 at S253 regulates glucose homeostasis in mice. *Endocrinology* 160, 1333–1347. doi: 10.1210/EN.2018-00853
- Zhou, J., and Chng, W. J. (2013). Roles of thioredoxin binding protein (TXNIP) in oxidative stress, apoptosis and cancer. *Mitochondrion* 13, 163–169. doi: 10.1016/j.mito.2012.06.004
- Zhou, R., Tardivel, A., Thorens, B., Choi, I., and Tschopp, J. (2010). Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat. Immunol.* 11, 136–140. doi: 10.1038/ni.1831



OPEN ACCESS

APPROVED BY
Frontiers Editorial Office,
Frontiers Media SA, Switzerland

*CORRESPONDENCE
Julio Morán
✉ jmoran@ifc.unam.mx

RECEIVED 11 August 2023
ACCEPTED 31 August 2023
PUBLISHED 12 September 2023

CITATION
García-Hernández B and Morán J (2023)
Corrigendum: *Txnip* expression promotes
JNK-mediated neuronal death in response to
reactive oxygen species.
Front. Mol. Neurosci. 16:1275888.
doi: 10.3389/fnmol.2023.1275888

COPYRIGHT
© 2023 García-Hernández and Morán. This is
an open-access article distributed under the
terms of the [Creative Commons Attribution
License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or
reproduction in other forums is permitted,
provided the original author(s) and the
copyright owner(s) are credited and that the
original publication in this journal is cited, in
accordance with accepted academic practice.
No use, distribution or reproduction is
permitted which does not comply with these
terms.

Corrigendum: *Txnip* expression promotes JNK-mediated neuronal death in response to reactive oxygen species

Brenda García-Hernández and Julio Morán*

División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

KEYWORDS

Thioredoxin Interacting Protein, FOXO3, reactive oxygen species, apoptosis, cerebellar granule neurons, MAPK, Akt

A corrigendum on

[Txnip expression promotes JNK-mediated neuronal death in response to reactive oxygen species](#)

by García-Hernández, B., and Morán, J. (2023). *Front. Mol. Neurosci.* 16:1210962. doi: 10.3389/fnmol.2023.1210962

In the published article, there was an error in the Funding statement. The name of one of the funding sources is incomplete (CONAHCYT) and the name of the Ph.D. program was omitted.

The statement was previously stated that: This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) grant number 285184 and by the Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-PAPIIT, UNAM) grants number IN212019 and IN216422. Brenda García-Hernández was supported by a doctoral fellowship from CONACYT fellowship number 463895. This study is part of the requirements for the Ph.D. degree in Biomedical Sciences of Brenda Vianey García Hernández at Universidad Nacional Autónoma de México.

The correct Funding statement appears below.

This work was supported by the Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) grant number 285184 and by the Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-PAPIIT, UNAM) grants number IN212019 and IN216422. Brenda García-Hernández conducted this study to fulfill the requirements of Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas of Universidad Nacional Autónoma de México, and received a doctoral scholarship from Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (463895; CVU 755084).

The authors apologize for this error and state that this does not change the scientific conclusions of the article in any way. The original article has been updated.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.