



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR

**PAPEL DE LAS MAPKs EN LA MUERTE
APOPTOTICA DE CELULAS
GRANULARES MEDIADA POR
ESTRES OXIDATIVO**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS
P R E S E N T A:
YAZMIN RAMIRO CORTES**

DIRECTOR DE TESIS: DR. JULIO MORAN ANDRADE



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

Resumen	v
Summary	vi
Lista de Abreviaturas	vii
1. INTRODUCCION	1
1.1. Apoptosis	1
1.2. Vía de las MAPKs	4
1.2.1. ERK1/2	5
1.2.2. ERK5	6
1.2.3. JNK	6
1.2.4. p38	8
1.3. Estrés oxidativo	10
1.4. El cerebro y el estrés oxidativo	11
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
3. HIPOTESIS	13
4. OBJETIVO GENERAL	14
4.1. Objetivos particulares	14
5. MATERIAL Y METODOS	15
5.1. Materiales	15
5.2. Cultivos celulares	15
5.3. Viabilidad celular	16
5.4. Condensación nuclear	16
5.5. Actividad de caspasa 3	17
5.6. Medición de ERO	17
5.7. Western blot	18
5.8. Análisis estadístico	19
6. RESULTADOS	20
6.1. Apartado I: Papel de JNK en la muerte apoptótica de CGC mediada por estrés oxidativo	20
6.1.1. Efecto de K5 y estaurosporina en la vía de JNK	20
6.1.2. Papel de la activación de JNK en la muerte celular inducida por K5 y estaurosporina	23
6.1.3. Efecto de la inhibición de JNK en la apoptosis inducida por K5 y estaurosporina	23
6.1.4. Efecto de SP600125 en la generación de ERO	26
6.1.5. Efecto de antioxidantes en la muerte apoptótica y la generación de ERO	28
6.1.6. Efecto de antioxidantes en la muerte apoptótica y la generación de ERO	31

Anexo A: Artículo derivado de la primera parte del proyecto de Doctorado	36
6.2. Apartado II: Papel de p38 en la muerte apoptótica de CGC inducida por K5 y estaurosporina	37
6.2.2. Papel de p38 en la muerte apoptótica inducida por K5 y estaurosporina	39
6.2.3. Efecto de la inhibición de p38 en la generación de ERO inducida por K5 y estaurosporina	41
7. DISCUSION	45
8. CONCLUSIONES	51
9. BIBLIOGRAFIA	53

El presente trabajo se realizó en la División de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Julio Morán Andrade

Durante el Doctorado conté con beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y de la Dirección General de Posgrado (DGEF).

Dedicatoria

A mi familia con mucho amor y gratitud

A mi madre:
Ángela Cortés Barrientos

A mi padre:
Rubén Ramiro Franco

A mis hermanas y cuñados
Bertha y José Antonio
Angélica y Rosendo

A mis sobrinitos:
Maetzy
Rodrigo
Fátima
Frida

A Fatuel Tecuapetla Aguilar

Agradecimientos

A nuestra máxima casa de estudios:
La Universidad Nacional Autónoma de México

Al Dr. Julio Morán Andrade por la orientación y apoyo en el desarrollo de este proyecto de tesis y en mi formación académica.

A la Dra. Clorinda Arias Álvarez y a la Dra. Selva Rivas Arancibia, por su disponibilidad y comentarios en el desarrollo de este proyecto.

Al honorable jurado, por las sugerencias, comentarios y el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo.

A la Biol. Guadalupe Domínguez, por el apoyo técnico recibido durante este proyecto.

A a la M. En C. Teresa Montiel, por el apoyo y la disposición que siempre tuvo para ayudarme durante mi estancia en el Instituto.

A la Dra. Vilma Maldonado y al Dr. Jorge Meléndez, por la orientación en el aprendizaje de técnicas moleculares.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio a Paola, Dioné, Bere, Alette, Mauricio, Angélica, Sugela, José Miguel y Marcelino, por hacer mi estancia muy grata y por todo el apoyo y cariño recibido por cada uno de ellos.

A Silvestre Alavez, por todo el apoyo y la amistad brindada en el tiempo que llevo de conocerlo.

A mis amigos, Trudy, Uri, Verito, Azucena y Xavier por todo el cariño, apoyo y confianza que siempre me han brindado.

Al Biol. Sergio Contreras, por encaminarme a seguir adelante.

A Fatuel Tecuapetla Aguilar, por todo el apoyo, el cariño y la confianza que me ha brindado en todo momento, por estar siempre a mi lado.

A mi mamá y a mis hermanas por todos los cuidados y el amor que siempre me han brindado.

Resumen

Durante la apoptosis de células granulares de cerebelo inducida por privación de potasio o estaurosporina se registró un incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno, el cual al ser inhibido previene de la muerte celular. Sin embargo, el mecanismo por el cual las especies reactivas de oxígeno participan en la apoptosis de células granulares no está bien definido. De acuerdo con reportes previos, las MAPKs específicamente JNK y p38 son sensibles al estrés oxidativo, además promueven la apoptosis en diferentes modelos celulares.

En la presente tesis encontramos que la privación de potasio induce la activación de la vía de JNK, y que la inhibición de la activación de esta proteína previene de la apoptosis inducida por este estímulo. Por el contrario, la vía de JNK no fue activada por estaurosporina, por lo tanto, la inhibición de JNK no previno de la apoptosis inducida por este estímulo. También encontramos que la vía de JNK se encuentra río abajo de la generación de especies reactivas de oxígeno inducida por privación de potasio y estaurosporina. El uso de antioxidantes incrementó la fosforilación de ASK1 y previno la activación de JNK1, JNK2 y c-Jun inducida por la privación de potasio.

Por otra parte, p38 y ATF2 fueron activados por la privación de potasio en la misma ventana de tiempo. Estaurosporina activo sostenidamente a p38, mientras que ATF2 fue activado transitoriamente y probablemente no es activado por p38 en esta condición. La inhibición de p38 previno de la apoptosis inducida por la privación de potasio y estaurosporina, esta activación se encontró río abajo de la generación de especies reactivas de oxígeno inducida por la privación de potasio. Por el contrario, la activación de p38 se encuentra río arriba de la generación de especies reactivas de oxígeno, además inhibe la actividad de la NADPH-oxidasa inducida por estaurosporina. En conclusión, la apoptosis inducida por privación de potasio es dependiente de JNK y p38, y es mediada por especies reactivas de oxígeno. La apoptosis inducida por estaurosporina es dependiente de p38, la cual puede estar regulando la generación de especies reactivas de oxígeno a través de la activación de la NADPH-oxidasa en células granulares.

Summary

During apoptosis induced by potassium deprivation and staurosporine in cerebellar granule neurons a plethora of proteins are concerned, also there is an increase in the generation of reactive oxygen species and its inhibition prevent of the cell death. However, remain to be elucidated the mechanisms by which the reactive oxygen species participate in the apoptosis of cerebellar granule neurons.

In the present study we found that potassium activated the JNK pathway. Regarding the latter, the inhibition of JNK activation markedly prevented the apoptotic cell death induced by potassium deprivation. In contrast, JNK pathway was not activated by staurosporine and consequently, the inhibition of JNK did not prevent the apoptotic cell death induced by this stimulus. Also, we found that JNK pathway is downstream of reactive oxygen species generation induced by potassium deprivation and staurosporine. The antioxidants increased the ASK1 phosphorylation and decreased JNK1, JNK2 and c-Jun activation induced by potassium deprivation.

On the other hand, p38 and ATF2 were activated by potassium deprivation in the same frame of time. Staurosporine promoted the sustained activation of p38, whereas ATF2 was activated transitory and may not be activated by p38 in this condition. We also found that, the inhibition of p38 activation by SB203580, prevented the apoptosis induced by potassium deprivation and staurosporine. Therefore, the activation of p38 is downstream of reactive oxygen species generation induced by potassium deprivation. The inhibition of p38 prevented the reactive oxygen species generation and the activation of NADPH-oxidase induced by staurosporine. We conclude that the apoptosis induced by potassium deprivation is JNK and p38-dependent and mediated by reactive oxygen species, and the apoptosis induced by staurosporine is p38-dependent, and p38 may be regulating the reactive oxygen species generation through of NADPH-oxidase activation in cerebellar granule neurons treated with staurosporine.

Lista de Abreviaturas

Apaf1	apoptotic peptidase activating factor 1: factor 1 activador de proteasa apoptótica
AP1	activating protein-1: proteína 1 activadora
ASK	apoptosis signal-regulating kinase: cinasa reguladoras de señales apoptóticas
Asp	ácido aspártico
BMK1	Big MAP kinase 1: MAP cinasa 1 grande
CAD	caspase-activated DNase: DNAsa activada por caspasas
CARD	caspase activation and recruitment domain: dominio de reclutamiento y activación de caspasas
CAT	catalasa
CF	contraste de fases
CGC	células granulares de cerebelo
CuZnSOD	superóxido dismutasa de cobre / zinc
DED	death-effector domain: dominio efector de muerte
DHEt	dihidroetidina
DIV	días <i>in vitro</i>
ERK	extracellular signal-regulated kinase: cinasa regulada por estímulos extracelulares
ERN	especies reactivas de nitrógeno
ERO	especies reactivas de oxígeno
E.S.	Error estándar
FADD	Fas-associated death domain protein: proteína con dominio de muerte asociado a Fas
FDA	diacetato de fluoresceína

FeTPPS	5,10,15,20-Tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrinato iron (III), Chloride
GPCRs	G protein-coupled receptors: receptores acoplados a proteínas G
Gpx	glutación peroxidasa
GSH	glutación
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
IP	Ioduro de propidio
JNK	c-Jun N-terminal kinase: cinasa del amino terminal de c-Jun
KCl	Cloruro de potasio
Kmp	kaempferol
K5	Cloruro de potasio 5 mM
K25	Cloruro de potasio 25 mM
LPS	lipolisacáridos
MAPKAPK	MAPK-activated protein kinases: proteínas cinasas activadas por MAPK
MAPK	Mitogen-activated protein kinases, proteínas cinasas activadas por mitógenos
MAPKK	MAP Kinase kinase: MAP cinasa cinasa
MAPKKK	MAP Kinases kinases kinases: MAP cinasas cinasas cinasas
MLK	mixed lineged kinases: cinasas de linaje mezclado
MnSOD	superóxido dismutasa de manganeso
PLA2	phospholipase A2: fosfolipasa A2
PP5	protein phosphatase 5: proteína fosfatasa 5
PRAK	p38-regulated/ activated protein kinase: proteína cinasa activada y regulada por p38

SAPK	stress-activated protein kinase: proteína cinasa activada por estrés
SB	SB203580
SOD	superóxido dismutasa
SP	SP600125
Sts	estaurosporina
TAK1	TGF- β -activated protein kinase 1: proteína cinasa 1 activada por el factor de crecimiento transformante β
Thr	Treonina
TRK	tyrosine kinases receptors: receptores de cinasas de tirosina
Trx	tio redoxina
Tyr	Tirosina
U.D.O	unidades de densidad óptica arbitrarias

1. INTRODUCCION

1.1. Apoptosis

La apoptosis es un tipo de muerte celular genéticamente programado esencial para el desarrollo embrionario y la homeostasis en organismos multicelulares (1). La apoptosis también está implicada en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como las enfermedades de Alzheimer, Huntington y Parkinson, isquemia, esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y desórdenes autoinmunes (2, 3).

La muerte apoptótica ocurre en dos fases: la fase de iniciación, durante la cual la célula se ve comprometida a la muerte, y la fase de ejecución, durante la cual se inician los cambios morfológicos en la estructura celular (4, 5). La apoptosis es un proceso activo que requiere de ATP y de la síntesis de proteínas (6, 7). Se caracteriza por presentar una serie de cambios morfológicos y moleculares distintivos, como el encogimiento celular, condensación nuclear, pérdida de la estructura membranal, fragmentación internucleosomal de ADN, traslocación de fosfatidilserina a la cara externa de la membrana celular, activación de vías de señalización pro-apoptóticas, liberación de proteínas pro-apoptóticas mitocondriales, activación de caspasas y la formación de cuerpos apoptóticos (Fig. 1) (8-10).

Un componente central de la muerte apoptótica es el sistema proteolítico que involucra a una familia de proteasas denominadas caspasas, que son proteasas de cisteína que fragmentan sustratos después de un residuo de ácido aspártico (Asp). Se han identificado 14 caspasas en mamíferos (11) las cuales difieren en su secuencia primaria y su especificidad de sustratos. Las caspasas son sintetizadas como zimógenos, y estructuralmente poseen un prodominio en su región N- terminal, una subunidad larga (~20 kDa) y una subunidad corta (~10 kDa) (12, 13). Estos zimógenos son activados proteolíticamente por otras caspasas, por proximidad o por la formación de una holoenzima denominada apoptosoma (14).

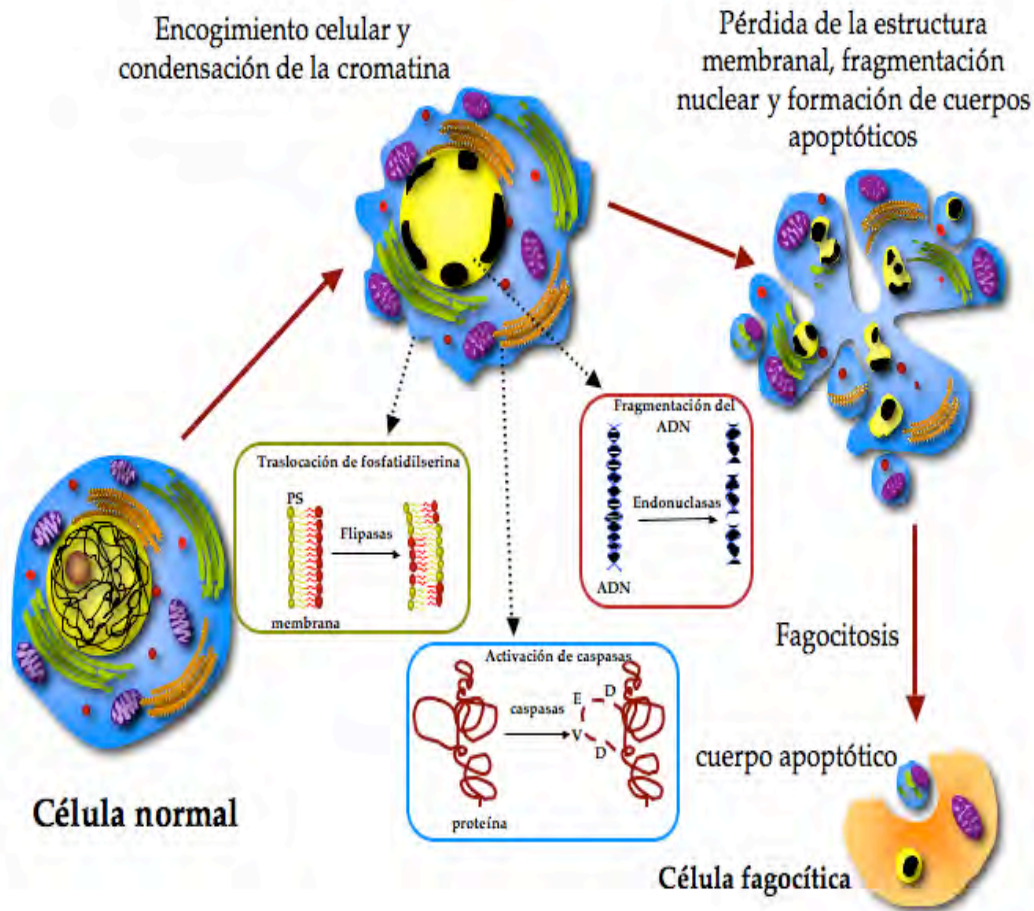


Fig. 1. **Cambios morfológicos y moleculares durante la apoptosis.** Durante el proceso apoptótico ocurren cambios morfológicos como: encogimiento celular, condensación de la cromatina, pérdida en la estructura de la membrana citoplásmica, fragmentación nuclear y formación de cuerpos apoptóticos. Los cambios moleculares incluyen: las traslación de la fosfatidilserina de la cara interna a la cara externa de la membrana, la activación de caspasas y la fragmentación del ADN por acción de endonucleasas.

Las caspasas han sido divididas de acuerdo al largo del prodominio y su participación en la cascada proteolítica en dos grupos. Las caspasas iniciadoras como la caspasa -2, -8, -9 y -10 que tienen prodominios largos que contienen un dominio DED (*death-effector domain*: dominio efector de muerte) y un dominio CARD (*caspase activation and recruitment domain*: dominio de reclutamiento y activación de caspasas). Las caspasas efectoras incluyen a la caspasa -3, -6 y -7, y tienen un prodominio corto (11-15). Una de las funciones de las caspasas es inactivar proteínas que protegen a las células de la apoptosis, como es el caso de

la fragmentación de iCAD por la caspasa 3, el cual es un inhibidor de CAD (*caspase-activated DNase*: DNAsa activada por caspasas), la que al ser liberada de su inhibidor se activa y produce la fragmentación internucleosomal del ADN (11, 15). Estas proteasas tienen también como sustratos a proteínas del citoesqueleto como gelsolina y fodrina, que al ser fragmentadas contribuyen a la condensación de la cromatina. También degradan a proteínas de la familia de Bcl-2 como Bid y Bax, PKCs, entre otras (14-16).

Canónicamente se han descrito dos vías apoptóticas, la vía intrínseca o mitocondrial activada por daño al ADN o por estímulos externos, lo cual genera que la activación de p53 promueva la traslocación de Bax a la mitocondria, promoviendo la liberación de factores pro-apoptóticos como citocromo c y Smac/DIABLO. El citocromo c en el citosol promueve el ensamble de Apaf1 (*apoptotic peptidase activating factor 1*: factor 1 activador de proteasa apoptótica) con la procaspasa 9, formando el apoptosoma, el cual es capaz de activar a la caspasa 3 (Fig. 2) (13).

La vía extrínseca se activa por la familia de receptores de muerte, como CD95 o TNFR, que al ser activados por sus ligandos reclutan proteínas adaptadoras como FADD (*Fas-associated death domain protein*: proteína con dominio de muerte asociado a Fas), que a su vez activa a la caspasa 8 que puede activar directamente a la caspasa 3. La caspasa 8 también puede activar proteolíticamente a Bid, el cual se trasloca a la mitocondria para promover la liberación de citocromo c desencadenando la activación de caspasa 3 (Fig. 2) (13, 14).

Aun cuando la muerte apoptótica se ha estudiado extensamente, todavía existe una falta de información sobre los mecanismos moleculares involucrados, particularmente la participación de señales intracelulares en la regulación de la apoptosis como las especies reactivas de oxígeno y las vías de señalización.

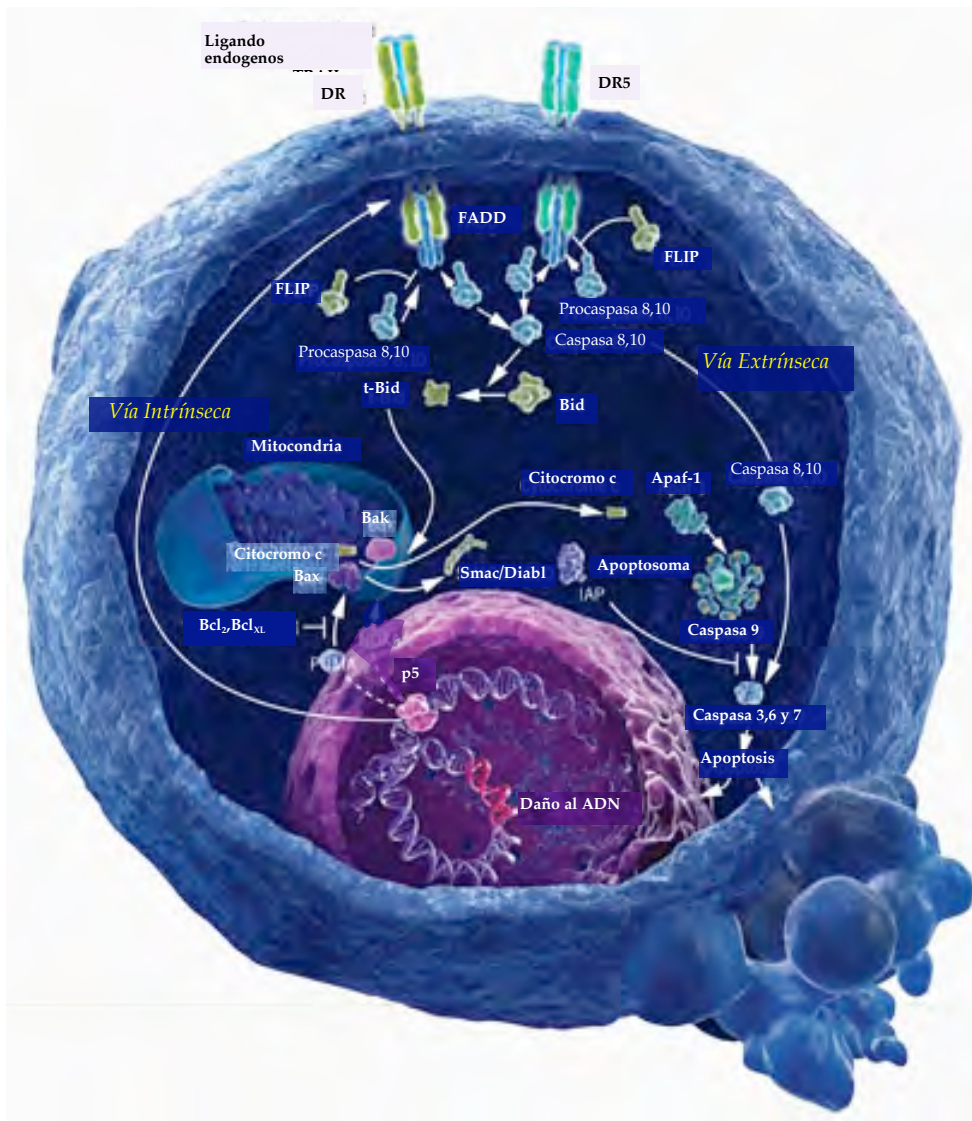


Fig. 2. **Vías apoptóticas.** La vía intrínseca o mitocondrial es activada por daño al ADN o por estímulo externo, se caracteriza principalmente por la formación del apoptosoma. La vía extrínseca se activa principalmente por la activación de los receptores de muerte, ambas vías convergen en la activación de caspasa 3.

1.2. Vía de las MAPKs

Las MAPKs (*Mitogen-activated protein kinases*, proteínas cinasas activadas por mitógenos) regulan diversas funciones celulares como supervivencia, apoptosis, diferenciación, migración, crecimiento, metabolismo y regulación genética (17, 18).

La activación de las MAPKs se da por una cascada de fosforilaciones duales subsecuentes, donde las MAPKKKs o MEKKs (*MAP Kinases kinases*

kinases: MAP cinasas cinasas cinasas) reguladas por reclutamiento a la membrana, oligomerización y fosforilación, fosforilan alguna MAPKK o MEK (MAP Kinase kinase: MAP cinasa cinasa) en residuos de serina (Ser) y treonina (Thr), y éstas a su vez fosforilan a las MAPKs en residuos de Thr y tirosina (Tyr) (18-21), las cuales finalmente fosforilan diversos sustratos como proteínas cinasas, fosfolipasas, factores de transcripción y proteínas del citoesqueleto (22). Se han identificados a la fecha cinco subgrupos de MAPKs: ERK1/2, JNK 1/2/3, p38 ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$), ERK5 y ERK7/8. Cabe señalar que del último subgrupo mencionado existe poca información acerca del mecanismo de activación y función (17, 23-27) (Fig. 3).



Fig. 3. Esquema de la cascada de activación de las MAPKs. Las MAPKs son cinasas activadas por MAPKKs, las cuales a su vez son activadas por MAPKKKs. Cuatro subfamilias de MAPKs han sido descritas ampliamente ERK1/2, ERK5, JNK1/2/3 y p38 $\alpha, \beta, \gamma, \delta$. Modificado de Johnson y Lapadat, 2002 (22).

1.2.1 ERK1/2

ERK (*extracellular signal-regulated kinase*: cinasa regulada por estímulos extracelulares) fue la primera MAPK identificada en mamíferos (28). Existen dos

isoformas, ERK1 y ERK2, conocidas también como p44^{MAPK} y p42^{MAPK} respectivamente, las cuales tienen 83% de homología en su secuencia y se expresan ubicuamente (29). ERK1/2 son activadas por MEK1 y MEK2 en un motivo Thr-Glu-Tyr (TEY) muy conservado en el asa de activación (30). Esta vía es activada principalmente por estímulos mitogénicos como factores de crecimiento, suero, ésteres de forbol, ligandos de receptores GPCRs (*G protein-coupled receptors*: receptores acoplados a proteínas G), receptores TRK (*tyrosine kinases receptors*: receptores de cinasas de tirosina), citocinas, estrés osmótico y despolarización de microtúbulos (28, 31, 32). La activación de ERK1/2 está involucrada en procesos como proliferación celular, diferenciación, movilidad celular y sobrevivencia (31, 33), a través de la fosforilación de diversos sustratos como proteínas de membrana y citosólicas, factores de transcripción, proteínas del citoesqueleto y cinasas (30).

1.2.2. ERK5

ERK5 también es conocida como BMK1 (Big MAP kinase 1: MAP cinasa 1 grande) debido a que es una proteína que pesa ~90 kDa, la mayor de todas las MAPKs. Esta MAPK es activada por MEK5 en un motivo Thr-Glu-Tyr (TEY) en el asa de activación (29). ERK5 puede ser activado por peróxido de hidrógeno y estrés osmótico (34).

1.2.3. JNK

JNK (*c-Jun N-terminal kinase*: cinasa del amino terminal de c-Jun) fue identificada bioquímicamente por su capacidad de fosforilar c-Jun en su región N-terminal en respuesta a mitógenos, ésteres de forbol y Ras activado (35). Posteriormente dos grupos de investigación clonaron el gen que codifica para esta cinasa, en humanos se nombró JNK (36) y en rata fue denominado SAPK (*stress-activated protein kinase*: proteína cinasa activada por estrés) (37), puesto que activaba c-jun en respuesta a radiación UV, citocinas, factores de crecimiento y oncogenes (35-37). La activación de JNK está directamente relacionada con procesos de proliferación, diferenciación, crecimiento, respuesta inflamatoria, metabolismo y apoptosis (38-40).

JNK es codificada por tres genes JNK1/SAPK γ , JNK2/SAPK α y JNK3/SAPK β , los cuales generan diez isoformas por splicing alternativo (20, 34, 38, 41, 42). JNK1/SAPK γ y JNK2/SAPK α se expresan ubicuamente, mientras que JNK3/SAPK β se expresa principalmente en cerebro, corazón y testículos (38, 43, 44). JNK es activada por fosforilación dual en Thr y Tyr en un motivo Thr-Pro-Tyr (TPY) y esta activación está mediada por MAPKK4 y MAPKK7 (25, 44). Diversos activadores de MAPKKs permiten la activación de la vía de JNK como respuesta a un gran número de estímulos externos. Las MAPKKs involucradas en la activación de MAPKK4/7 son: MEKK1-4, MLKs 1-3 (*mixed lineage kinases*: cinasas de linaje mezclado), ASK 1/2 (*apoptosis signal-regulating kinase*: cinasa reguladoras de señales apoptóticas), TAO1/2, TAK1 y Tpl2 (31, 32).

JNK tiene la capacidad de fosforilar diversos sustratos como factores de transcripción como c-Jun, ATF2, Elk1, c-Myc, p53 y STAT1-3, proteínas mitocondriales de la familia de Bcl-2, como Bcl-2, Bcl-xL, Bad, Bim y Bax, proteínas del citoesqueleto como paxilina, MAP2 y Tau, proteínas cinasas como Akt (32, 39, 45-47).

Uno de los principales sustratos de JNK es c-Jun, el cual es esencial para la muerte neuronal (48). c-Jun forma parte del complejo AP1 (*activating protein-1*: proteína 1 activadora), el cual consiste de homodímeros y heterodímeros formados por los factores de transcripción Jun (c-Jun, JunD, JunB), Fos (c-Fos, Fos B, Fra-1, Fra-2) y ATF (ATF2, ATF3, B-ATF) (49, 50). La vida media de c-Jun es muy corta en condiciones normales y es rápidamente degradado por el proteosoma mediado por ubiquitinación (44). JNK fosforila a c-jun en Ser-63 y Ser-73 en el dominio de activación N-terminal, incrementando su actividad transcripcional puesto que reduce su ubiquitinación y consecuentemente incrementa la vida media y causa la acumulación de c-Jun (35, 38, 44, 49-51).

Para determinar el papel de cada una de las isoformas de JNK se han hecho modelos de animales *knockout*. Ninguna de las mutaciones produce letalidad y el fenotipo es normal. Sin embargo, ratones deficientes de *jnk3*^{-/-}

fueron resistentes a la apoptosis inducida por excitotoxicidad (52), animales doble mutantes *jnk1^{-/-} / jnk2^{-/-}* mueren en una etapa embrional, pero presentan una disminución en la apoptosis en el cerebro anterior y el tubo neural permanece abierto (53). De esta manera se ha demostrado que JNK es importante en el desarrollo embrional y la apoptosis.

1.2.4. p38

p38 fue aislada como una proteína de 38 kDa que se fosforilaba en un residuo de Tyr en respuesta a macrófagos estimulados con LPS (lipolisacáridos) (54). La activación de p38 ocurre en respuesta a estímulos externos como radiación UV, choque osmótico, citocinas inflamatorias, factores de crecimiento, estrés oxidativo e isquemia (30, 55). De tal modo que la activación de p38 está relacionada con procesos de respuesta inflamatoria, crecimiento, diferenciación, ciclo celular y apoptosis (30, 39, 56, 57). Existen cuatro isoformas conocidas de p38 (α , β , γ , δ), las cuales comparten un 60% de homología en su secuencia de aminoácidos (54, 58–60), p38 α y p38 β son ubicuamente expresadas y sensibles a la inhibición por compuestos derivados de piridina imidazol, mientras que p38 γ se expresa en músculo y p38 δ se expresa en pulmón y riñón, además de no ser sensibles a compuestos derivados de piridina imidazol (31, 58, 59, 61, 62).

La activación de p38 se da por una fosforilación dual en un motivo muy conservado entre todas las isoformas, Thr-Gly-Tyr (TGY) (55, 59). Las principales cinasas responsables de fosforilar a p38 en el motivo TGY son MAPKK3 y MAPKK6, y en ciertos casos MAPKK4 (56, 57, 59). Sin embargo, estas MAPKKs presentan cierta especificidad por las isoformas de p38. Se sabe que todas las isoformas son activadas por MAPKK6, mientras que MAPKK3 activa a p38 α , p38 γ y p38 δ y MAPKK4 sólo fosforila a p38 α (32, 56, 59, 63).

Se han identificado diferentes MAPKKs para activar MAPKK3/MAPKK6, como MTK1, MLK2-3, DLK, ASK1, TAO1-2 y TAK1 (*TGF- β -activated protein kinase 1*: proteína cinasa 1 activada por el factor de crecimiento transformante β) (55, 56, 61, 64). p38 activa diversos sustratos, factores de

transcripción como ATF2, MEF2, Elk1, MAPKAP-K2, CREB, p53 y Max; proteínas citosólicas como PLA2 (*phospholipase A2*: fosfolipasa A2), intercambiador Na⁺/K⁺; proteínas de citoesqueleto como Tau; proteínas cinasas como MAPKAPK2 y 3 (*MAPK-activated protein kinases*: proteínas cinasas activadas por MAPK), PRAK (p38-regulated/activated protein kinase: proteína cinasa activada y regulada por p38) (19, 30-32, 34, 61).

Como se mencionó anteriormente tanto JNK como p38 son MAPKs relacionadas con el proceso de apoptosis. Uno de los componentes principales de la activación de estas vías es ASK1, también denominada MAPKKK5, una MAPKKK que activa directamente a MAPKK4/7 y MAPKK3/6 responsables de la activación de JNK y p38 respectivamente, promoviendo su actividad proapoptótica en respuesta a estrés oxidativo. ASK1 es ubicuamente expresada y es regulada por múltiples mecanismos como fosforilación, oligomerización e interacciones proteína-proteína. Uno de los mecanismos mejor caracterizados es la interacción de ASK1 con tioredoxina (Trx), la cual se une directamente en la región N-terminal de ASK1 inhibiendo de esta manera la actividad de cinasa y su actividad proapoptótica (65). La interacción entre ASK1 y Trx es dependiente del estado redox de la Trx, sólo la forma reducida de ésta es capaz de unirse a ASK1 y promover la ubiquitinación de ASK1 (66). Sin embargo, cuando Trx es oxidada en los grupos tioles del sitio activo, ocurre la disociación de ASK1 promoviendo de esta manera la consecuente activación de ASK1 (66, 67).

Se han descrito diferentes mecanismos de activación de ASK1. Se sabe que ASK1 tiene la capacidad de formar homodímeros y heterodímeros (con ASK2). Cuando se forma el homodímero ASK1 se autofosforila en Thr845 incrementando de esta manera su actividad de cinasa (68-70). Recientemente, se han descrito otras moléculas que regulan la actividad de ASK1 dependiente de estrés oxidativo. Morita y cols. identificaron que PP5 (*protein phosphatase 5*: proteína fosfatasa 5) desfosforila a ASK1 en Thr-845 inhibiendo de esta manera su actividad proapoptótica (71).

Otro mecanismo que inhibe la actividad de cinasa de ASK1 es la unión a la proteína 14-3-3 la cual promueve la fosforilación en Ser-967 de ASK1 previendo de esta manera su activación. Cuando se induce un estrés oxidativo, ASK1 se defosforila en Ser-967 promoviendo la activación de ASK1 y la muerte apoptótica dependiente de JNK y p38 (72, 73).

1.3. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se define como un desequilibrio entre la producción de oxidantes como las especies reactivas de oxígeno (ERO) o nitrógeno (ERN) y los antioxidantes, en favor de los oxidantes, generando una alteración de la señalización redox en el control y/o daño molecular (74). Las ERO son un subproducto del oxígeno molecular y constituyen un grupo de moléculas altamente reactivas que incluyen a radicales libres y no radicales. Un radical libre se define como una especie capaz de existir independientemente y que contiene uno o más electrones desapareados en su última orbita (Tabla 1) (75, 76).

Tabla 1. Especies Reactivas de Oxígeno (ERO)

<i>Radicales libres</i>	<i>No radicales</i>
Superóxido, $O_2^{\cdot-}$	Peróxido de hidrógeno, H_2O_2
Hidroxilo, OH^{\cdot}	Acido hipocloroso, $HOCl$
Hidroperoxilo, $HO_2^{\cdot-}$	Ozono, O_3
Carbonato, $CO_3^{\cdot-}$	Oxígeno en singulete, $O_2^1\Delta g$
Peroxilo, RO_2^{\cdot}	Peroxinitrito, $ONOO^-$
Dióxido de carbono, $CO_2^{\cdot-}$	Peroxinitrato, O_2NOO^-
Oxígeno en singulete, $O_2^1\Sigma g^+$	Acido peroxinitroso, $ONOOH$

Las ERO incluyen a los radicales libres (especies de oxígeno que tienen desapareado uno o más electrones) y no radicales, que son altamente reactivas. Modificado de Halliwell, *et al*, 2006 (75).

El estrés oxidativo puede causar daño en ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y carbohidratos (77). Los cambios celulares dependientes de ERO pueden ser divididos en dos categorías: 1) efecto directo de ERO sobre cinasas o factores de transcripción y 2) la interacción con moléculas ricas en residuos de cisteína (78, 79). Aunque las ERO tienen la capacidad de dañar moléculas, participan en procesos fisiológicos como proliferación, activación de genes, arresto del ciclo celular, envejecimiento, proliferación, respuesta inmune y apoptosis. Además

están involucrados en condiciones patológicas como enfermedades autoinmunes, enfermedades neurodegenerativas como las enfermedades de Alzheimer, Huntington y Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica y ataxia (76, 80-83).

Una de las mayores fuentes de producción de ERO es la cadena respiratoria mitocondrial. Otras fuentes celulares de ERO incluyen a la NADPH-oxidasa, los peroxisomas, los citocromos P450 y la xantina oxidasa (75, 77, 84). Los sistemas antioxidantes incluyen compuestos no enzimáticos como α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno, ascorbato (vitamina C), glutatión (GSH) y la tioredoxina, y enzimas como la superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD), que se encuentra en la matriz mitocondrial y la superóxido dismutasa de cobre/zinc (CuZnSOD) que se localiza en el citosol, ambas enzimas convierten el anión superóxido en peróxido de hidrógeno. Otras enzimas incluyen a la glutatión peroxidasa (Gpx1 en citosol y matriz mitocondrial y Gpx4 en mitocondria), peroxiredoxina, tioredoxina reductasa y catalasa. Estas últimas catalizan la reducción del peróxido de hidrógeno (77, 85, 86).

1.4. El cerebro y el estrés oxidativo

El cerebro es especialmente susceptible al daño por estrés oxidativo por distintas razones como por su alto consumo de oxígeno, que oscila entre el 20 % del total consumido por el cuerpo, esto debido a que se necesitan grandes cantidades de ATP para mantener la homeostasis iónica intracelular, para la activación de canales iónicos asociados con la propagación de potenciales de acción y la neurosecreción (75). Además, el cerebro es susceptible al estrés oxidativo por las siguientes razones: *a*) la presencia de aminoácidos excitotóxicos como el glutamato, cuya liberación causa un incremento en el Ca^{2+} intracelular y la producción de ERO, lo que a su vez puede causar un incremento en la liberación de aminoácidos excitatorios, *b*) varios neurotransmisores son autooxidables, como la L-DOPA, serotonina y norepinefrina, los cuales pueden reaccionar con el oxígeno para generar anión superóxido, *c*) alto contenido de hierro, que promueve reacciones de catálisis de radicales libres, *d*) altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados susceptibles a reacciones prooxidantes, *e*) una generación importante de H_2O_2 , a través de SOD y monoamino oxidasas A y B, *f*)

prácticamente todas las áreas del cerebro presentan citocromos P450, los cuales son una fuente potencial de estrés oxidativo *g*) en condiciones patológicas se generan ERO por la microglia en respuesta a inflamación y *h*) las defensas antioxidantes son bajas, especialmente la catalasa, la cual se encuentra en muy pequeñas concentraciones y se localiza en microperoxisomas (75).

Se han desarrollado diversos modelos de apoptosis con el propósito de tratar de dilucidar el papel que desempeña el estrés oxidativo en la apoptosis del sistema nervioso. Uno de los modelos más estudiados son los cultivos primarios de células granulares de cerebelo de rata (CGC), puesto que cuando éstas células son mantenidas en un medio con KCl 25 mM (K25) durante 7-8 días *in vitro*, y posteriormente son transferidas a un medio que contiene KCl 5 mM (K5) o estaurosporina (Sts), un inhibidor de proteínas cinasas, las células mueren en un lapso de 24 a 48 h de manera apoptótica (87-89).

En la apoptosis inducida por K5 se ha detectado la generación de ERO en etapas tempranas del proceso de muerte en CGC, proponiendo que las ERO participan como una señal para la inducción de la apoptosis (90-94). El uso de antioxidantes como kaempferol, vitamina E, catalasa, SOD o miméticos de SOD, previenen de la apoptosis en diferentes modelos celulares, sugiriendo la importante participación de las ERO en la muerte apoptótica neural (40, 94-96).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Durante la apoptosis inducida por K5 o Sts en CGC, ocurre un incremento en los niveles basales de ERO en tiempos tempranos, posteriormente se activa la maquinaria apoptótica. Además, la administración de antioxidantes previene de la muerte apoptótica inducida por K5. Sin embargo, el mecanismo por el cual las ERO median la apoptosis inducida por K5 y Sts aún no está bien definido. Una de las posibles vías implicadas en este proceso es la activación de las MAPKs, específicamente JNK y p38 pues se ha reportado que estas cinasas participan de manera muy importante en la muerte apoptótica en diferentes modelos celulares, además de ser cinasas sensibles a la activación por estrés oxidativo. Un posible mecanismo podría consistir en una interacción entre las ERO, producidas por una señal apoptótica, y algún componente de la vía de señalización tipo JNK ó p38.

3. HIPÓTESIS: El estrés oxidativo inducido por K5 y Sts participa como una señal temprana que activa a JNK y/ó p38, las cuales intervienen en la señalización responsable de activar la maquinaria apoptótica en las CGC.

4. OBJETIVO GENERAL: Conocer de que manera el estrés oxidativo participa como una señal temprana en la muerte apoptótica neuronal. Particularmente, conocer si esta señal involucra la vía de las MAPKs.

4.1. Objetivos particulares:

- I) Determinar el tiempo de activación de las vías de JNK y p38 en K5 y Sts.
- II) Definir el papel de la activación de JNK y p38 en la apoptosis inducida por K5 y Sts.
- III) Detectar si el estrés oxidativo generado por K5 y Sts, se presenta río arriba o río abajo de la vía de JNK y p38.
- IV) Observar si en condiciones antioxidantes se inhibe la vía de JNK y p38.

5. MATERIAL Y METODOS

5.1. Materiales: Suero fetal bovino, penicilina/estreptomicina, medio basal Eagle fue adquirido de GIBCO, Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), dihidroetidina (DHET), Hoechst 33258 y diacetato de fluoresceína (FDA) fue adquirido de Molecular Probes, Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Poli-L-lisina (mol. wt.>300,000), tripsina, inhibidor de tripsina, DNAsa, citosina arabinosa, kaempferol, DMSO, reactivos para electroforesis de geles de acrilamida (PAGE) y anticuerpos secundarios anti-mouse y anti-rabbit acoplados fosfatasa alcalina fueron adquiridos de Sigma (St. Louis, MO, USA). CDP-Star quimioluminiscencia para anticuerpos acoplados a fosfatasa alcalina fue adquirido de Bio-Rad (Hercules, CA), ProSiev Protein Marker fue adquirido de Lonza (Basel, Switzerland), membranas PVDF y Immobilon Western sustrato para quimioluminiscencia acoplado a HRP, fueron adquiridos de Millipore (Bedford, MA) y BioMax Light Film fueron adquiridos de Kodak (Rochester, N.Y). Ac-DEVD-MCA fue adquirido de Peptides Intl. (Louisville, KY, USA), catalasa, SOD and Complete fueron adquiridos de Roche (Indianapolis, IN), SP600125 fue adquirido de Tocris (Ellisville, MO, USA). Anticuerpos primarios ASK1, JNK, p-JNK, p-c-Jun, c-Jun y p38 fueron adquiridos de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) y p-ASK1, p-ATF2, p-p38 fueron adquiridos de Cell Signaling (Danvers, MA), anticuerpos secundario acoplados a peroxidasa anti-mouse y anti-rabbit fueron adquiridos de Jackson Immuno Research Laboratories (West Grove, PA).

5.2. Cultivos celulares: cultivos de neuronas granulares de cerebelo fueron preparadas como describen previamente Morán y Patel (50), suspensiones celulares disociadas de cerebelos de rata de 8 días de nacidas fueron sembradas a una densidad de 265×10^3 cells/cm² en placas de plástico tratadas previamente con poli-L-lisina (5 mg/ml). El medio de cultivo consta de medio Basal Eagle suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino inactivado por calor, 2 mM glutamina, 25 mM KCl, 50 mg/ml estreptomicina y 50 U/ml penicilina. Este medio es referido en el texto como K25. Los cultivos fueron incubados a 37°C en

una atmósfera saturada de vapor de agua con 5 % CO₂ y 95 % de aire. 10 mM de citocina arabinosa fue adicionada 20 h después del sembrado. Después de 7-8 días *in vitro* (DIV), las neuronas fueron transferidas a un medio que contenía 5 mM KCl (referido en el texto como K5) tratadas con 0.5 µM de estaurosporina (Sts) por diferentes tiempos (0.5-48 h). Los inhibidores de JNK y p38 (SP600125 y SB203580 respectivamente) y antioxidantes fueron administrados simultáneamente con K5 y Sts, y estuvieron presentes hasta el término de los experimentos correspondientes.

5.3. Viabilidad celular: La viabilidad celular fue determinada por tinción con diacetato de fluoresceína (FDA) y ioduro de propidio (IP) 24 h después de cada tratamiento. FDA atraviesa la membrana de las células sanas y emite una fluorescencia verde cuando es fragmentado por esterazas. En contraste la membrana no es permeable al ioduro de propidio, el que penetra en la células muertas, intercalándose en el ADN emitiendo una fluorescencia roja. Las células cultivadas en un medio con K25 por 7 DIV fueron transferidas a un medio con K5 o tratadas con Sts en presencia o ausencia de 10 µM de SP600125 (SP) ó 10 µM de SB203580 (SB) ó antioxidantes: 20 µM kaempferol (Kmp), 125 U/ml SOD, 125 U/ml catalasa (CAT) y 100 µM FeTPPS por 24h. CGC fueron incubadas con 5 µM de FDA y 5 µM de IP por 5 min a 37 °C, posteriormente las CGC fueron lavadas dos veces con PBS, observadas y fotografiadas en un microscopio de fluorescencia usando un filtro de 485-520 nm de longitud de onda para FDA y un filtro de 450-510 nm de longitud de onda para IP.

5.4. Condensación nuclear: Las células fueron sembradas en cubreobjetos en un medio K25 por 7 DIV y transferidas a un medio con K5 o tratadas con Sts en presencia o ausencia de 10 µM SP600125 (SP) ó 10 µM SB203580 (SB). Después de 24 h, las células fueron lavadas con PBS y fijadas con formaldehído fresco al 4% por 30 min a temperatura ambiente, posteriormente fueron lavadas con PBS e incubadas con 0.001% Hoechst 33258 por 5 min a temperatura ambiente en oscuridad, entonces fueron lavadas y montadas con PBS-Glicerol 1:1 v/v. Las preparaciones fueron fotografiadas en un microscopio de fluorescencia con un

filtro UV BA-2 con una longitud de onda de 340-460 nm.

5.5. Actividad de caspasa 3: La actividad de caspasa 3 fue evaluada usando un tetrapéptido sintético Ac-DEVD-MCA. Este péptido es preferencialmente proteolizado por la caspasa 3, y cuando esto ocurre se libera el fluoróforo MCA incrementando la fluorescencia la cual es proporcional a la actividad de la caspasa. Las CGC fueron tratadas con K5 ó Sts de 6 a 48 h en presencia o ausencia de 10 μ M SP600125 (SP) ó 10 μ M SB203580 (SB). Algunos cultivos fueron tratados con K5 ó Sts por 12 h en ausencia o presencia de antioxidantes: 20 μ M kaempferol (Kmp), 125 U/ml SOD y 125 U/ml catalasa (CAT). Las células fueron lavadas con PBS y homogenizadas en buffer de lisis (500 mM HEPES, 100 μ M EGTA, 5 mM EDTA a 7.5 pH), los homogenados fueron diluidos 1:1 (v/v) con glicerol y almacenados a -20°C . La actividad de caspasa fue determinada usando un método fluorométrico en un espectrofluorómetro RF-5301PC de Shimadzu. Para las reacciones se utilizó un buffer estándar (100 mM HEPES, 20 μ M EGTA, 1 mM EDTA a pH 7.5), 10% (w/v) sacarosa, 1 M DTT, 0.1% (w/v) CHAPS y 20 μ l/ml Complete), 10 μ M Ac-DEVD-MCA y 30 μ g/ml de homogenado celular, las reacciones fueron monitoreadas por 15 min a una longitud de onda de 360-440 nm. Los resultados fueron expresados como actividad de DEVDasa como cambio en la intensidad de fluorescencia/h/mg de proteína.

5.6. Medición de ERO: Las células fueron sembradas en cubreobjetos en un medio K25 por 7 DIV, posterior a este tiempo las CGC fueron transferidas a un medio K5 y mantenidas en estas condiciones desde 30 min hasta 12 h, tratadas con Sts desde 1 h hasta 12 h. Algunos cultivos fueron tratados con K5 ó Sts por 4.5 h ó 5 h respectivamente, en presencia o ausencia de 10 μ M SP600125 (SP) ó 10 μ M SB203580 (SB), algunos cultivos más fueron tratados con K5 ó Sts por 4.5 h y 5 h respectivamente en ausencia o presencia de antioxidantes: 20 μ M kaempferol (Kmp), 125 U/ml SOD, 125 U/ml catalasa (CAT) y 100 μ M FeTPPS. Después de cada tratamiento, las células fueron incubadas con 3.2 μ M dihidroetidina (DHET) por 20 min a 37°C , después fueron lavadas con PBS y fijadas con formaldehído

fresco al 3 % por 7 min a temperatura ambiente en oscuridad y montadas con PBS-Glicerol 1:1 v/v. Las preparaciones fueron fotografiadas en un microscopio de fluorescencia con un filtro de Rodamina con una longitud de onda de 488-515 nm.

5.7. Western blot: Las células fueron mantenidas en un medio K25 por 7 DIV y transferidas a un medio con K5 o tratadas con Sts por diferentes tiempos para determinar la activación de la vía de JNK y p38. Para el caso de JNK, las células fueron tratadas por 30 min, 3 h y 4.5 h con K5, y para Sts se trataron por 30 min, 1 h, 3 h y 5 h, algunos cultivos fueron tratados a los 30 min y 3 h para K5 y 5 h para Sts con 10 μ M SP600125 (SP) ó antioxidantes 20 μ M Kaempferol (Kmp), 125 U/ml SOD y 125 U/ml Catalasa (CAT). Otros cultivos fueron tratados con K5 ó Sts por 45 min en ausencia o presencia de 10 μ M SB203580 (SB), Kaempferol (Kmp), 125 U/ml SOD y 125 U/ml Catalasa (CAT), 100 μ M FeTPPS. Otros cultivos fueron tratados con K5 ó Sts por 3 h y 5h respectivamente en ausencia o presencia de los compuestos mencionados anteriormente.

Las células fueron lavadas dos veces con PBS frío y homogenadas en un buffer de lisis (20 mM Tris HCl, pH 7.8, 1 mM EDTA, 20 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 0.5 mM Na_3VO_4 , 0.5 mM PMSF, 1 mM NaF, 1 μ g/ml leupeptina, 1 μ g/ml aprotinina y 1 μ g/ml pepstatina). La concentración de proteína de los homogenados fue determinada por el método Bradford. Los homogenados (40 μ g ó 30 μ g de proteína total por línea para la vía de JNK y p38 respectivamente) fueron corridos en un gel SDS-PAGE al 12.5% y transferidos a membranas de PVDF a 100 V por 1h. Las membranas fueron bloqueadas con buffer de Tris salino (TTBS) (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl y 0.1% Tween 20, pH 7.5) con 5 % de leche descremada por 1 h a temperatura ambiente e incubadas toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario correspondiente. ASK1 1:250, p-ASK1 1:1000, JNK1/2 1:250, p-JNK1/2 1:250, c-Jun y p-c-Jun 1:250, p-ATF2 1:1000, p38 1:2000 y p-p38 1:1000, GAPDH 1:2000. Las proteínas fueron visualizadas usando una quimioluminiscencia para anticuerpos acoplados a fosfatasa alcalina ó peroxidasa expuestas en Kodak BioMaxLightFilm.

5.8. Análisis estadístico: Los datos son expresados como medias \pm ES. La significancia estadística fue determinada mediante un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía seguida por una prueba de comparación múltiple Tukey. Para determinar la significancia para la actividad de caspasa 3, se aplicó un prueba Kruskal-Wallis seguida por una prueba poshoc de Dunn. Al menos tres experimentos independientes usando diferentes cultivos fueron hechos para cada ensayo. El valor de $p < 0.05$ fue aceptado para indicar diferencia estadística significativa.

6. RESULTADOS

6.1. Apartado I: Papel de JNK en la muerte apoptótica de CGC mediada por estrés oxidativo. Esta primera parte de resultados esta relacionada con el papel de la vía de JNK en la muerte apoptótica y su relación con el estrés oxidativo inducido por K5 y estaurosporina (Sts).

6.1. 1. Efecto de K5 y estaurosporina en la vía de JNK

Para dilucidar el papel de JNK en la apoptosis inducida por K5 y Sts en CGC las neuronas fueron mantenidas en medio K25 por 7 DIV, después fueron transferidas a un medio K5 y lisadas a los 30 min, 3 h y 4.5 h o tratadas con Sts 0.5 μ M por 30 min, 1 h, 3 h y 5 h. Algunos cultivos fueron tratados con un inhibidor de JNK, SP600125 (SP) 10 μ M por 3 h y 5 h con K5 y Sts, respectivamente. Los niveles de ASK1, p-ASK1, JNK, p-JNK, c-Jun y p-c-Jun fueron evaluados por western blot.

Bajo esas condiciones, observamos que K5 disminuyó la fosforilación de ASK1 en el residuo de Ser-967 (el anticuerpo utilizado reconoce ASK1 sólo cuando es fosforilado en este residuo) a las 3 h de tratamiento, recuperando sus niveles basales a las 4.5 h, mientras que los niveles totales de ASK1 permanecieron sin cambios significativos (Fig. 4A).

Por el contrario, detectamos un incremento transitorio en los niveles totales de JNK1/2 a las 3 h de tratamiento con K5 (Fig. 4B). En relación a la forma activa de JNK, observamos que en condiciones control (K25) existe una actividad basal de JNK sin embargo, cuando las células fueron tratadas con K5 un incremento significativo en los niveles de p-JNK1 y p-JNK2 fue detectado después de 30 min del tratamiento con K5, alcanzando un nivel máximo a las 3 h de tratamiento y permaneció activo hasta las 4.5 h (Fig. 4B). Cuando las células fueron tratadas por 3 h con K5 y SP los niveles de p-JNK1 y p-JNK2 no cambiaron alcanzando los niveles basales (Fig. 4B). Finalmente examinamos la activación de c-Jun, uno de los factores de transcripción preferencialmente activados por JNK. Nuestros resultados mostraron que los niveles de

fosforilación de c-Jun incrementaron después de 3 h de tratamiento con K5 y permanecieron hasta las 4.5 h (Fig. 4C). Además, la inhibición de la activación de JNK por acción de SP disminuyó los niveles de fosforilación de c-Jun observados a las 3 h del tratamiento con K5 (Fig. 4C).

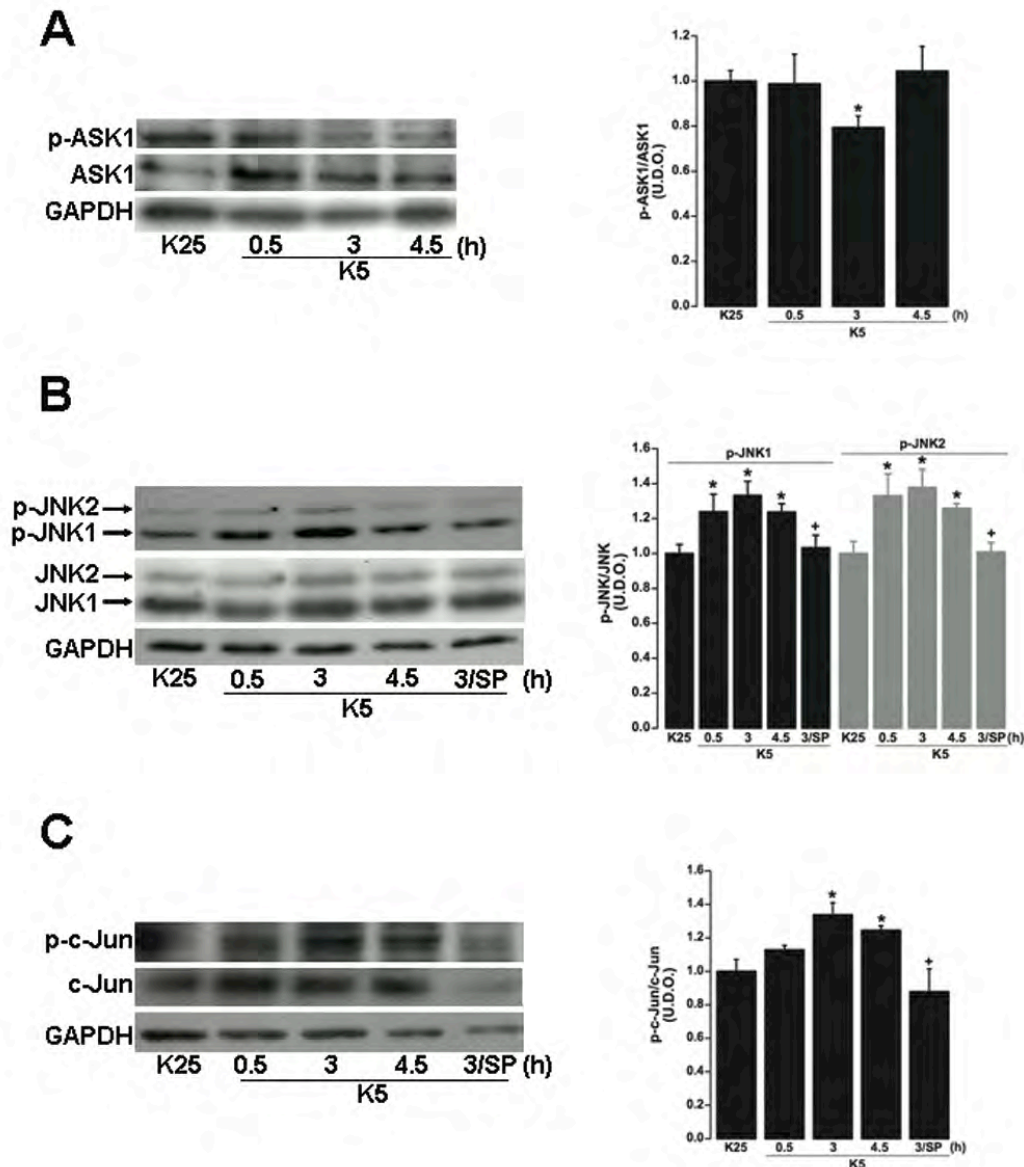


Fig. 4. Efecto de K5 en la activación de la vía de JNK. CGC mantenidas en K25 por 7 DIV, trasferidas a K5 por 0.5 h, 3 h y 4.5 h, algunos cultivos fueron tratados con SP600125 (SP) 10 μ M por 3 h. Los niveles de proteínas fueron determinados por western blot. Barras representan la relación entre forma fosforilada y total para cada proteína, expresadas como unidades de densidad óptica arbitrarias (U.D.O.). **A:** Curso temporal de p-ASK1. Barras son las medias \pm E.S. de siete experimentos independientes. **B:** Curso temporal de p-JNK1/2. Barras son las medias \pm E.S. de tres experimentos independientes. **C:** Curso temporal de p-c-Jun. Barras son las medias \pm E.S. de seis experimentos independientes. * $p < 0.05$ versus K25, + $p < 0.05$ versus K5 3 h.

En contraste a los resultados observados en K5, encontramos que Sts incrementó los niveles de p-ASK1 a las 5 h de tratamiento (Fig. 5A). Interesantemente, Sts no tuvo ningún efecto sobre los niveles basales de fosforilación de JNK1 y JNK2 en todos los tiempos registrados (Fig. 5B). Finalmente, de acuerdo a los resultados mencionados previamente, Sts no modificó los niveles de p-c-Jun (Fig. 5C).

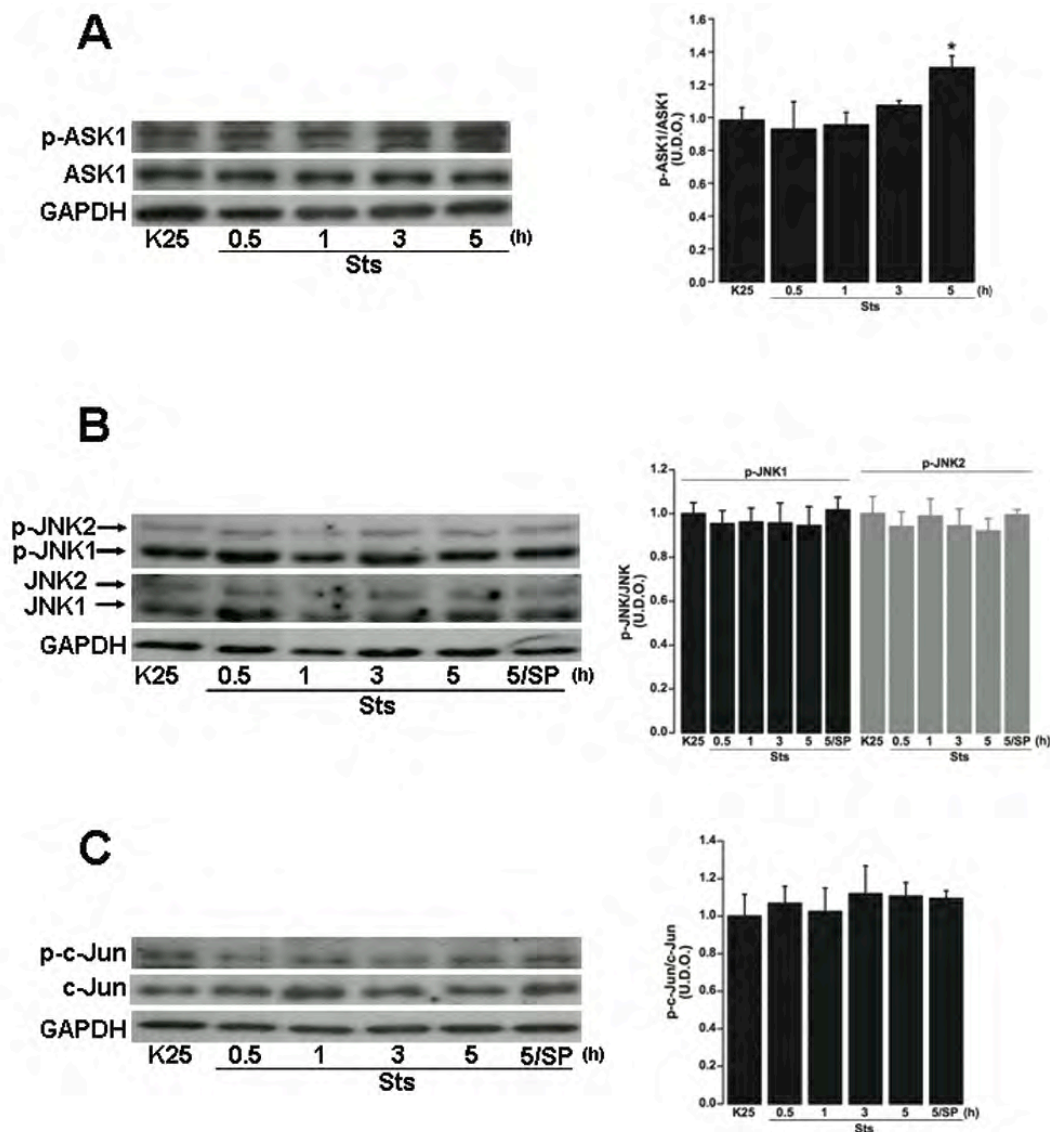


Fig. 5. Efecto de Sts en la activación de la vía de JNK. CGC mantenidas en K25 por 7 DIV, tratadas con Sts 0.5 μ M por 0.5 h, 1 h, 3 h y 5 h, algunos cultivos fueron tratados con SP600125 (SP) 10 μ M por 5 h. Los niveles de proteínas fueron determinados por western blot. Barras representan la relación entre forma fosforilada y total para cada proteína, expresadas como unidades de densidad óptica arbitrarias (U.D.O.). **A:** Curso temporal de p-ASK1. Barras son las medias \pm E.S. de cuatro experimentos independientes. **B:** Curso temporal de p-JNK1/2. Barras son las medias \pm E.S. de tres experimentos independientes. **C:** Curso temporal de p-c-Jun. Barras son las medias \pm E.S. de cuatro experimentos independientes. * $p < 0.05$ versus K25

6.1.2. Papel de la activación de JNK en la muerte celular inducida por K5 y estaurosporina

El papel de JNK en la muerte celular inducida por K5 y Sts fue determinada usando SP600125 (SP), un inhibidor de la activación de JNK. La viabilidad celular fue medida 24 h después de transferir a las células a K5 o tratarlas con Sts. Ambos tratamientos provocaron cambios morfológicos en las células, como la degeneración de somas y la degradación de los procesos neuríticos analizados por microscopía de contraste de fases (CF) (Fig. 6A).

Consecuentemente, una reducción en el número de células viables inducida por K5 y Sts detectadas con FDA, el cual tiñe células sanas y yoduro de propidio (IP) que tiñe células muertas. Cuando las células fueron tratadas simultáneamente con K5 y SP, la muerte celular fue inhibida. En CGC tratadas con K5 registramos un 54.17 ± 1.25 % de células viables, mientras que CGC tratadas con K5 y SP la muerte celular fue prevenida registrando un 88.17 ± 1.2 % de células viables (Fig. 6B).

Para determinar si la activación basal de JNK participaba en la muerte inducida por Sts, realizamos el ensayo de FDA/IP a las 24 h de tratamiento. En CGC tratadas con Sts la viabilidad celular fue de 42.46 % de células viables, y también demostramos que SP no tuvo efecto protector en la muerte inducida por Sts, puesto que registramos un 39.71 % de células viables (Fig. 6B).

6.1.3. Efecto de la inhibición de JNK en la apoptosis inducida por K5 y estaurosporina

La actividad de caspasa 3 es un parámetro de muerte apoptótica, en este trabajo nosotros evaluamos este parámetro para determinar si la inhibición de JNK repercutía en la actividad de esta proteasa inducida por K5 y Sts. La actividad de caspasa 3 fue evaluada usando un sustrato fluorogénico Ac-DEVD-MCA (ver sección 5.5). Nuestros resultados indicaron un incremento en la actividad de caspasa 3 desde las 6 h con K5, alcanzando un nivel máximo entre las 12 h y 24 h. El efecto protector de SP en viabilidad celular se vio reflejado con la disminución en la actividad de caspasa 3 inducida por K5 (Fig. 7A).

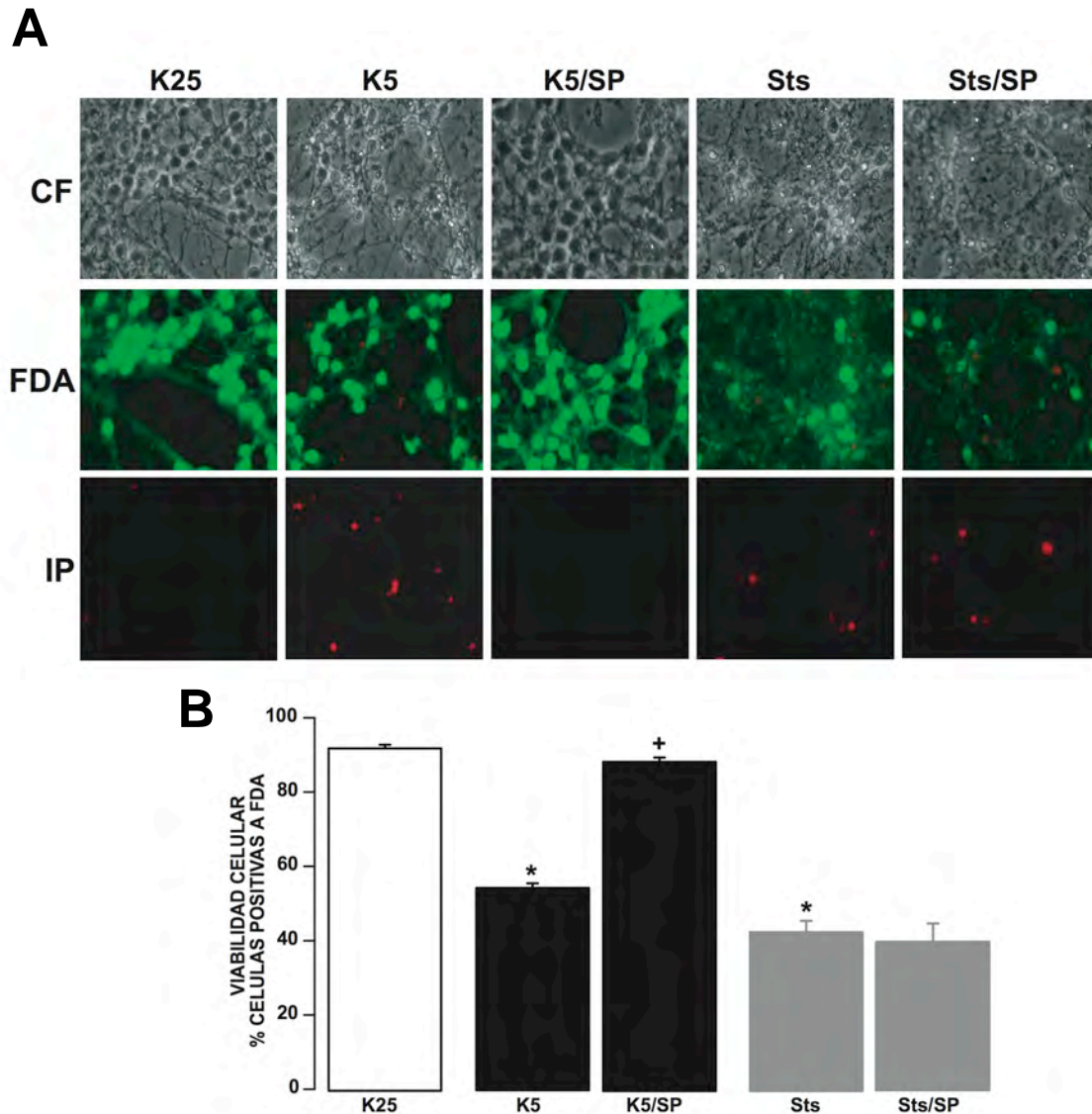


Fig. 6. Efecto de SP600125 en la muerte celular inducida por K5 y Sts. CGC mantenidas en K25 por 7 DIV fueron tratadas con K5 y Sts 0.5 μ M en presencia o ausencia de SP600125 10 μ M por 24 h, la viabilidad celular fue determinada por FDA/IP. **A:** Fotomicrografías de CGC en contraste de fases (CF), teñidas con FDA y ioduro de propidio (IP). **B:** Cuantificación de la viabilidad celular. Los resultados son expresados como porcentaje de células positivas a FDA del total de células. Barras son las medias \pm S.E. de diez experimentos independientes donde * $p < 0.05$ versus K25, + $p < 0.05$ versus K5.

En células tratadas con Sts detectamos un incremento en la actividad de caspasa 3 a las 8 h del tratamiento, alcanzando un nivel máximo a las 24 h de tratamiento (Fig. 7B). De acuerdo con los resultados de viabilidad celular, la inhibición de la activación de JNK no tuvo ningún efecto protector en la actividad de caspasa 3 inducida por Sts (Fig. 7B).

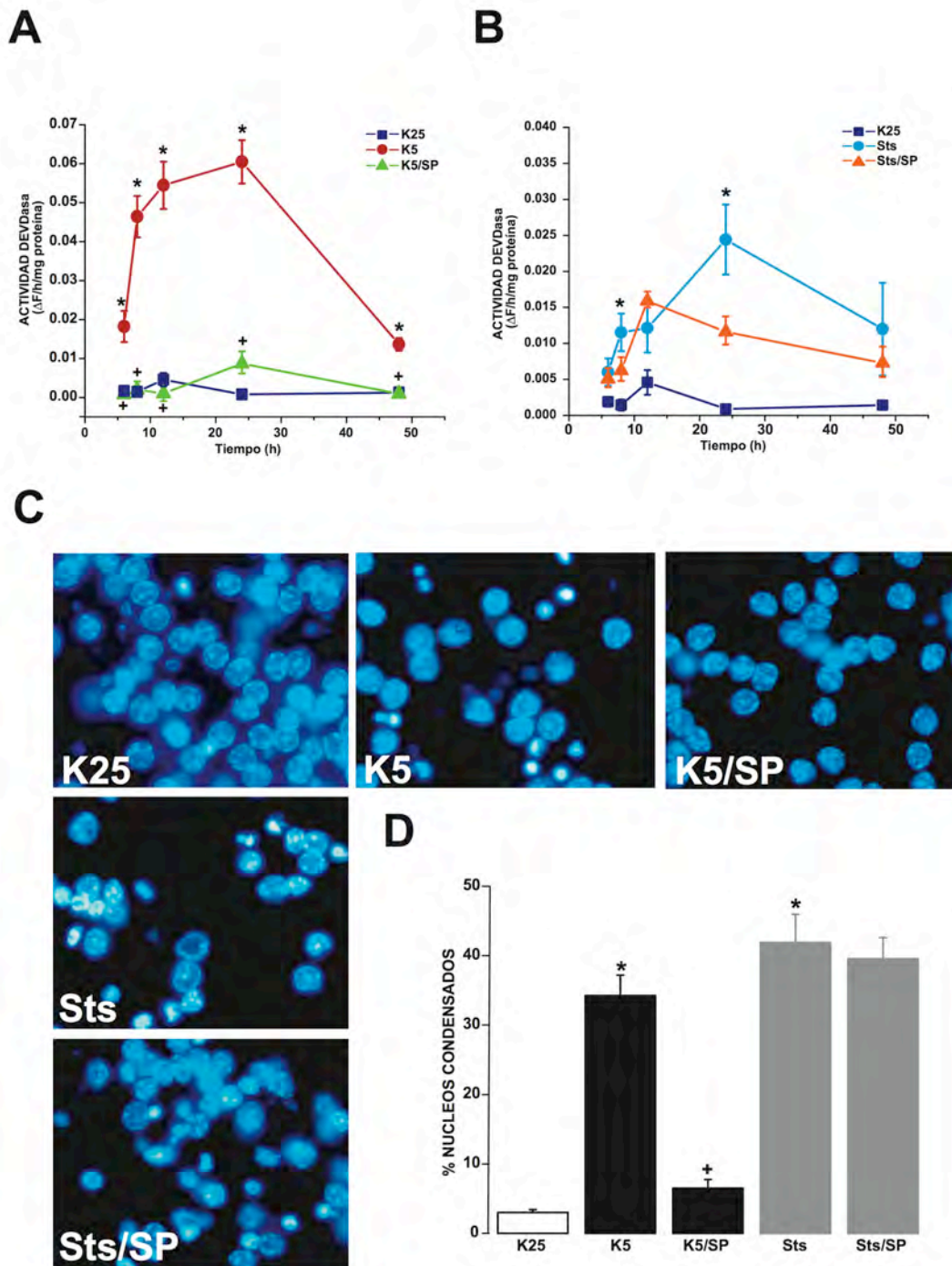


Fig. 7. Efecto de SP600125 en la actividad de caspasa 3 y la condensación nuclear inducida por K5 y Sts. **A, B:** Las CGC mantenidas en K25 por 7 DIV fueron transferidas a un medio K5 o tratadas con Sts 0.5 μ M en presencia o ausencia de SP600125 (SP) 10 μ M de 6 h a 48 h. La actividad de caspasa 3 fue determinada por un método fluorométrico. Los resultados son expresados como cambio de fluorescencia/h/mg de proteína y son las medias \pm S.E. de diez experimentos independientes. **C:** Fotomicrografías de CGC mantenidas en K25 por 7 DIV fueron transferidas a un medio K5 o tratadas con Sts 0.5 μ M en presencia o ausencia de SP600125 (SP) 10 μ M por 24 h. La condensación nuclear fue determinada por tinción con Hoechts. **D:** Los resultados son expresados como porcentaje de núcleos condensados y son las medias \pm S.E. de cinco experimentos independientes, * $p < 0.05$ versus K25, + $p < 0.05$ versus K5.

Otro marcador canónico de la muerte apoptótica es la condensación nuclear, la cual fue evaluada por tinción con Hoechst (ver sección 5.4). En la Fig. 7C se observan fotomicrografías de CGC en condiciones control (K25), tratadas con K5 y Sts en ausencia y presencia de SP, estos tratamientos fueron hechos por 24 h. De acuerdo con nuestros resultados, en K25 el $3.56 \pm 0.6\%$ de las células presentan núcleos condensados y el $30.56 \pm 2.54\%$ de las células tratadas con K5 presentan núcleos condensados (Fig. 7D). En contraste, células tratadas con K5 y SP la condensación nuclear fue prevenida significativamente, sólo el $5.8 \pm 1.4\%$ presentaron núcleos condensados (Fig. 7B). En CGC tratadas con Sts un $41.88 \pm 4.07\%$ presentaron núcleos condensados, y SP no tuvo un efecto protector en la condensación nuclear inducida por Sts mostrando $39.54 \pm 3.06\%$ de núcleos condensados (Fig. 7D).

6.1.4. Efecto de SP600125 en la generación de ERO

Para determinar si la generación de ERO precede o no a la activación de JNK, probamos diversos antioxidantes como kaempferol, SOD, catalasa y FeTPPS (catalizador de la descomposición de peroxinitrito). Primero determinamos los tiempos de generación de ERO inducido por K5 y Sts, y observamos que en condiciones de K5 los niveles de ERO incrementan a los 30 min del tratamiento ($3.47 \pm 0.67\%$ células positivas a DHEt) en comparación con K25 ($0.13 \pm 0.03\%$ células positivas a DHEt), posteriormente vuelven a incrementar a las 4 h alcanzando un nivel máximo a las 4.5 h ($12.58 \pm 1.42\%$ células positivas a DHEt) y los niveles de ERO permanecen por encima del control hasta las 12 h del tratamiento con K5 (Fig. 8A).

Cuando las células son tratadas con Sts, se observó un incremento abrupto de los niveles de ERO a las 5 h del tratamiento ($10.68 \pm 2.21\%$ células positivas a DHEt), posteriormente los niveles regresan a la basal, y vuelven a incrementar a las 8 h y permanecen altos hasta las 12 h de tratamiento (Fig. 8B).

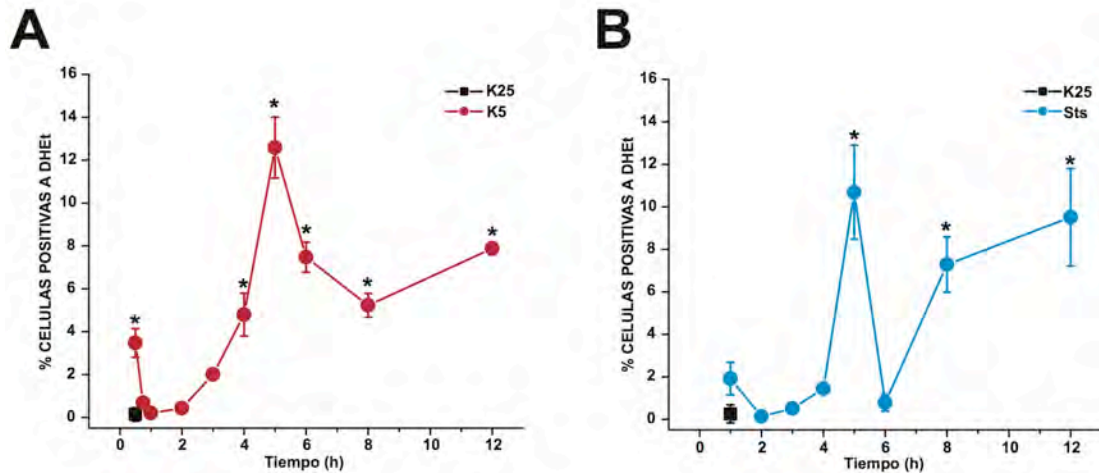


Fig. 8. **Curso temporal de la generación de EROs inducida por K5 y Sts.** La generación de EROs fue evaluada con DHEt. **A.** Las CGC mantenidas en K25 por 7 DIV fueron transferidas a medio K5 y mantenidas ahí de 30 min hasta 12 h. **B:** Las CGC mantenidas en K25 por 7 DIV fueron tratadas con Sts 0.5 μ M desde 1 h hasta 12 h. Los resultados son expresados como porcentaje de células positivas a DHEt del total de células, y son las medias \pm S.E. de cuatro experimentos independientes, * $p < 0.05$ versus K25.

Por otra parte, para determinar si la activación de la vía de JNK se presentaba antes o después del estrés oxidativo inducido por K5 y Sts, evaluamos la generación de ERO inducida por ambos estímulos en presencia del inhibidor de la activación de JNK, SP. Las células fueron tratadas con K5 y Sts por 4.5 h y 5 h respectivamente, en ausencia y presencia de SP.

Cuando las células fueron tratadas con K5 registramos un incremento en la generación de ERO con $46.41 \pm 4.1\%$ células positivas a DHEt, en comparación con K25 donde sólo un $6.9 \pm 3.2\%$ células positivas a DHEt (Fig. 9). En células tratadas con Sts también registramos un incremento en los niveles de ERO $52.62 \pm 9 \pm 5.0\%$ células positivas a DHEt, y las células tratadas con SP no inhibieron la generación de ERO inducida por Sts detectando un $41.39 \pm 9 \pm 4.3\%$ células positivas a DHEt (Fig 9). De acuerdo a estos resultados, la generación de ERO se encuentra río arriba de la activación de JNK, debido a que los niveles de ERO no disminuyeron bajo el tratamiento con SP.

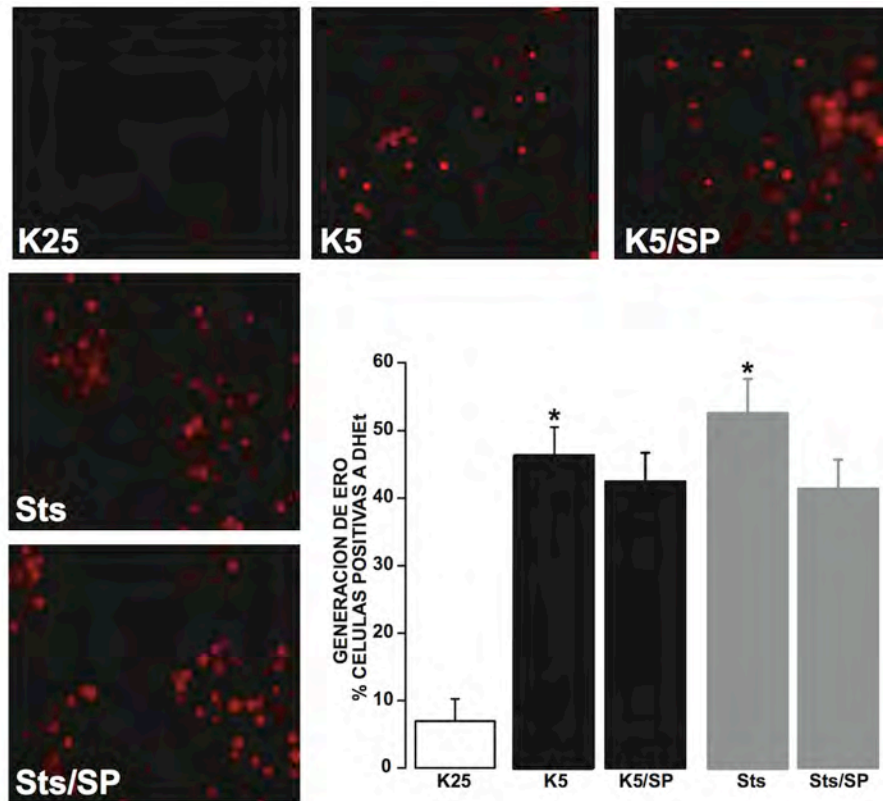


Fig. 9. Efecto de SP en la generación de ERO inducida por K5 y Sts. Las CGC mantenidas en K25 por 7 DIV fueron transferidas a un medio K5 o tratadas con Sts 0.5 μ M por 4.5 h y 5 h respectivamente en ausencia y presencia 10 μ M SP600125 (SP). Las células fueron observadas y fotografiadas en un microscopio de fluorescencia. Los resultados son expresados como porcentaje de células positivas a DHET del total de células, son las medias \pm S.E. de cinco experimentos independientes,* $p < 0.05$ versus K25.

6.1.5. Efecto de antioxidantes en la muerte apoptótica y la generación de ERO

Una vez determinado que la generación de ERO está río arriba de la activación de la vía de JNK, diseñamos una serie de experimentos que nos permitieran evaluar si la activación de la vía de JNK estaba siendo mediada por ERO, para tal efecto utilizamos diversos antioxidantes que nos permitieran determinar si los niveles de fosforilación de las proteínas de la vía de JNK estaban siendo modificados.

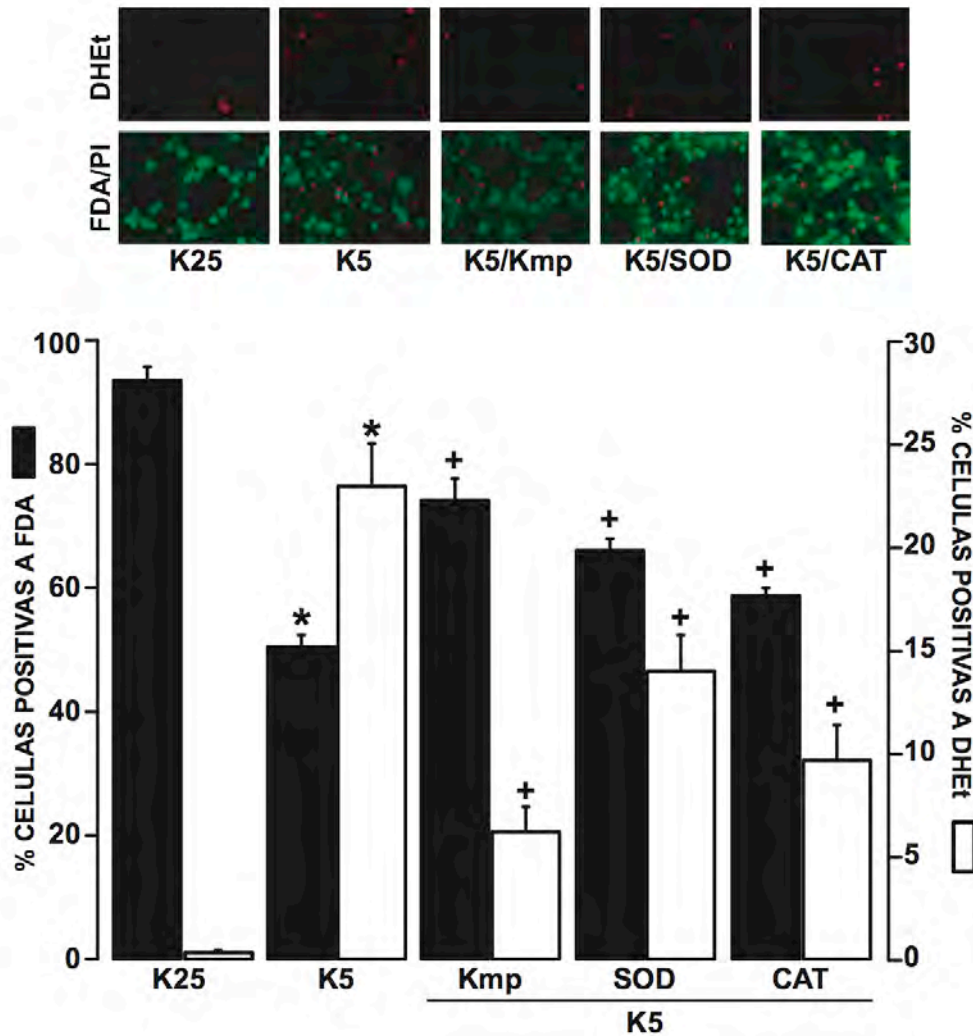


Fig. 10. Efecto de antioxidantes en la generación de ERO y muerte celular inducida po K5. Las CGC mantenidas en K25 por 7 DIV fueron transferidas a un medio K5 en ausencia y presencia de kaempferol 20 μ M (Kmp), SOD 125 U/ml y CAT 125 U/ml, tratadas por 4.5 h para determinar la generación de ERO (DHEt) y 24 h para la viabilidad celular (FDA/IP). Los resultados son expresados como porcentaje de células positivas a DHEt del total de células y como porcentaje de células positivas a FDA del total de células, son las medias \pm S.E. de tres experimentos independientes, * $p < 0.05$ versus K25, + $p < 0.05$ versus K5.

Primero evaluamos el efecto de los antioxidantes en la muerte celular y la generación de ERO inducida por K5 y Sts, para tal motivo las células mantenidas en medio K25 por 7 DIV, fueron tratadas con K5 en ausencia y presencia de antioxidantes como kaempferol (Kmp), superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT). Todos los antioxidantes utilizados disminuyeron la generación de ERO inducida por K5 (22.92 ± 2.08 % células positivas a DHEt), siendo kaempferol el más efectivo con un 6.16 ± 1.23 % células positivas a DHEt. Estos datos se vieron

reflejados en la viabilidad celular, donde células tratadas con K5 mostraron un 50.47 ± 1.89 % células vivas, mientras que células tratadas con K5 y antioxidantes la viabilidad celular se recuperó mostrando un 74.17 ± 3.51 % células vivas con K5 y Kmp (Fig. 10).

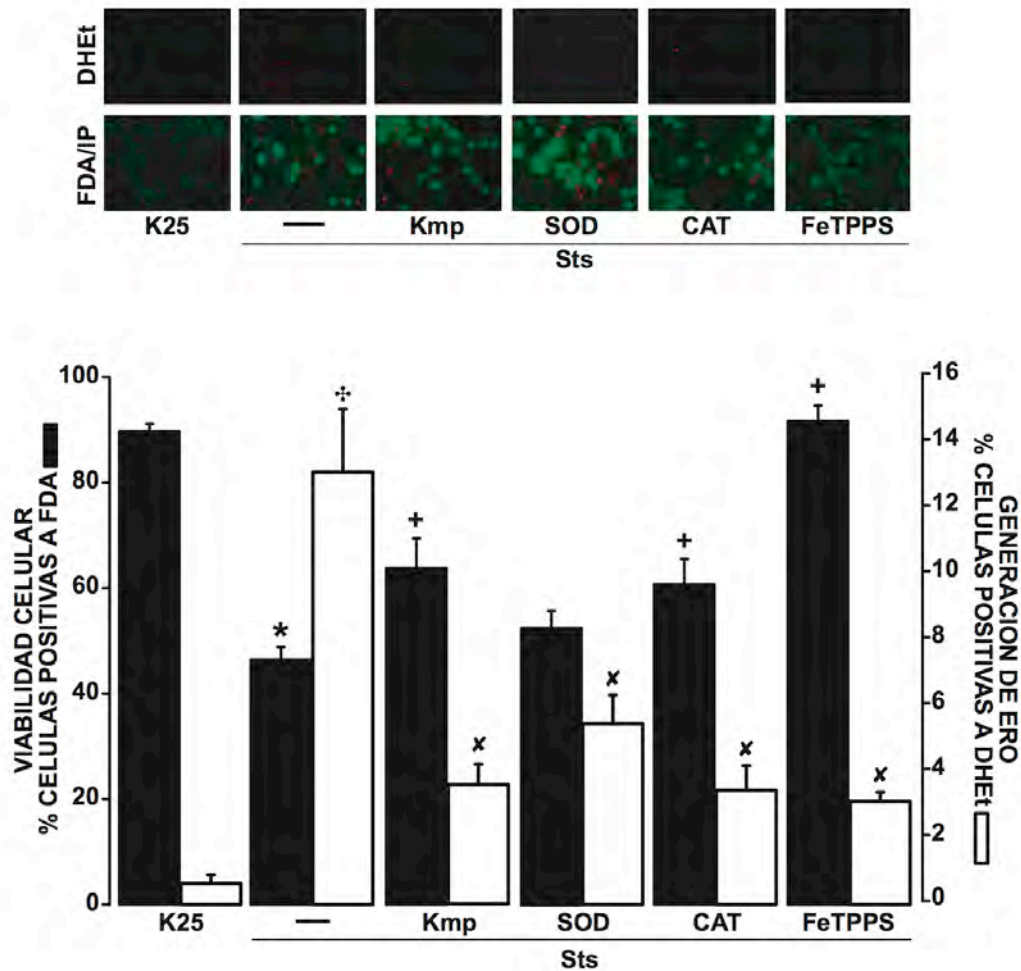


Fig. 11. Efecto de antioxidantes en la generación de ERO y muerte celular inducida por Sts. Las CGC mantenidas en K25 por 7 DIV fueron tratadas con Sts $0.5 \mu\text{M}$ en ausencia y presencia de kaempferol $20 \mu\text{M}$ (Kmp), SOD 125 U/ml , CAT 125 U/ml y FeTPPS $100 \mu\text{M}$, tratadas por 5 h para determinar la generación de EROs (DHEt) y 24 h para la viabilidad celular (FDA/IP). Los resultados son expresados como porcentaje de células positivas a DHEt del total de células y como porcentaje de células positivas a FDA del total de células, son las medias \pm S.E. de tres experimentos independientes, * $p < 0.05$ versus K25, + $p < 0.05$ versus K5, ✱ $p < 0.05$ versus K25, ✕ $p < 0.05$ versus K5.

Observamos que las CGC tratadas con Sts muestran un 13.11 ± 1.90 % células positivas a DHET, cuando se les administraron los antioxidantes la generación de ERO se previno significativamente registrando un 3.13 ± 0.27 % células positivas a DHET cuando fueron tratadas con FeTPPS. La viabilidad celular también se recuperó en CGC tratadas con Sts y antioxidantes, cuando se administró el FeTPPS el 91.63 ± 3.02 % células vivas, en contraste con CGC tratadas con Sts solamente con un 46.43 ± 2.40 % células vivas (Fig. 11).

Finalmente, determinamos si los antioxidantes empleados en este trabajo poseían un efecto protector en la apoptosis inducida por K5 y Sts, para esto medimos la actividad de caspasa 3 y pudimos observar que todos los antioxidantes previnieron de la actividad de caspasa inducida por K5 y Sts (Fig. 12).

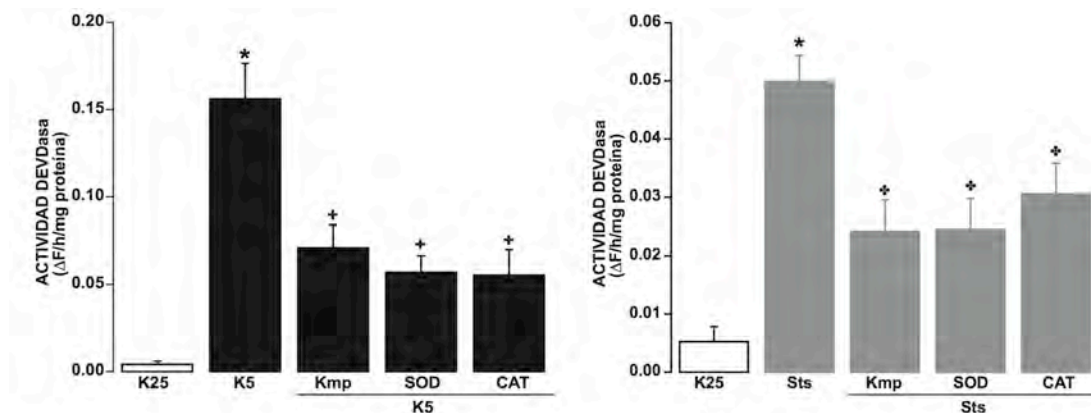


Fig. 12. Efecto de antioxidantes en la generación de ERO y muerte celular inducida por Sts. Las CGC mantenidas en K25 por 7 DIV fueron tratadas con Sts $0.5 \mu M$ en ausencia y presencia de kaempferol $20 \mu M$ (Kmp), SOD $125 U/ml$, CAT $125 U/ml$ y FeTPPS $100 \mu M$, tratadas por 5 h para determinar la generación de ERO (DHET) y 24 h para la viabilidad celular (FDA/IP). Los resultados son expresados como porcentaje de células positivas a DHET del total de células y como porcentaje de células positivas a FDA del total de células, son las medias \pm S.E. de tres experimentos independientes, * $p < 0.05$ versus K25, + $p < 0.05$ versus K5, + $p < 0.05$ versus Sts.

6.1.6. Papel del estrés oxidativo en la activación de la vía de JNK en CGC tratadas con K5 y estaurosporina

Como mencionamos anteriormente, para dilucidar el papel del estrés oxidativo en la activación de la vía de JNK inducida por K5, nosotros evaluamos el efecto de los antioxidantes en la activación de las proteínas que conforman la vía de JNK. Las células fueron tratadas por 30 min y 3 h en ausencia y presencia de antioxidantes.

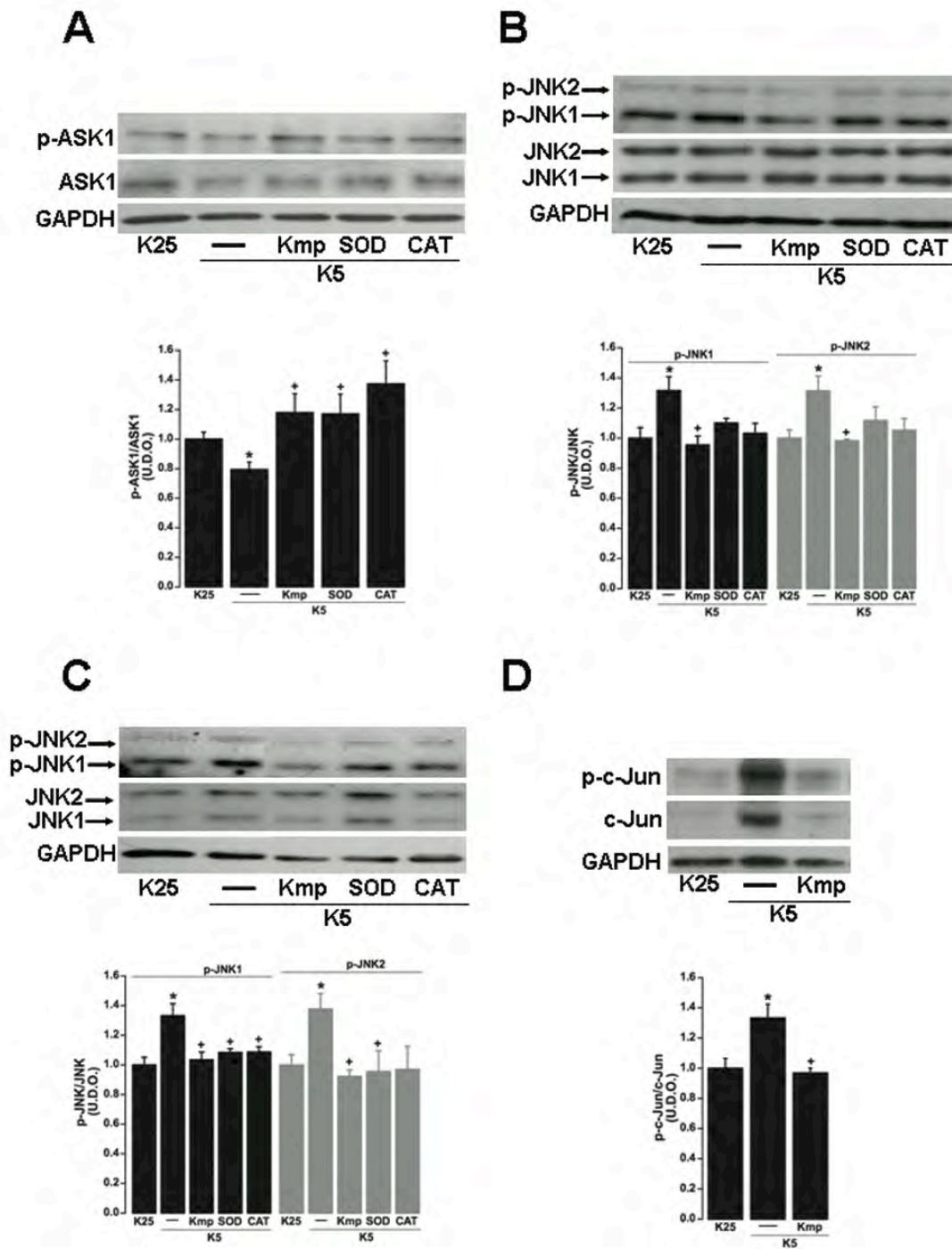


Fig. 13. Efecto de antioxidantes en la activación de la vía de JNK inducida por K5. CGC mantenidas en K25 por 7 DIV, transferidas a K5 en ausencia y presencia de kaempferol 20 μ M (Kmp), SOD 125 U/ml y CAT 125 U/ml por 30 min y 3 h. Los niveles de proteínas fueron determinados por western blot. Barras representan la relación entre forma fosforilada y total para cada proteína, expresadas como unidades de densidad óptica arbitrarias (U.D.O.). **A:** p-ASK1 a las 3 h tratamiento. Barras son las medias \pm E.S. de cuatro experimentos independientes. **B:** p-JNK1 y p-JNK2 a los 30 min de tratamiento. Barras son las medias \pm E.S. de cuatro experimentos independientes. **C:** p-JNK1 y p-JNK2 a las 3 h de tratamiento. Barras son las medias \pm E.S. de tres experimentos independientes. **D:** p-c-Jun 3 h de tratamiento. Barras son las medias \pm E.S. de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$ versus K25, + $p < 0.05$ versus K5 3 h.

Detectamos que la fosforilación de ASK1 en Ser-967 disminuyó cuando las células fueron tratadas con K5 por 3h, pero este efecto fue completamente revertido por kaempferol, SOD y catalasa (Fig. 13 A).

Para corroborar que el primer pico de ERO inducido por K5 a los 30 min, está relacionado con la activación de JNK registrada en ese tiempo (Fig. 4B), las CGC fueron tratadas con K5 por 30 min en ausencia y presencia de antioxidantes. Observamos que el kaempferol previno la activación de JNK1 y JNK2, por el contrario SOD y catalasa no tuvieron efecto (Fig. 13 B). La activación de JNK1 y JNK2 inducida por K5 a las 3h fue prevenida por kaempferol, SOD y catalasa (Fig. 4C).

Finalmente, nosotros encontramos que el incremento en la fosforilación de c-Jun inducido por K5 a las 3 h, fue completamente prevenido por kaempferol (Fig. 13D). Estos resultados concuerdan con la observación de que los antioxidantes: kaempferol, SOD y catalasa fueron capaces de proteger de la generación de ERO y la muerte inducida por K5 a través de la inhibición de la activación de la vía de JNK (Fig. 10).

Por otra parte, nosotros investigamos el efecto de los antioxidantes en los niveles basales de fosforilación de las proteínas de la vía de JNK inducidos por Sts a las 5 h de tratamiento, debido que a este tiempo es cuando se registró el pico máximo de ERO inducido por Sts (Fig. 8B). Observamos que ninguno de los antioxidantes utilizados modificaron los niveles de fosforilación de ASK1, JNK1, JNK2 y c-Jun (Fig. 14 A,B,C). Un resumen del efecto de SP y kaempferol, como antioxidante representativo, en la apoptosis y la vía de JNK inducida por K5 y Sts es presentado en la Tabla 2.

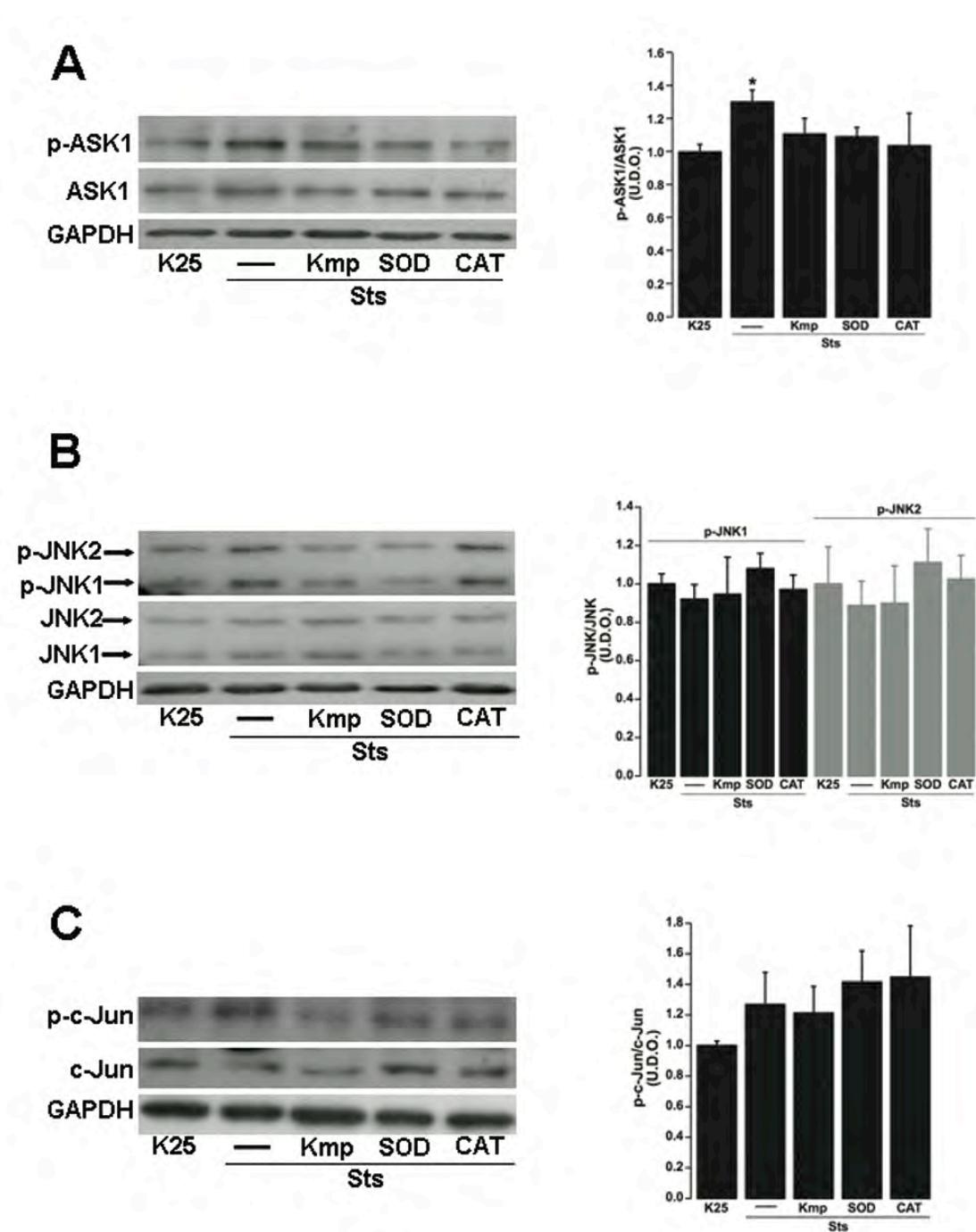


Fig. 14. Efecto de antioxidantes en la vía de JNK en CGC tratadas con Sts. CGC mantenidas en K25 por 7 DIV fueron tratadas con Sts 0.5 μ M en ausencia y presencia de kaempferol 20 μ M (Kmp), SOD 125 U/ml y CAT 125 U/ml por 5 h. Los niveles de proteínas fueron determinados por western blot. Barras representan la relación entre forma fosforilada y total para cada proteína, expresadas como unidades de densidad óptica arbitrarias (U.D.O.). **A:** p-ASK1 a 5 h de tratamiento. Barras son las medias \pm E.S. de tres experimentos independientes. **B:** p-JNK1 y p-JNK2 a 5 h de tratamiento. Barras son las medias \pm E.S. de tres experimentos independientes. **C:** p-c-Jun a 5 h de tratamiento. Barras son las medias \pm E.S. de tres experimentos independientes, * $p < 0.05$ versus K25.

Tabla 2

Efecto de SP600125 y kaempferol en la vía de JNK en CGC tratadas con K5 y estaurosporina

	K5	K5/SP	K5/Kmp	Sts	Sts/SP	St/Kmp
<i>Viabilidad celular (FDA/IP)</i>	59.04 %*	96.10 % [●]	79.30 % [●]	46.28 %*	43.28 %	60.62 % [✕]
<i>Actividad Caspasa 3</i>	1350 %*	25 % [●]	605% [●]	300 %*	375 %	146 % [✕]
<i>Condensación nuclear</i>	858 %*	156 % [●]	ND	1176 %*	1110 %	ND
<i>Generación EROs (DHEt)</i>	672 %*	616 %	182 % [●]	762 %*	599 %	444 % [✕]
<i>WB p-ASK1</i>	79 %*	ND	117 % [●]	130 %*	110 %	ND
<i>WB p-JNK1</i>	133 %*	103 % [●]	103 % [●]	94 %	101 %	94 %
<i>p-JNK2</i>	132 %*	100 % [●]	92 % [●]	92 %	99 %	89 %
<i>WB p-cJun</i>	133 %*	87 % [●]	96 % [●]	110 %	109 %	105%

CGN mantenidas en K25 por 7 DIV fueron transferidas a un medio K5 o tratadas con Sts 0.5 μ M en ausencia o presencia de SP600125 (SP) 10 μ M ó kaempferol (Kmp) 20 μ M. Los resultados representan la viabilidad celular a 24 h, la condensación nuclear a las 24 h, la actividad de caspasa a las 12 h, la generación de ERO a las 4.5 h y 5 h para K5 y Sts respectivamente. Los niveles de fosforilación de ASK1, JNK1/2 y c-Jun fueron medidos a las 3 h y 5 h para K5 y Sts respectivamente. Los resultados representan el porcentaje con respecto al control (K25), * $p < 0.05$ versus K25, [●] $p < 0.05$ versus K5, [✕] $p < 0.05$ versus Sts, ND: no determinado.

Anexo A: Artículo derivado de la primera parte del proyecto de Doctorado

G Model
NCI-2451; No of Pages 12

ARTICLE IN PRESS

Neurochemistry International xxx (2009) xxx–xxx



Contents lists available at ScienceDirect

Neurochemistry International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neuint



Role of oxidative stress and JNK pathway in apoptotic death induced by potassium deprivation and staurosporine in cerebellar granule neurons

Yazmín Ramiro-Cortés, Julio Morán*

Division of Neuroscience, Institute of Cell Physiology, National University of Mexico, Mexico City, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 March 2009
Received in revised form 1 May 2009
Accepted 21 May 2009
Available online xxx

Keywords:

Apoptosis
ROS
Antioxidants
SP600125
MAPK
Caspase

ABSTRACT

Several signaling pathways are differentially activated during apoptotic cell death. We have previously found that during apoptotic death of cerebellar granule neurons (CGN) induced by potassium deprivation (K5) and staurosporine there is an increase in the generation of reactive oxygen species (ROS). The inhibition of ROS generation reduces the extent of cell death. However, remain to be elucidated the mechanisms by which ROS participate in this apoptotic process. On the other hand, it is well known that c-Jun amino-terminal kinase (JNK) pathway plays a pivotal role in cell death of several cell types. In the present study we found that K5 activated the JNK pathway and that its inhibition with SP600125 markedly prevented caspase 3 activation, nuclear condensation and cell death induced by K5. In contrast, JNK pathway was not activated by staurosporine and the JNK inhibitor did not affect cell death induced by this stimulus. We also found that JNK inhibition did not affect ROS levels induced by K5 or staurosporine, suggesting that ROS are upstream of JNK pathway activation. Antioxidants increased ASK1 phosphorylation and decreased JNK1/2 and c-Jun phosphorylation induced by K5. According to these results, we suggest that apoptosis induced by K5 is JNK-dependent and mediated by ROS, but apoptosis induced by staurosporine is not dependent on JNK and that the observed ROS generation by staurosporine seems not to be involved in the activation of this signaling pathway.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Apoptosis is a type of programmed cell death involved in physiological and pathological conditions in the nervous system, including elimination of neurons during development (Oppenheim, 1991) and neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease, amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and Parkinson's disease (Christie et al., 2007; Cozzolino et al., 2006; Martin, 1999; Nakaso et al., 2008; Oh et al., 2006; Sajan et al., 2007; Tatton et al., 2003; Wu et al., 2005).

Apoptosis can be identified by some morphological and biochemical features such as blebbing of the plasma membrane, cell shrinkage, chromatin condensation, cleavage of DNA to generate a nucleosomal ladder of fragments (D'Mello et al., 1993; Kaufmann and Hengartner, 2001), exposure of phosphatidylserine on the cell surface, caspase activation (Morán et al., 1999;

Nardi et al., 1997), release of mitochondrial pro- and anti-apoptotic proteins (Alavez et al., 2003). Apoptosis is an active process that requires ATP, protein synthesis, RNA synthesis (Miller and Johnson, 1996; Schulz et al., 1996) as well as the inhibition or activation of several signaling pathways such as PI3K/Akt, mitogen-activated protein kinases (MAPKs) (Becker et al., 2004; Blomgren et al., 2007; Choi et al., 2004; Hoeflich et al., 1999; Kyriakis and Avruch, 2001; Luo et al., 2003; Macdonald et al., 2003; Tran et al., 2007), which are responsible for the activation of proteins or transcriptional factors involved in apoptosis.

MAPKs comprise a family of serine/threonine kinases that transduce signals in response to a wide variety of stimuli, including inflammatory cytokines, environmental stresses, DNA damage and growth factors (Kyriakis and Avruch, 2001; Raman et al., 2007). MAPKs phosphorylate and regulate positively or negatively the substrates such as transcription factors, protein kinases, phospholipases and cytoskeleton-associated proteins (Chang and Karin, 2001; Wada and Penninger, 2004; Widmann et al., 1999) involved in gene regulation, mitosis, differentiation, proliferation, metabolism, cell survival and apoptosis (Fujino et al., 2006; Kyriakis and Avruch, 2001; Wada and Penninger, 2004; Zhou et al., 2008). Four subfamilies of MAPKs have been identified: extracellular signal-related kinases (ERK1/2), c-Jun amino-terminal kinases (JNK1/2/3), p38 (α , β , γ , δ) and ERK5 (Jiang et al., 1996, 1997; Pimienta and Pascual, 2007; Pulverer et al., 1991).

Abbreviations: K25, high potassium; Sts, staurosporine; K5, potassium deprivation; CGN, cerebellar granule neurons; Kmp, kaempferol; CAT, catalase; SOD, superoxide dismutase; JNK, c-jun amino-terminal kinase; SP, SP600125; DHEC, dihydroethidium; FDA, fluorescein diacetate; PI, propidium iodide; DIV, days *in vitro*; MAPKs, mitogen-activated protein kinases; ASK1, apoptosis signal-regulating kinase 1; MAPKK, MAPK kinase; MAPKKK, MAPK kinase kinase.

* Corresponding author at: Division de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ap. Postal 70-253, México 04510, D.F., México. Tel.: +52 55 5622 5616; fax: +52 55 5622 5607.
E-mail address: jmoran@ifc.unam.mx (J. Morán).

0197-0186/\$ – see front matter © 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.neuint.2009.05.015

Please cite this article in press as: Ramiro-Cortés, Y., Morán, J., Role of oxidative stress and JNK pathway in apoptotic death induced by potassium deprivation and staurosporine in cerebellar granule neurons. *Neurochem. Int.* (2009), doi:10.1016/j.neuint.2009.05.015

JNK is involved in the control of cell death and is encoded by three genes JNK1/SAPK γ , JNK2/SAPK α and JNK3/SAPK β , these kinases are activated by dual phosphorylation in threonine and tyrosine residues by MAPK kinase (MKK4/7) which are activated by specific MAPK kinase kinase (MAPKKK) (Chang and Karin, 2001; Tibbles and Woodgett, 1999; Wada and Penninger, 2004). JNK1 and JNK2 are ubiquitous, whereas JNK3 is more restricted to brain, heart and testis (Davis, 2000). JNK has been recently related with oxidative stress response through apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) activation (Goldman et al., 2004; Tobiume et al., 2001). ASK1 is a MAPKKK regulated by diverse mechanisms, including phosphorylation, oligomerization and protein–protein interactions (Bunkoczi et al., 2007; Goldman et al., 2004; Ortner and Moelling, 2007; Tobiume et al., 2002; Zhang et al., 1999).

One of the most important substrates of JNK pathway is the transcriptional factor c-Jun, a major component of AP-1 complex (Bode and Dong, 2007), it has been reported that in sympathetic and granule neurons JNK is activated in response to UV radiation, NGF-deprivation and potassium deprivation (Behrens et al., 1999; Bruckner et al., 2001; Coffey et al., 2002; Xifro et al., 2006), but there exists a controversy about c-Jun activation by JNK in response to stress during apoptosis in cultures of cerebellar granule neurons (CGN) (Watson et al., 1998). When CGN are cultured in a medium containing high potassium (K25) during 7–8 days *in vitro* (DIV) and then are potassium deprived (K5) or treated with staurosporine (Sts), a non-selective PKC inhibitor, most cells die after 24–48 h apoptotically (Caballero-Benitez and Moran, 2003; D'Mello et al., 1997, 1993; Gallo et al., 1987; Moran et al., 1999). Many studies have reported that K5 induces a generation of reactive oxygen species (ROS) at early times of CGN apoptosis, suggesting that ROS could be a signal for cell death in this model (Coyoy et al., 2008; Martin-Romero et al., 2002; Samhan-Arias et al., 2004; Schulz et al., 1996; Valencia and Moran, 2001, 2004). In addition, the use of antioxidant compounds such as kaempferol (Kmp), vitamin E, catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) mimetics and NADPH oxidase inhibitors prevents neuronal apoptotic death in different models (Coyoy et al., 2008; Ferri et al., 2003; Greenlund et al., 1995; Samhan-Arias et al., 2004; Zhou et al., 2007), suggesting an important participation of ROS in apoptotic neuronal death. On the other hand, in hippocampal neurons, apoptosis induced by staurosporine is reduced when SOD Cu/Zn is overexpressed (Prehn et al., 1997). In CGN, staurosporine induces apoptotic death (Caballero-Benitez and Moran, 2003), but no information is available about the role of ROS and signaling pathways activated in this model.

In the present study, we used cultured CGN to evaluate the role of JNK pathway in apoptosis, particularly the relationship between oxidative stress and JNK pathway in apoptotic death induced by K5 and staurosporine.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Fetal calf serum, penicillin/streptomycin, basal Eagle medium were purchased from GIBCO, Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), dihydroethidium (DHEt), Hoechst 33258 and fluorescein diacetate (FDA) were purchased from Molecular Probes, Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Poly-L-lysine (mol. wt. >300,000), trypsin, trypsin inhibitor, DNase, cytosine arabinoside, kaempferol, DMSO and reagents for polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) were acquired from Sigma (St. Louis, MO, USA). CDP-Star enhanced chemiluminescence-detecting agent for phosphatase alkaline conjugated antibodies was purchased from Bio-Rad (Hercules, CA), ProSieb Protein Marker was purchased from Lonza (Basel, Switzerland), polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes were acquired from Millipore (Bedford, MA) and BioMax Light Film was purchased from Kodak (Rochester, N.Y.). Ac-DEVD-MCA was acquired from Peptides Intl. (Louisville, KY, USA), catalase, SOD and Complete were acquired from Roche (Indianapolis, IN), SP600125 were purchased from Tocris (Ellisville, MO, USA). Antibodies against ASK1, JNK, p-JNK, p-c-Jun and c-Jun were

purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) and p-ASK1 was purchased from Cell Signaling (Danvers, MA).

2.2. Cell cultures

All animals used for the experimentation described in the present study 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. 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) culture were prepared as previously described by Moran and Patel (1989), cell suspensions dissociated from 8-day-old Wistar rat cerebellum were plated at a density of 265×10^3 cells/cm² in plastic dishes coated previously with poly-L-lysine (5 μ g/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 μ g/ml streptomycin and 50 U/ml penicillin. This medium is referred in the text as K25. The cultures dishes were incubated at 37 °C in a humidified 5% CO₂/95% air atmosphere. Cytosine arabinoside (10 μ M) was added 20 h after seeding. After 7–8 days *in vitro* (DIV), neurons were either transferred to a serum-free medium containing 5 mM KCl (referred to in the text as K5) or treated with 0.5 μ M staurosporine (Sts) for varying times (0.5–48 h). Inhibitor of JNK activation (SP600125) and antioxidants were added simultaneously with K5 or Sts and were present until the end of the corresponding experiments.

2.3. Cell viability

Cell viability was estimated by fluorescein diacetate (FDA) and propidium iodide (PI) assay at 24 h after treatments of CGN. FDA permeates through cell membrane of healthy cells. The compound cannot leave the cell and emits green fluorescence when it is cleaved by esterases. Propidium iodide penetrates dying cells, binds DNA and emits red fluorescence. Cell plated in dishes and cultured in a K25 medium for 7 DIV and then switched to a K5 medium or treated with Sts in the presence or absence of 10 μ M of SP600125 (SP) for 24 h. CGN were incubated with 5 μ M of FDA and 5 μ M of PI for 5 min at 37 °C and then cells were washed twice with PBS observed and photographed with a fluorescence microscope using of 485–520 nm wavelengths for FDA and 450–510 nm wavelengths for PI.

2.4. Nuclear condensation

Nuclear condensation was evaluated by Hoechst 33258, which penetrates to cell and binds to DNA nuclei. Cells were plated on coverslips and cultured in a K25 medium for 7 DIV and then switched to a K5 medium or treated with Sts in the presence or absence of 10 μ M SP600125. After 24 h, cells were washed with PBS and fixed in 4% fresh formaldehyde at room temperature for 30 min, then cultures were washed with PBS and incubated with 0.001% Hoechst 33258 at room temperature for 5 min, washed with PBS and mounted with PBS-glycerol 1:1 (v/v). Cells were observed and photographed in an epifluorescent microscope with an UV BA-2 filter using a 340–460 nm wavelengths.

2.5. Caspase activity

Caspase 3 activity was evaluated by using the synthetic tetrapeptide Ac-DEVD-MCA. This peptide is preferentially proteolysed by this caspase that releases the fluorophore MCA, which induces an increase of fluorescence that is proportional to the activity of the caspase. CGN were treated from 6 to 48 h with K5 or Sts in the presence or absence of 10 μ M SP600125. Cells were washed with PBS and homogenized in lysis buffer (100 mM HEPES, 20 μ M EGTA, 1 mM EDTA at 7.5 pH), 10% (w/v) sucrose, 1 M DTT, 0.1% (w/v) CHAPS and 20 μ l/ml complete, diluted 1:1 (v/v) with glycerol and stored at –20 °C. Caspase activity was assayed by a fluorometric method (Thornberry et al., 1997) in a spectrofluorophotometer RF-5301PC from Shimadzu, using the synthetic tetrapeptide Ac-DEVD-MCA as substrate to detect the activity of caspase 3. The reactions were followed for 15 min at 360–440 nm after addition of 2.5 ml of a standard buffer (100 mM, HEPES, 20 μ M EGTA, 1 mM EDTA at 7.5 pH), 10% (w/v) sucrose, 1 M DTT, 0.1% (w/v) CHAPS and 2 μ l/ml complete), 5 μ M Ac-DEVD-MCA and cell homogenate (30 μ g/ml). Results are expressed as DEVDase activity as change in fluorescence intensity/h/mg protein.

2.6. Measurement of ROS

ROS generation was measured by using dihydroethidium (DHEt), which intercalates within cell DNA and emits fluorescence when it is oxidized by ROS. Cells were plated on coverslips and cultured in a K25 medium for 7 DIV and then switched to a K5 medium for 30 min to 12 h or treated Sts for 1–12 h. Cells in K5 for 4.5 h or Sts for 5 h were treated in the presence or absence of 10 μ M SP600125 or antioxidants such as 20 μ M kaempferol (Kmp), 125 U/ml superoxide dismutase (SOD) and 125 U/ml catalase (CAT). After 4.5 h for K5 and 5 h for Sts cells were incubated with 3.2 μ M dihydroethidium (DHEt) for 20 min at 37 °C, after washed

with PBS and then fixed in 3% fresh formaldehyde for 7 min at room temperature and mounted with PBS–glycerol 1:1 (v/v). Cells were examined in an epifluorescent microscope using a rhodamine filter with 488–515 nm.

2.7. Western blot

CGN were cultured in a K25 medium for 7 DIV and then switched to a K5 medium or treated with Sts for several times, or treated for 3 h or 30 min with K5 and 5 h with Sts in presence of 10 μM SP600125 or antioxidants. Cells were washed twice in ice-cold PBS, and homogenized in lysis buffer (20 mM Tris–HCl, pH 7.8, 1 mM EDTA, 20 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 0.5 mM Na₃VO₄, 0.5 mM PMSF, 1 mM NaF, 1 μg/ml leupeptine, 1 μg/ml aprotinin and 1 μg/ml pepstatin). The protein concentration of cellular homogenates was determined by the method of Bradford (1976). Homogenates (40 μg protein per lane) were subjected to 12.5% SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes at 100 V for 1 h. The membranes were blocked with Tris-buffered saline (TBS)/Tween 20 (TTBS) buffer (100 mM Tris–HCl, 150 mM NaCl and 0.1% Tween, pH 7.5) containing 5% nonfat dry milk for 1 h at room temperature and incubated overnight with the primary antibody. Antibodies used were as follows: 1:250 rabbit anti-ASK1, 1:1000 rabbit anti-p-ASK1, 1:250 mouse anti-JNK1/2, 1:250 mouse anti-p-JNK1/2, 1:250 rabbit anti-c-Jun, 1:250 rabbit anti-p-c-Jun and 1:2000 mouse anti-GAPDH. After further washing, the blots were incubated with alkaline phosphatase-conjugated secondary antibodies for 1 h at room temperature. Bands were visualized using chemiluminescence according to the manufacturer's recommendations and exposed to Kodak BioMaxLightFilm.

2.8. Statistical analysis

Data are expressed as means ± SE. Statistical significance was determined by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison tests. To determinate the statistical significance for caspase 3 activity, we applied Kruskal–Wallis followed by Dunn test. At least three independent experiments using different cultures sets were

carried out for each of assay. A value of *p* < 0.05 was accepted to indicate a statistically significance difference.

3. Results

3.1. Effect of K5 and staurosporine on JNK pathway activation

In order to elucidate the role of JNK pathway in apoptosis induced by K5 and Sts in CGN, neuronal cultures maintained in K25 medium for 7 DIV were switched to K5 medium for 30 min, 3 or 4.5 h or treated with Sts for 30 min, 1, 3 or 5 h. Some cultures were treated with K5 for 3 h or Sts for 5 h plus SP600125 (SP). The levels of ASK1, p-ASK1, JNK, p-JNK, c-Jun and p-c-Jun were evaluated by Western blot. Under K5 condition the ASK1 levels remained without change at all times evaluated, however, the ASK1 phosphorylation on Ser-967 decreased at 3 h after treatment with K5 (Fig. 1A). In contrast, we detected a transient increase in the total levels of JNK1 and JNK2 at 3 h (Fig. 1B). Also, a basal activity of JNK1 and JNK2 was detected under control condition (K25). In K5-treated cells we found a significant increase in the levels of p-JNK1 and p-JNK2 after 30 min reaching a maximum level at 3 h and remained until 4.5 h (Fig. 1B). SP600125 (SP) markedly decreased the levels of p-JNK1 and p-JNK2 induced by K5 at 3 h (Fig. 1B). We also examined c-Jun activation, one of the preferred transcription factors activated by JNK. Our results showed that the levels of

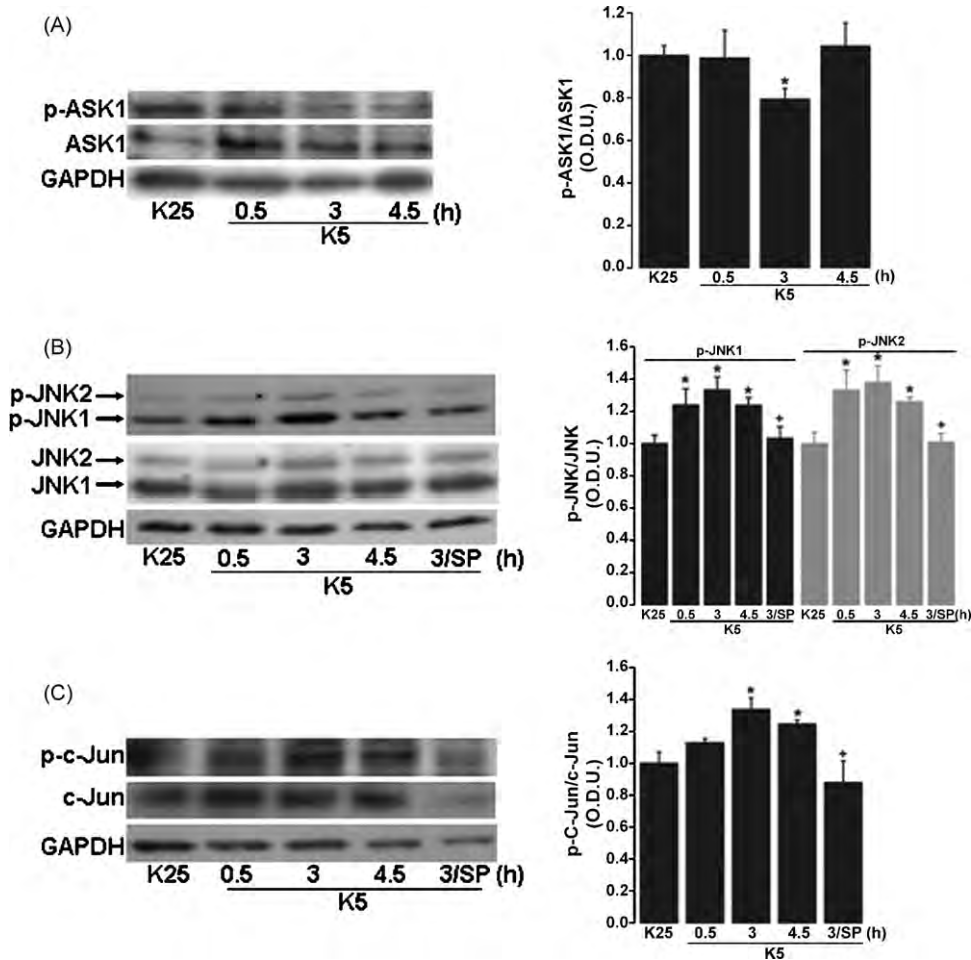


Fig. 1. Effect of K5 on JNK pathway activation. Cells maintained in K25 for 7 DIV were transferred to a K5 medium for 0.5, 3 and 4.5 h. Some cultures were treated K5 and 10 μM SP600125 (SP) for 3 h. Bars indicate the ratio of the phosphorylated protein and the total protein expressed in optic density units (O.D.U.). (A) Time course of p-ASK1 levels. Bars are means ± S.E. of seven independent experiments. (B) Time course of p-JNK1 and p-JNK2 levels. Bars are means ± S.E. of three independent experiments, **p* < 0.05 versus K25. (C) Time course of p-c-Jun. Bars are means ± S.E. of six independent experiments, **p* < 0.05 versus K25, **p* < 0.05 versus K5 3 h.

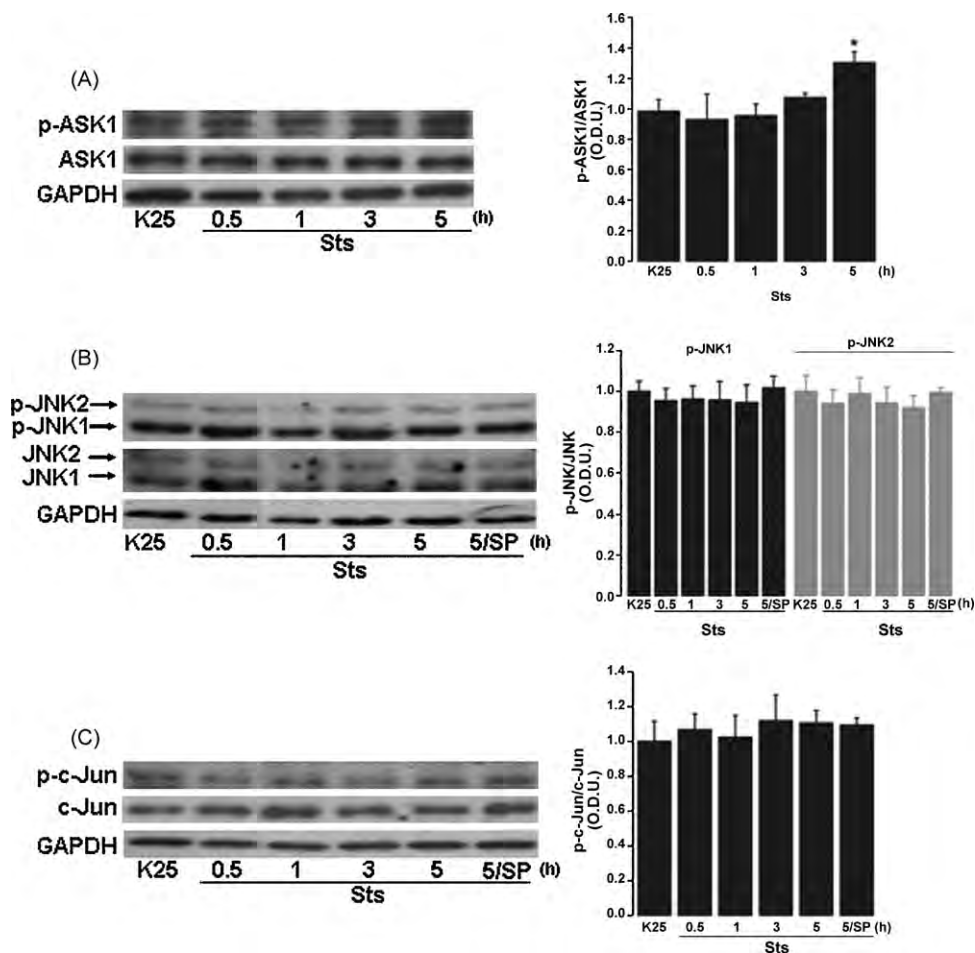


Fig. 2. Effect of staurosporine on JNK pathway. Cells maintained in K25 for 7 DIV were treated with 0.5 μ M Sts for 0.5, 1, 3 and 5 h. Some cultures were treated Sts and 10 μ M SP600125 (SP) for 5 h. Bars indicate the ratio of the phosphorylated protein and the total protein expressed in optic density units (O.D.U.). (A) Time course of p-ASK1 levels. Bars are the means \pm S.E. of four independent experiments. (B) Time course of p-JNK1 and p-JNK2 levels. Bars are means \pm S.E. of three independent experiments. (C) Time course of p-c-Jun levels. Bars are means \pm S.E. of four independent experiments, * $p < 0.05$ versus K25.

p-c-Jun were significantly increased after 3 h of K5 treatment and remained high until 4.5 h (Fig. 1C). Also, the inhibition of JNK activation by SP decreased the observed increased levels of p-c-Jun induced by K5 at 3 h (Fig. 1C).

In contrast to the above results, we found that Sts increased levels of p-ASK1 at 5 h after treatment (Fig. 2A). Interestingly, in contrast to K5, Sts did not have any effect on the levels of p-JNK1 and p-JNK2 at all times measured (Fig. 2B). Finally, in agreement with these results, Sts did not modify the levels of p-c-Jun at any time measured (Fig. 2C).

3.2. Effect of JNK activation inhibitor on cell death induced by K5 and staurosporine

The role of JNK activation in apoptosis induced by K5 and Sts was evaluated using SP an inhibitor of the JNK activation. Cell viability was measured 24 h after transferring cells to K5 medium or treatment with Sts. These treatments resulted in morphological changes of CGN. After 24 h of K5 or Sts, most cells exhibited degeneration of somas and neuritic processes degradation analyzed by phase contrast microscopy (Fig. 3A). Consequently, a reduction in the number of viable cells induced by K5 was detected with FDA, which stains healthy cells and PI which stains death cells. When cells were treated simultaneously with K5 and SP the cell viability was markedly rescued. Cells treated with K5 resulted in a $54.17 \pm 1.25\%$ of viable cells, while cells treated with K5 and SP were $88.17 \pm 1.2\%$ of viable cells (Fig. 3B).

On the other hand, CGN treated with Sts also showed morphological alterations (Fig. 3A). CGN treated with Sts the cell viability after 24 h was $42.46 \pm 3.1\%$ of viable cells. Cell death induced by Sts was not prevented by SP ($39.71 \pm 4.89\%$ of viable cells) (Fig. 3B).

A canonical hallmark of apoptosis is the caspase 3 activation. This parameter was evaluated with a fluorogenic substrate Ac-DEVD-MCA as detailed in Section 2. Under our conditions, we detected a significant increased of caspase 3 activity in CGN after 6 h of treatment with K5. The maximum level was reached between 12 and 24 h. The protective effect of SP on cell viability was in agreement with the observed inhibitory action of SP on caspase 3 activation induced by K5 (Fig. 4A). In CGN treated with Sts the activity of caspase 3 increased at 8 h after the treatment, reaching the maximum activity after 24 h (Fig. 4B). The JNK activation inhibitor (SP) did not have any statistically significant effect in the caspase 3 activity induced by Sts (Fig. 4B).

Condensed nuclei, other hallmark of apoptosis (Valencia and Moran, 2001), was also evaluated by Hoechst staining as described in Section 2. Fig. 4C shows photomicrographs of CGN in control condition (K25), treated with K5 or Sts in the presence or absence of SP for 24 h. According to our results, under K25 conditions $3.56 \pm 0.6\%$ cells presented condensed nuclei (Fig. 4D) and $30.56 \pm 2.54\%$ of cells treated with K5 showed condensed nuclei. As it was expected, cells treated with K5 and SP showed a marked reduction in the nuclear condensation of $5.8 \pm 1.4\%$ (Fig. 4D). In cells treated with Sts we detected $41.88 \pm 4.07\%$ of condensed nuclei,

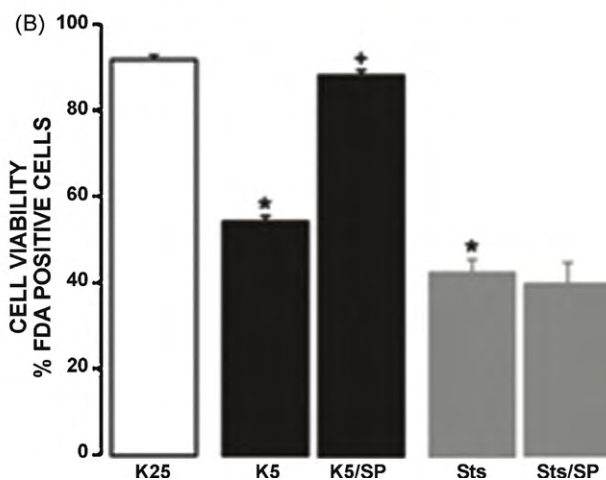
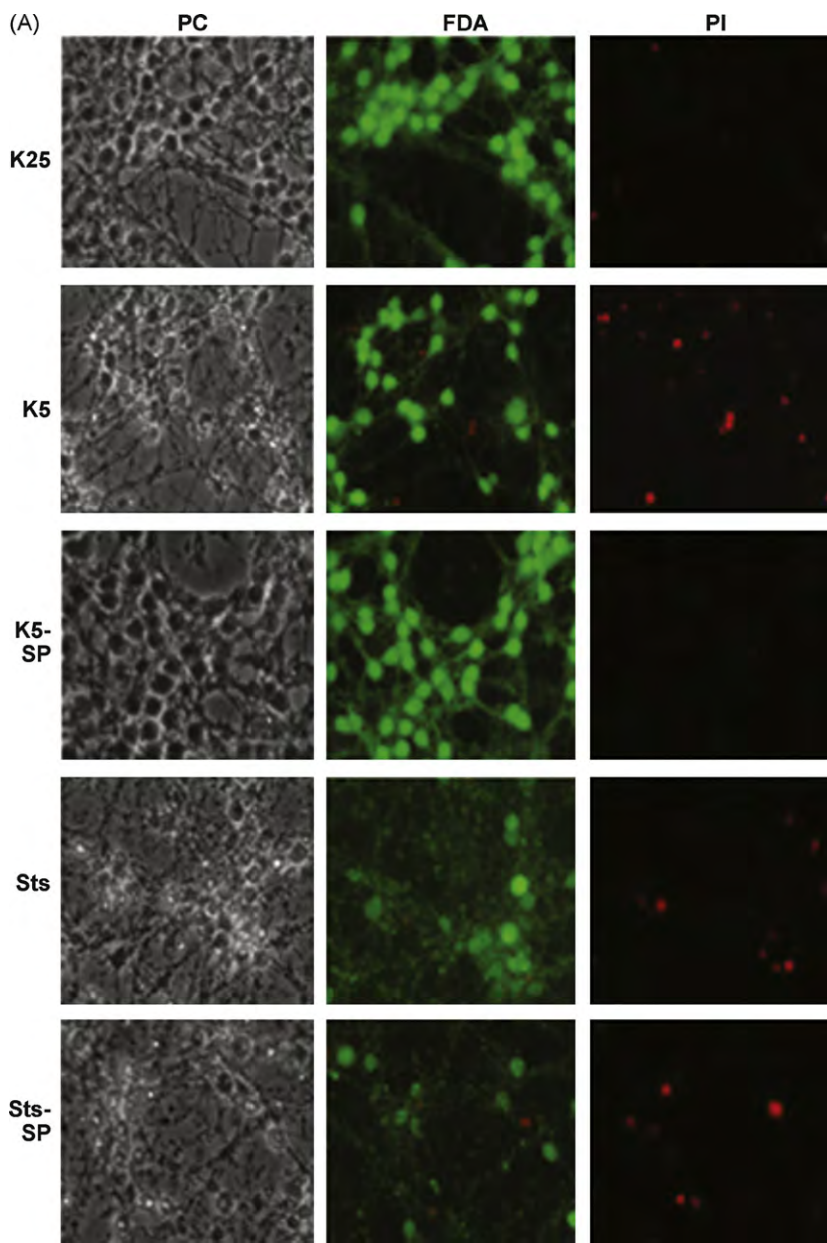


Fig. 3. Effect of JNK inhibition on cell death induced by K5 and staurosporine. Cells maintained in K25 for 7 DIV were transferred to a K5 medium or treated with 0.5 μ M Sts in the presence or absence of 10 μ M SP600125 (SP), after 24 h each treatment the cell viability was determined by FDA/PI assay. (A) Photomicrographs of cells in phase contrast dyed with FDA and dyed with PI. (B) Quantification of cell viability. Results are expressed as the percentage of FDA positive cells from total cells. Bars are the means \pm S.E. of ten independent experiments, * $p < 0.05$ versus K25, * $p < 0.05$ versus K5.

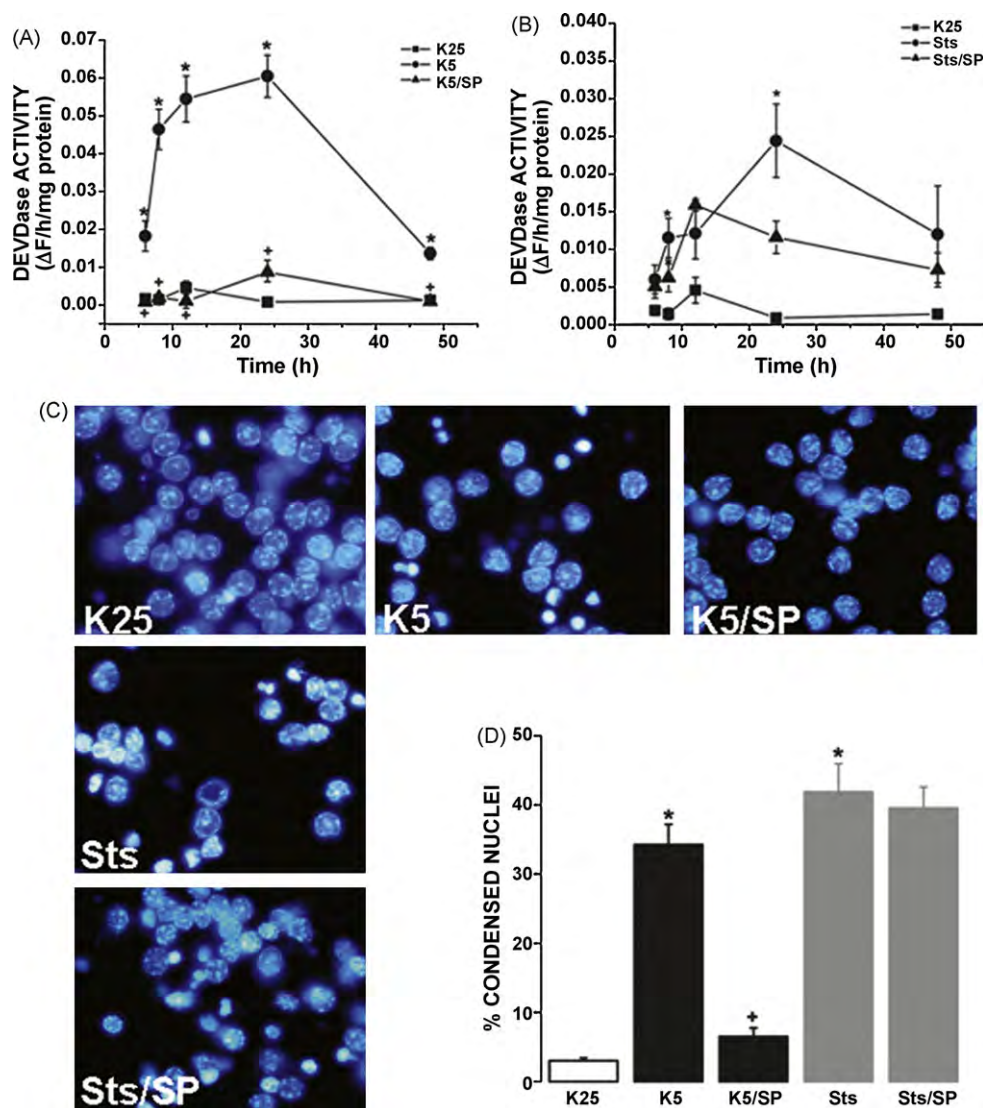


Fig. 4. Effect of SP600125 on caspase 3 activity and nuclei condensation induced by K5 and Sts. (A and B) Cells maintained in K25 for 7 DIV were transferred to a K5 medium or treated with 0.5 μ M Sts in the absence or presence of 10 μ M SP600125 (SP) for 6–48 h. Caspase 3 activity was evaluated by fluorometric method. Results are expressed as fluorescence change per hour per milligram of protein and are means \pm S.E. of ten independent experiments, * p < 0.05 versus K25, * p < 0.05 versus K5. (C) Photomicrographs of CGN maintained in K25 for 7 DIV were transferred to a K5 medium or treated with 0.5 μ M Sts in the absence or presence of 10 μ M SP600125 after 24 h each treatment the nuclei condensation was evaluated by Hoechst dye and observed in fluorescence microscopy. (D) The results are expressed as the percentage of nuclei condensation and the bars are means \pm S.E. of five independent experiments, * p < 0.05 versus K25, * p < 0.05 versus K5.

thereby in agreement with our results of cell viability, SP did not have any effect on this parameter by showing $39.54 \pm 3.06\%$ of cells with condensed nuclei (Fig. 4D).

3.3. Effect of JNK activation inhibitor on ROS generation induced by K5 and staurosporine

We explore a possible relationship of ROS with JNK in apoptosis induced by K5 and Sts in CGN. Based on a time course of ROS production in cells treated with K5, as well as previous results (Valencia and Moran, 2001) we detected a maximum level of ROS generation at 4.5 h ($12.58 \pm 1.42\%$) (Fig. 5A). Thus, we measured the ROS generation with DHET in cells treated for 4.5 h with K5 in the presence or absence of SP (Fig. 5C).

Fig. 5 D shows that ROS generation detected by DHET increased $46.41 \pm 4.1\%$ by K5 at in contrast to K25 that showed $6.9 \pm 3.2\%$ positive cells to ROS. Under these conditions we did not observe any effect of the inhibitor of JNK (SP) ($42.51 \pm 4.25\%$ positive cells to ROS) (Fig. 5C and D) suggesting that JNK activation could be downstream of

ROS generation. On the other hand, we found that the maximum level of ROS generation induced by Sts was reached after 5 h of treatment ($10.68 \pm 2.21\%$), based in time course (Fig. 5B). The presence of the inhibitor of JNK activation did not diminish the ROS generation ($41.39 \pm 4.3\%$) compared with Sts alone $52.626 \pm 5.080\%$ positive cells to ROS (Fig. 5C and D).

3.4. Effect of antioxidants on JNK activation induced by K5 and staurosporine

To elucidate the possible role of oxidative stress in the JNK pathway activation induced by K5 we studied the effect of antioxidant compounds in this process. Under our conditions, we detected that ASK1 phosphorylation at Ser-967 decreased upon K5 treatment. This effect was completely reverted by kaempferol (Kmp), SOD and catalase (CAT) (Fig. 6A).

In order to assert that ROS generation is upstream to JNK activation induced by K5, we measured the phosphorylation of JNK1 and JNK2 induced by K5 at 30 min in the presence of

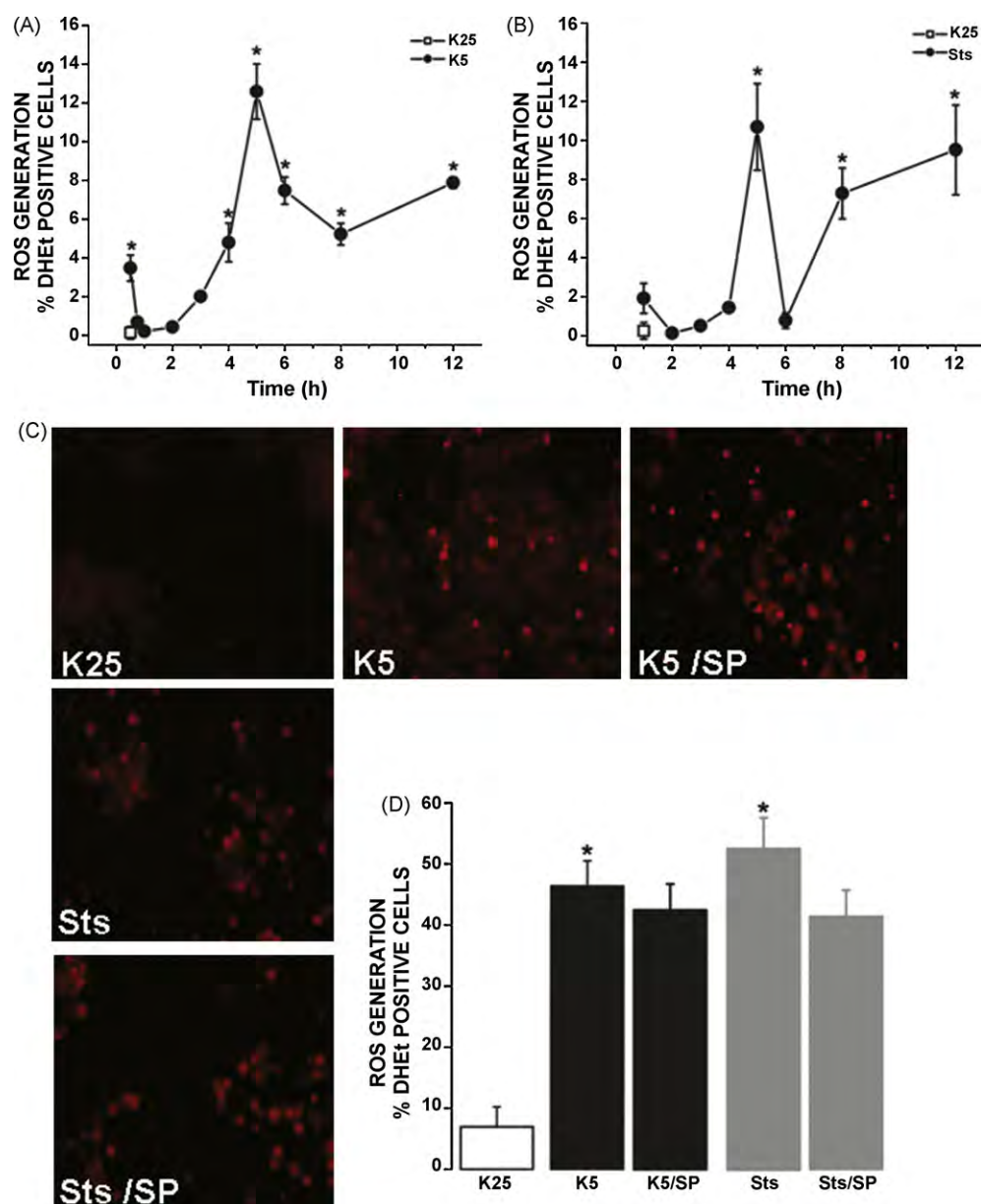


Fig. 5. Effect of JNK inhibition of ROS generation induced by K5 and staurosporine. (A and B) Time course of ROS generation induced by K5 and Sts. Cells maintained in K25 for 7 DIV were transferred to a K5 medium for 30 min to 12 h or treated with 0.5 μ M Sts for 1–12 h. ROS generation was evaluated by DHEt dye and observed in fluorescence microscopy. Results are expressed as percentage of positive cells to DHEt from total cells are the means \pm S.E. of four independent experiments, * $p < 0.05$ versus K25. (C) Photomicrographs of CGN maintained in K25 for 7 DIV were transferred to a K5 medium or treated with 0.5 μ M Sts in the absence or presence of 10 μ M SP600125 (SP) after 4.5 h for K5 and 5 h for Sts. (D) Results are expressed as percentage of positive cells to DHEt from total cells. Bars are the means \pm S.E. of five independent experiments, * $p < 0.05$ versus K25.

antioxidants. Kmp diminished the phosphorylation of JNK1 and JNK2, SOD and CAT did not have any effect (Fig. 6B). The phosphorylation of JNK1 and JNK2 was also diminished by Kmp, SOD and CAT after 3 h of K5 treatment (Fig. 6C). Finally, we found an increase of c-Jun phosphorylation by K5 that was completely reduced by Kmp (Fig. 6D). These results were in line with the observation that Kmp (74.17 \pm 3.51% of viable cells), SOD (66.05 \pm 1.86% of viable cells) and, in a lesser extent, CAT (58.71 \pm 1.22% of viable cells) were able to protect of the cell death of CGN induced by K5 (50.47 \pm 1.89% of viable cells) at 24 h. In all cases, antioxidants also clearly reduced around 60%, the ROS generation induced by K5 at 4.5 h and that induced by Sts at 5 h (Table 1). Also, Kmp decreased the caspase 3 activity induced by K5 and Sts (Table 2).

We also investigated the effects of antioxidants on the JNK pathway in CGN treated with Sts during 5 h. Fig. 7A shows that Sts

induced ASK1 phosphorylation, but none of the antioxidants used had any effect. The phosphorylation of JNK1 and JNK2 was not affected by any of the antioxidants used in cells treated with Sts for 5 h (Fig. 7B). Finally, c-Jun protein levels or phosphorylated c-Jun were not modified by antioxidant tested (Fig. 7C). A summary of the effect of SP and a representative antioxidant on apoptosis and JNK pathway activation induced by K5 and Sts is presented in Table 2.

4. Discussion

It has been widely characterized that the apoptotic death of CGN induced by potassium deprivation (K5) is a process that requires of synthesis and participation of several proteins (Alavez et al., 2003; Coffey et al., 2002; D'Mello et al., 1993; Miller and Johnson, 1996; Moran et al., 1999; Nardi et al., 1997). In this regard,

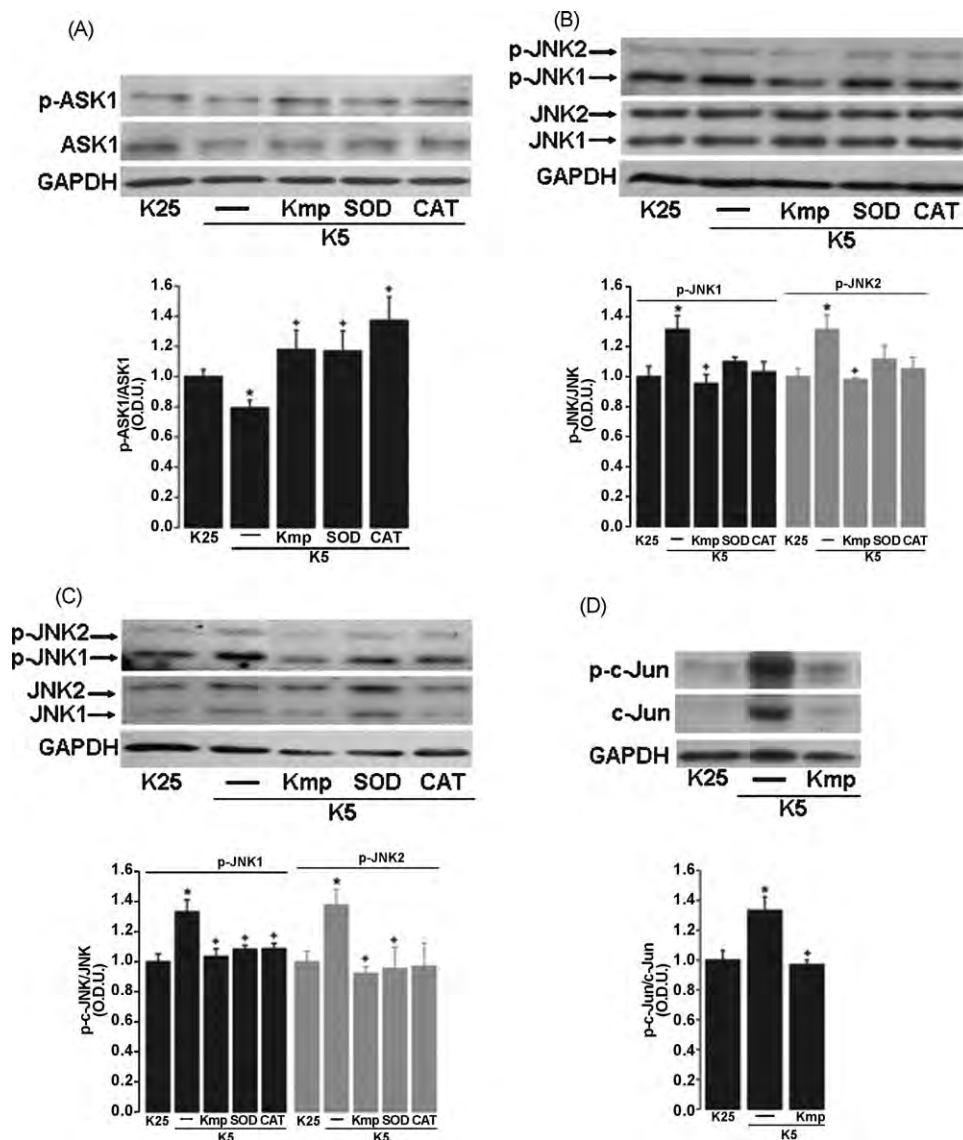


Fig. 6. Effect of antioxidants on JNK pathway activation induced by K5. Cells maintained in K25 for 7 DIV were transferred to a K5 medium in the absence or presence of 20 μ M kaempferol (Kmp), 125 U/ml superoxide dismutase (SOD) and 125 U/ml catalase (CAT) for 30 min and 3 h. Bars indicate the ratio of the phosphorylated protein and the total protein expressed in optical density units (O.D.U.). (A) p-ASK1 at 3 h of treatment. Bars are the means \pm S.E. of four independent experiments, * p < 0.05 versus K25, + p < 0.05 versus K5. (B) p-JNK1 and p-JNK2 at 30 min of treatment. Bars are the means \pm S.E. of four independent experiments, * p < 0.05 versus K25, * p < 0.05 versus K5. (C) p-JNK1 and p-JNK2 at 3 h of treatment. Bars are the means \pm S.E. of three independent experiments, * p < 0.05 versus K25, * p < 0.05 versus K5. D: p-c-Jun at 3 h of treatment. Bars are the means \pm S.E. of three independent experiments, * p < 0.05 versus K25, * p < 0.05 versus K5.

in the present work we observed that K5 induced a significant increase of JNK1, JNK2 and c-Jun protein levels as well as JNK1, JNK2 and c-Jun activation detected as its phosphorylation.

On the other hand, we also demonstrated that c-Jun is activated by K5 in CGN, as it was previously shown (Coffey et al., 2002; Harada and Sugimoto, 1999; Harris et al., 2002; Watson et al., 1998; Xifro et al., 2006; Yamagishi et al., 2003). Nevertheless, some controversy exists about the idea that whether c-Jun activation by K5 is mediated by JNK activation. Some reports have suggested that JNK is not activated by K5 in CGN (Coffey et al., 2002; Harada and Sugimoto, 1999; Watson et al., 1998), while other studies have shown that JNK is responsible for c-Jun activation during K5-induced apoptosis in CGN (Harris et al., 2002; Xifro et al., 2006).

Our study supports the notion that the apoptotic death of CGN induced by K5 is mediated by JNK activation involving c-Jun participation. Regarding the latter, we showed a marked phosphorylation of both JNK1 and JNK2 whose temporal activation

clearly corresponded to the observed increase in the levels of p-c-Jun. Besides, the inhibition of JNK activation with SP600125 significantly reduced to basal levels of the phosphorylation of c-Jun and JNK1 and JNK2, supporting the idea that c-Jun is activated by JNK in CGN treated with K5.

Also, we found that SP600125 markedly prevented the cell death of CGN and almost totally prevented all the apoptotic parameters evaluated, including caspase 3 activation and nuclear condensation. Thus, all these results support a pivotal role of JNK pathway via c-Jun in apoptotic death induced by K5 in CGN.

In contrast to K5, the mechanism of Sts-induced apoptosis of CGN, including the signaling pathway involved, is unknown. In this study, our results showed that JNK pathway is not activated by Sts. This is based on the observation that under this condition any of the elements of the JNK pathway, including JNK1/2 and c-Jun, modified their state of phosphorylation, except ASK1, which showed an increased phosphorylation on Ser-967. In addition, the inhibition of JNK activity by SP600125 did not have any effect on

Table 1
Effect of antioxidants on ROS generation induced by K5 and staurosporine.

Conditions	ROS generation
K25	0.318 ± 0.109
K5	22.921 ± 2.087 [†]
K5/Kmp	6.164 ± 1.230 [*]
K5/SOD	13.958 ± 1.749 [*]
K5/CAT	9.632 ± 1.721 [*]
Sts	7.999 ± 1.326 [*]
Sts/Kmp	4.664 ± 0.436 [×]
Sts/SOD	5.117 ± 0.319 [×]
Sts/CAT	4.695 ± 0.716 [×]

CGN maintained in K25 for 7 DIV were transferred to a K5 medium in the absence or presence of 20 μM kaempferol (Kmp), 125 U/ml superoxide dismutase (SOD) or 125 U/ml catalase (CAT) during 4.5 h DHEt. ROS generation is expressed as the percentage of positive cells to DHEt and are the means ± S.E. of four independent experiments.

^{*} *p* < 0.05 versus K25.

[†] *p* < 0.05 versus K5.

[×] *p* < 0.05 versus Sts.

cell death, caspase 3 activation and nuclear condensation induced by Sts.

The observed lack of effect of Sts on JNK pathway activation could be due to the suggestion that Sts may act as an inhibitor of ASK activation by blocking the catalytic ATP binding site (Bunkoczi et al., 2007). In addition, it has also been reported that PKC could act by regulating JNK activation in response to death stimuli (Lang et al., 2004), therefore the inhibition of PKC by Sts could contribute to decrease the pro-apoptotic activity of JNK (Lopez-Bergami et al., 2005; Lopez-Bergami and Ronai, 2008). Thus, although it is known that cell death induced by Sts and K5 share some common mechanisms, such as caspase activation (Krohn et al., 1998), apoptosis induced by Sts is JNK independent, suggesting an alternative mechanism of Sts in apoptotic cell death of CGN.

We and other groups have previously reported a ROS generation after 3.5–4.5 h of K5 treatment (Martin-Romero et al., 2002; Valencia and Moran, 2001) and in this and other neuronal models the antioxidants prevented apoptosis (Martin-Romero et al., 2002; Samhan-Arias et al., 2004; Valencia and Moran, 2001). According to these reports, in the present study we found that the antioxidants tested here were efficient in

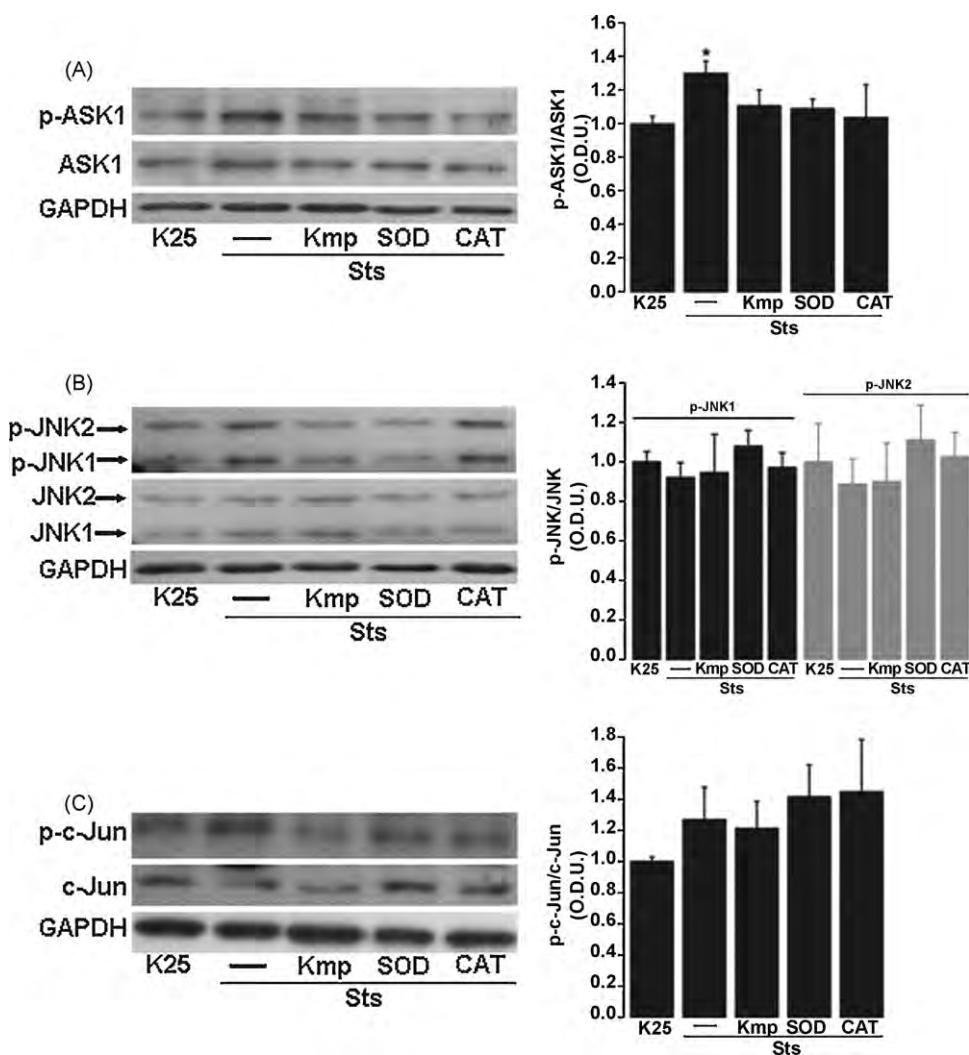


Fig. 7. Effect of antioxidants on JNK pathway in cells treated with staurosporine. Cells maintained in K25 for 7 DIV and treated with 0.5 μM Sts in the absence or presence of 20 μM kaempferol (Kmp), 125 U/ml superoxide dismutase (SOD) and 125 U/ml catalase (CAT) for 5 h, proteins levels were determined by Western blot. Bars indicate the ratio of the phosphorylated protein and the total protein expressed in optic density units (O.D.U.). (A) p-ASK1 at 5 h of treatment. Bars are means ± S.E. of three independent experiments, ^{*}*p* < 0.05 versus K25. (B) p-JNK1 and p-JNK2 at 5 h of treatment. Bars are means ± S.E. of three independent experiments (C) p-c-Jun at 5 h of treatment. Bars are means ± S.E. of three independent experiments.

Table 2
Effect of SP6125 and kaempferol on JNK pathway activation induced by K5 and staurosporine.

	K5	K5/SP	K5/Kmp	Sts	Sts/SP	St/Kmp
Cell viability (FDA/PI)	59.04% [†]	96.10% [*]	79.30% [*]	46.28% [†]	43.28%	60.62% [×]
Caspase 3 activity	1350%	25% [*]	605% [*]	300%	375%	146% [×]
Nuclear condensation	858% [†]	156% [*]	ND	1176% [†]	1110%	ND
ROS generation (DHEt)	672% [†]	616% [*]	182% [*]	762% [†]	599%	444% [×]
WB p-ASK1	79% [†]	ND	117% [*]	130% [†]	110%	ND
WB p-JNK1	133% [†]	103% [*]	103% [*]	94%	101%	94%
p-JNK2	132% [†]	100% [*]	92% [*]	92%	99%	89%
WB p-cJun	133% [†]	87% [*]	96% [*]	110%	109%	105%

CGN maintained in K25 for 7 DIV were transferred to a K5 medium or treated with 0.5 μ M Sts in the absence or presence of 10 μ M SP600125 (SP) or 20 μ M Kaempferol (Kmp). Results represent the cell viability at 24 h, the nuclear condensation at 24 h, caspase 3 activity at 12 h, ROS generation at 4.5 and 5 h for K5 and Sts, respectively. The levels of p-ASK1, p-JNK1/2 and p-c-Jun were measured at 3 and 5 h for K5 and Sts, respectively. Results represent the percentage with respect the control (K25). ND: not determined.

[†] $p < 0.05$ versus K25.

^{*} $p < 0.05$ versus K5.

[×] $p < 0.05$ versus Sts.

preventing ROS generation and cell death induced by K5. On the other hand, we found that the ROS generation induced by K5 seems to be upstream to JNK pathway activated by K5 because JNK inhibition did not prevent ROS generation induced by K5. In line with these results we also found that JNK and c-Jun remained active after 4.5 h of K5 treatment, suggesting that JNK pathway could be activated around the same time when ROS reaches a maximum level.

It has been reported that MAPKs are activated by ROS in apoptosis induced by different stimuli in a variety of models (Bhat and Zhang, 1999; Goldman et al., 2004; Wang et al., 2003). It has been described that JNK pathway can be activated by oxidative stress through ASK1 (Gotoh and Cooper, 1998; Saitoh et al., 1998; Schroeter et al., 2001). In this regard, it has been reported that embryonic fibroblast cells from ASK1^{-/-} mice fail to maintain a sustained activation of JNK induced by H₂O₂ and are resistant to H₂O₂-induced apoptosis (Tobiume et al., 2001). It has also reported in COS7 cells that oxidative stress induced by H₂O₂ promotes the dissociation of the 14-3-3 protein from ASK1, which leads to the dephosphorylation of ASK1 Ser-967 and a subsequent activation of ASK1 and JNK (Goldman et al., 2004; Zhang et al., 1999). Based on these evidences, we investigated a possible involvement of oxidative stress induced by K5 in the JNK pathway activation through the phosphorylation of ASK1 Ser-967. According to the previous reports showing that antioxidants partially prevented cell death induced by K5 (Martin-Romero et al., 2002; Samhan-Arias et al., 2004; Valencia and Moran, 2001) we found that several antioxidants were able to increase the levels of p-ASK1 with a reduction of p-JNK1, p-JNK2, c-Jun and p-c-Jun levels induced by K5.

Interestingly, we observed that phosphorylation of ASK1 on Ser-967 increased in CGN treated with Sts, this could be due to a suggested inhibitory action of Sts over ASK1 activation (Bunkoczi et al., 2007). This is in line with the mentioned lack of action of Sts on JNK1/2 and c-Jun activation. It is noteworthy to mention that regardless the action of Sts on JNK pathway activation, Sts induced ROS generation in CGN, which has been previously reported in retinal neurons and PC12 cells (Gil et al., 2003; Kruman et al., 1998). All tested antioxidants clearly diminished the observed ROS generation induced by Sts. However, the JNK inhibitor did not prevent ROS generation induced by Sts. Antioxidants did not significantly affect the levels of p-ASK1, p-JNK1, p-JNK2 and p-c-Jun.

In summary, we argue that apoptotic cell death induced by K5 in CGN is mediated by the ASK1-JNK1/2-c-Jun pathway through an action of ROS acting upstream to ASK1 activation. In contrast, apoptotic cell death induced by Sts is independent of the JNK pathway and the oxidative stress induced by Sts seems to act at a different level.

Acknowledgements

The authors are grateful to Guadalupe Dominguez for the excellent technical assistance. This work was supported by DGAPA-UNAM (IN223107) and CONACYT (47158Q). This study was performed in partial fulfillment of the requirements for the Ph.D. degree in Biomedical Sciences of Yazmín Ramiro-Cortés at the Universidad Nacional Autónoma de México and was supported by a CONACYT fellowship.

References

- Alavez, S., Pedroza, D., Moran, J., 2003. Mechanisms of cell death by deprivation of depolarizing conditions during cerebellar granule neurons maturation. *Neurochem. Int.* 43, 581–590.
- Becker, E.B., Howell, J., Kodama, Y., Barker, P.A., Bonni, A., 2004. Characterization of the c-Jun N-terminal kinase-BimEL signaling pathway in neuronal apoptosis. *J. Neurosci.* 24, 8762–8770.
- Behrens, A., Sibilia, M., Wagner, E.F., 1999. Amino-terminal phosphorylation of c-Jun regulates stress-induced apoptosis and cellular proliferation. *Nat. Genet.* 21, 326–329.
- Bhat, N.R., Zhang, P., 1999. Hydrogen peroxide activation of multiple mitogen-activated protein kinases in an oligodendrocyte cell line: role of extracellular signal-regulated kinase in hydrogen peroxide-induced cell death. *J. Neurochem.* 72, 112–119.
- Blomgren, K., Leist, M., Groc, L., 2007. Pathological apoptosis in the developing brain. *Apoptosis* 12, 993–1010.
- Bode, A.M., Dong, Z., 2007. The functional contrariety of JNK. *Mol. Carcinog.* 46, 591–598.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Bruckner, S.R., Tammariello, S.P., Kuan, C.Y., Flavell, R.A., Rakic, P., Estus, S., 2001. JNK3 contributes to c-Jun activation and apoptosis but not oxidative stress in nerve growth factor-deprived sympathetic neurons. *J. Neurochem.* 78, 298–303.
- Bunkoczi, G., Salah, E., Filippakopoulos, P., Fedorov, O., Muller, S., Sobott, F., Parker, S.A., Zhang, H., Min, W., Turk, B.E., Knapp, S., 2007. Structural and functional characterization of the human protein kinase ASK1. *Structure* 15, 1215–1226.
- Caballero-Benitez, A., Moran, J., 2003. Caspase activation pathways induced by staurosporine and low potassium: role of caspase-2. *J. Neurosci. Res.* 71, 383–396.
- Chang, L., Karin, M., 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410, 37–40.
- Choi, W.S., Eom, D.S., Han, B.S., Kim, W.K., Han, B.H., Choi, E.J., Oh, T.H., Markelonis, G.J., Cho, J.W., Oh, Y.J., 2004. Phosphorylation of p38 MAPK induced by oxidative stress is linked to activation of both caspase-8 and -9-mediated apoptotic pathways in dopaminergic neurons. *J. Biol. Chem.* 279, 20451–20460.
- Christie, L.A., Su, J.H., Tu, C.H., Dick, M.C., Zhou, J., Cotman, C.W., 2007. Differential regulation of inhibitors of apoptosis proteins in Alzheimer's disease brains. *Neurobiol. Dis.* 26, 165–173.
- Coffey, E.T., Smicene, G., Hongisto, V., Cao, J., Brecht, S., Herdegen, T., Courtney, M.J., 2002. c-Jun N-terminal protein kinase (JNK) 2/3 is specifically activated by stress, mediating c-Jun activation, in the presence of constitutive JNK1 activity in cerebellar neurons. *J. Neurosci.* 22, 4335–4345.
- Coyoy, A., Valencia, A., Guemez-Gamboa, A., Moran, J., 2008. Role of NADPH oxidase in the apoptotic death of cultured cerebellar granule neurons. *Free Radic. Biol. Med.* 45, 1056–1064.
- Cozzolino, M., Ferri, A., Ferraro, E., Rotilio, G., Cecconi, F., Carri, M.T., 2006. Apaf1 mediates apoptosis and mitochondrial damage induced by mutant human

- SOD1s typical of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Dis.* 21, 69–79.
- D'Mello, S.R., Borodezt, K., Soltoff, S.P., 1997. Insulin-like growth factor and potassium depolarization maintain neuronal survival by distinct pathways: possible involvement of PI 3-kinase in IGF-1 signaling. *J. Neurosci.* 17, 1548–1560.
- D'Mello, S.R., Galli, C., Ciotti, T., Calissano, P., 1993. Induction of apoptosis in cerebellar granule neurons by low potassium: inhibition of death by insulin-like growth factor I and cAMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 10989–10993.
- Davis, R.J., 2000. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103, 239–252.
- Ferri, P., Cecchini, T., Ciaroni, S., Ambrogini, P., Cuppini, R., Santi, S., Benedetti, S., Pagliarini, S., Del Grande, P., Papa, S., 2003. Vitamin E affects cell death in adult rat dentate gyrus. *J. Neurocytol.* 32, 1155–1164.
- Fujino, G., Noguchi, T., Takeda, K., Ichijo, H., 2006. Thioredoxin and protein kinases in redox signaling. *Semin. Cancer Biol.* 16, 427–435.
- Gallo, V., Kingsbury, A., Balazs, R., Jorgensen, O.S., 1987. The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J. Neurosci.* 7, 2203–2213.
- Gil, J., Almeida, S., Oliveira, C.R., Rego, A.C., 2003. Cytosolic and mitochondrial ROS in staurosporine-induced retinal cell apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.* 35, 1500–1514.
- Goldman, E.H., Chen, L., Fu, H., 2004. Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 by reactive oxygen species through dephosphorylation at serine 967 and 14-3-3 dissociation. *J. Biol. Chem.* 279, 10442–10449.
- Gotoh, Y., Cooper, J.A., 1998. Reactive oxygen species- and dimerization-induced activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 in tumor necrosis factor- α signal transduction. *J. Biol. Chem.* 273, 17477–17482.
- Greenlund, L.J., Deckwerth, T.L., Johnson Jr., E.M., 1995. Superoxide dismutase delays neuronal apoptosis: a role for reactive oxygen species in programmed neuronal death. *Neuron* 14, 303–315.
- Harada, J., Sugimoto, M., 1999. An inhibitor of p38 and JNK MAP kinases prevents activation of caspase and apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *Jpn. J. Pharmacol.* 79, 369–378.
- Harris, C., Maroney, A.C., Johnson Jr., E.M., 2002. Identification of JNK-dependent and -independent components of cerebellar granule neuron apoptosis. *J. Neurochem.* 83, 992–1001.
- Hoeflich, K.P., Yeh, W.C., Yao, Z., Mak, T.W., Woodgett, J.R., 1999. Mediation of TNF receptor-associated factor effector functions by apoptosis signal-regulating kinase-1 (ASK1). *Oncogene* 18, 5814–5820.
- Jiang, Y., Chen, C., Li, Z., Guo, W., Gegner, J.A., Lin, S., Han, J., 1996. Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38 β). *J. Biol. Chem.* 271, 17920–17926.
- Jiang, Y., Gram, H., Zhao, M., New, L., Gu, J., Feng, L., Di Padova, F., Ulevitch, R.J., Han, J., 1997. Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38 δ . *J. Biol. Chem.* 272, 30122–30128.
- Kaufmann, S.H., Hengartner, M.O., 2001. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol.* 11, 526–534.
- Krohn, A.J., Preis, E., Prehn, J.H., 1998. Staurosporine-induced apoptosis of cultured rat hippocampal neurons involves caspase-1-like proteases as upstream initiators and increased production of superoxide as a main downstream effector. *J. Neurosci.* 18, 8186–8197.
- Kruman, I., Guo, Q., Mattson, M.P., 1998. Calcium and reactive oxygen species mediate staurosporine-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis in PC12 cells. *J. Neurosci. Res.* 51, 293–308.
- Kyriakis, J.M., Avruch, J., 2001. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol. Rev.* 81, 807–869.
- Lang, W., Wang, H., Ding, L., Xiao, L., 2004. Cooperation between PKC- α and PKC- ϵ in the regulation of JNK activation in human lung cancer cells. *Cell. Signal.* 16, 457–467.
- Lopez-Bergami, P., Habelhah, H., Bhoumik, A., Zhang, W., Wang, L.H., Ronai, Z., 2005. RACK1 mediates activation of JNK by protein kinase C [corrected]. *Mol. Cell.* 19, 309–320.
- Lopez-Bergami, P., Ronai, Z., 2008. Requirements for PKC-augmented JNK activation by MKK4/7. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 40, 1055–1064.
- Luo, H.R., Hattori, H., Hossain, M.A., Hester, L., Huang, Y., Lee-Kwon, W., Donowitz, M., Nagata, E., Snyder, S.H., 2003. Akt as a mediator of cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 11712–11717.
- Macdonald, N.J., Delderfield, S.M., Zhang, W., Tagliatalata, G., 2003. Tumour necrosis factor- α - vs. growth factor deprivation-promoted cell death: distinct converging pathways. *Aging Cell* 2, 245–256.
- Martin, L.J., 1999. Neuronal death in amyotrophic lateral sclerosis is apoptosis: possible contribution of a programmed cell death mechanism. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58, 459–471.
- Martin-Romero, F.J., Garcia-Martin, E., Gutierrez-Merino, C., 2002. Inhibition of oxidative stress produced by plasma membrane NADH oxidase delays low-potassium-induced apoptosis of cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* 82, 705–715.
- Miller, T.M., Johnson Jr., E.M., 1996. Metabolic and genetic analyses of apoptosis in potassium/serum-deprived rat cerebellar granule cells. *J. Neurosci.* 16, 7487–7495.
- Moran, J., Itoh, T., Reddy, U.R., Chen, M., Alnemri, E.S., Pleasure, D., 1999. Caspase-3 expression by cerebellar granule neurons is regulated by calcium and cyclic AMP. *J. Neurochem.* 73, 568–577.
- Moran, J., Patel, 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.
- Nakaso, K., Ito, S., Nakashima, K., 2008. Caffeine activates the PI3K/Akt pathway and prevents apoptotic cell death in a Parkinson's disease model of SH-SY5Y cells. *Neurosci. Lett.* 432, 146–150.
- Nardi, N., Avidan, G., Daily, D., Zilkha-Falb, R., Barzilai, A., 1997. Biochemical and temporal analysis of events associated with apoptosis induced by lowering the extracellular potassium concentration in mouse cerebellar granule neurons. *J. Neurochem.* 68, 750–759.
- Oh, Y.K., Shin, K.S., Kang, S.J., 2006. AIF translocates to the nucleus in the spinal motor neurons in a mouse model of ALS. *Neurosci. Lett.* 406, 205–210.
- Oppenheim, R.W., 1991. Cell death during development of the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 14, 453–501.
- Ortner, E., Moelling, K., 2007. Heteromeric complex formation of ASK2 and ASK1 regulates stress-induced signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362, 454–459.
- Pimienta, G., Pascual, J., 2007. Canonical and alternative MAPK signaling. *Cell Cycle* 6, 2628–2632.
- Prehn, J.H., Jordan, J., Ghadge, G.D., Preis, E., Galindo, M.F., Roos, R.P., Kriegstein, J., Miller, R.J., 1997. Ca²⁺ and reactive oxygen species in staurosporine-induced neuronal apoptosis. *J. Neurochem.* 68, 1679–1685.
- Pulverer, B.J., Kyriakis, J.M., Avruch, J., Nikolakaki, E., Woodgett, J.R., 1991. Phosphorylation of c-Jun mediated by MAP kinases. *Nature* 353, 670–674.
- Raman, M., Chen, W., Cobb, M.H., 2007. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 26, 3100–3112.
- Saitoh, M., Nishitoh, H., Fujii, M., Takeda, K., Tobiume, K., Sawada, Y., Kawabata, M., Miyazono, K., Ichijo, H., 1998. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J.* 17, 2596–2606.
- Sajan, F.D., Martiniuk, F., Marcus, D.L., Frey 2nd, W.H., Hite, R., Bordoay, E.Z., Freedman, M.L., 2007. Apoptotic gene expression in Alzheimer's disease hippocampal tissue. *Am. J. Alzheimers Dis. Other Dement.* 22, 319–328.
- Samhan-Arias, A.K., Martin-Romero, F.J., Gutierrez-Merino, C., 2004. Kaempferol blocks oxidative stress in cerebellar granule cells and reveals a key role for reactive oxygen species production at the plasma membrane in the commitment to apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 48–61.
- Schroeter, H., Spencer, J.P., Rice-Evans, C., Williams, R.J., 2001. Flavonoids protect neurons from oxidized low-density-lipoprotein-induced apoptosis involving c-Jun N-terminal kinase (JNK), c-Jun and caspase-3. *Biochem. J.* 358, 547–557.
- Schulz, J.B., Weller, M., Klockgether, T., 1996. Potassium deprivation-induced apoptosis of cerebellar granule neurons: a sequential requirement for new mRNA and protein synthesis, ICE-like protease activity, and reactive oxygen species. *J. Neurosci.* 16, 4696–4706.
- Tatton, W.G., Chalmers-Redman, R., Brown, D., Tatton, N., 2003. Apoptosis in Parkinson's disease: signals for neuronal degradation. *Ann. Neurol.* 53 (Suppl. 3), S61–70 (discussion: S70–62).
- Thornberry, N.A., Rano, T.A., Peterson, E.P., Rasper, D.M., Timkey, T., Garcia-Calvo, M., Houtzager, V.M., Nordstrom, P.A., Roy, S., Vaillancourt, J.P., Chapman, K.T., Nicholson, D.W., 1997. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272, 17907–17911.
- Tibbles, L.A., Woodgett, J.R., 1999. The stress-activated protein kinase pathways. *Cell. Mol. Life Sci.* 55, 1230–1254.
- Tobiume, K., Matsuzawa, A., Takahashi, T., Nishitoh, H., Morita, K., Takeda, K., Minowa, O., Miyazono, K., Noda, T., Ichijo, H., 2001. ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep.* 2, 222–228.
- Tobiume, K., Saitoh, M., Ichijo, H., 2002. Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 by the stress-induced activating phosphorylation of pre-formed oligomer. *J. Cell. Physiol.* 191, 95–104.
- Tran, T.H., Andreka, P., Rodrigues, C.O., Webster, K.A., Bishopric, N.H., 2007. Jun kinase delays caspase-9 activation by interaction with the apoptosome. *J. Biol. Chem.* 282, 20340–20350.
- Valencia, A., Moran, J., 2001. Role of oxidative stress in the apoptotic cell death of cultured cerebellar granule neurons. *J. Neurosci. Res.* 64, 284–297.
- Valencia, A., Moran, J., 2004. Reactive oxygen species induce different cell death mechanisms in cultured neurons. *Free Radic. Biol. Med.* 36, 1112–1125.
- Wada, T., Penninger, J.M., 2004. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene* 23, 2838–2849.
- Wang, W., Hou, X.Y., Gao, C., Liu, Y., Zong, Y.Y., Zhang, G.Y., 2003. Regulation of c-Jun N-terminal kinase activation in hydrogen peroxide induced neurotoxicity. *J. Neurocytol.* 32, 143–151.
- Watson, A., Eilers, A., Lallemand, D., Kyriakis, J., Rubin, L.L., Ham, J., 1998. Phosphorylation of c-Jun is necessary for apoptosis induced by survival signal withdrawal in cerebellar granule neurons. *J. Neurosci.* 18, 751–762.
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M.B., Johnson, G.L., 1999. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol. Rev.* 79, 143–180.
- Wu, C.K., Thal, L., Pizzo, D., Hansen, L., Masliah, E., Geula, C., 2005. Apoptotic signals within the basal forebrain cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Exp. Neurol.* 195, 484–496.
- Xifro, X., Falluel-Morel, A., Minano, A., Aubert, N., Fado, R., Malagelada, C., Vaudry, D., Vaudry, H., Gonzalez, B., Rodriguez-Alvarez, J., 2006. N-methyl-D-aspartate blocks activation of JNK and mitochondrial apoptotic pathway induced by potassium deprivation in cerebellar granule cells. *J. Biol. Chem.* 281, 6801–6812.

- Yamagishi, S., Matsumoto, T., Yokomaku, D., Hatanaka, H., Shimoke, K., Yamada, M., Ikeuchi, T., 2003. Comparison of inhibitory effects of brain-derived neurotrophic factor and insulin-like growth factor on low potassium-induced apoptosis and activation of p38 MAPK and c-Jun in cultured cerebellar granule neurons. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 119, 184–191.
- Zhang, L., Chen, J., Fu, H., 1999. Suppression of apoptosis signal-regulating kinase 1-induced cell death by 14-3-3 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 8511–8515.
- Zhou, M., Dominguez, R., Baudry, M., 2007. Superoxide dismutase/catalase mimetics but not MAP kinase inhibitors are neuroprotective against oxygen/glucose deprivation-induced neuronal death in hippocampus. *J. Neurochem.* 103, 2212–2223.
- Zhou, Q., Lam, P.Y., Han, D., Cadenas, E., 2008. c-Jun N-terminal kinase regulates mitochondrial bioenergetics by modulating pyruvate dehydrogenase activity in primary cortical neurons. *J. Neurochem.* 104, 325–335.

Apartado II: La segunda parte del trabajo de tesis está enfocada a conocer la participación de p38 en la muerte apoptótica y su posible relación con el estrés oxidativo inducido por K5 y estaurosporina en CGC.

6.2.1. Efecto de K5 y estaurosporina en la activación de p38 y ATF2

Para determinar el papel de p38 en la muerte de las neuronas granulares inducida por K5 y Sts, lo primero que hicimos fue determinar si ocurría la activación de p38, mediante un curso temporal de la forma fosforilada de p38 que abarcó desde los 15 min hasta las 6 h. Las células fueron mantenidas en medio K25 durante 7 DIV, posteriormente fueron transferidas a medio K5 y fueron lisadas a diferentes tiempos, como se indica en la Figura 15.

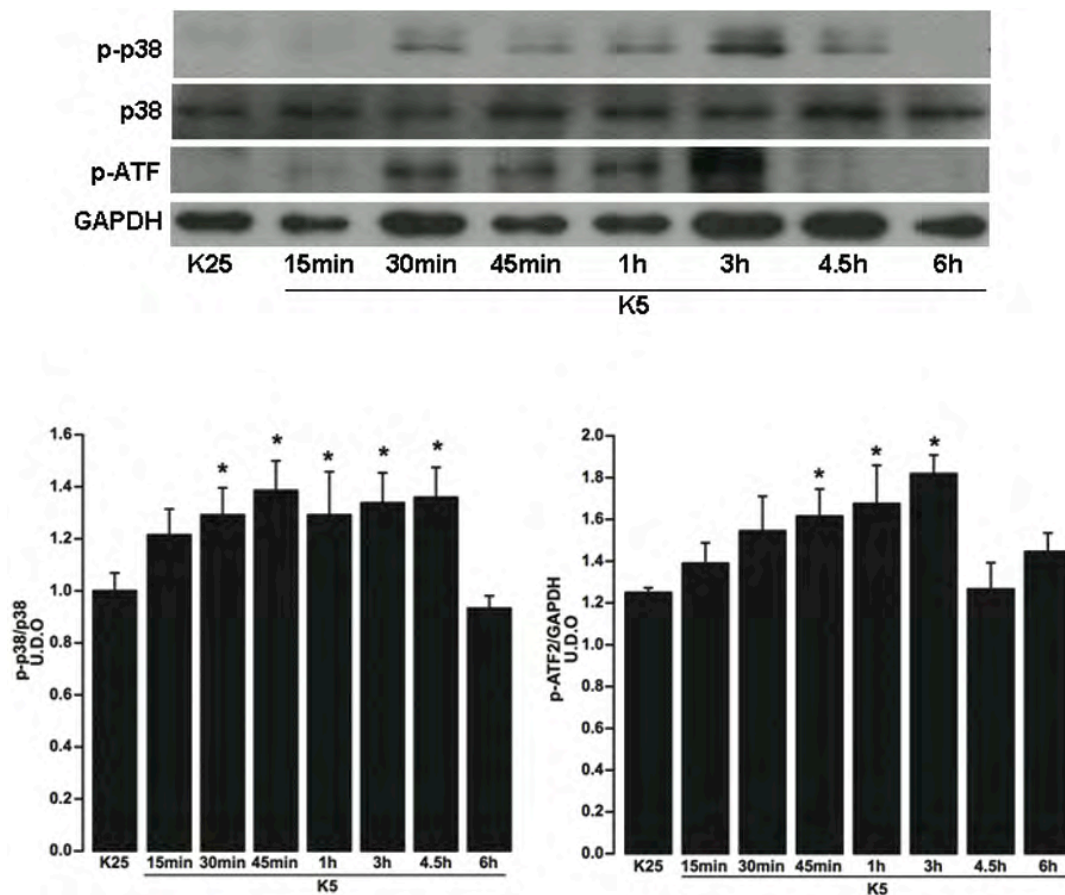


Fig. 15. Curso temporal de activación de p38 y ATF2 inducido por K5. CGC mantenidas en K25 por 7 DIV, transferidas a K5 y lisadas a los 15min, 30min, 45min, 1 h, 3 h, 4.5 h y 6 h. Los niveles de proteínas fueron determinados por western blot. Barras representan la relación entre forma fosforilada y total para p38, y la forma fosforilada y el GAPDH para ATF2, son expresadas como unidades de densidad óptica arbitrarias (U.D.O.). Las barras son las medias ± E.S. de cuatro experimentos independientes. * $p < 0.05$ versus K25.

Nuestros resultados indicaron que la activación de p38 fue inducida por K5 desde los 30 min y se mantuvo alta hasta las 4.5h, decayendo a los niveles basales a las 6h de tratamiento, no observamos cambios en los niveles totales de la proteína (Fig. 15). Para tratar de dilucidar si la vía de p38 estaba siendo activada por K5, medimos los niveles de fosforilación de ATF2, uno de los sustratos preferencialmente activados por p38, observamos que la activación de ATF2 incrementó desde los 45 min y permaneció activa hasta las 3 h del tratamiento con K5 (Fig. 15).

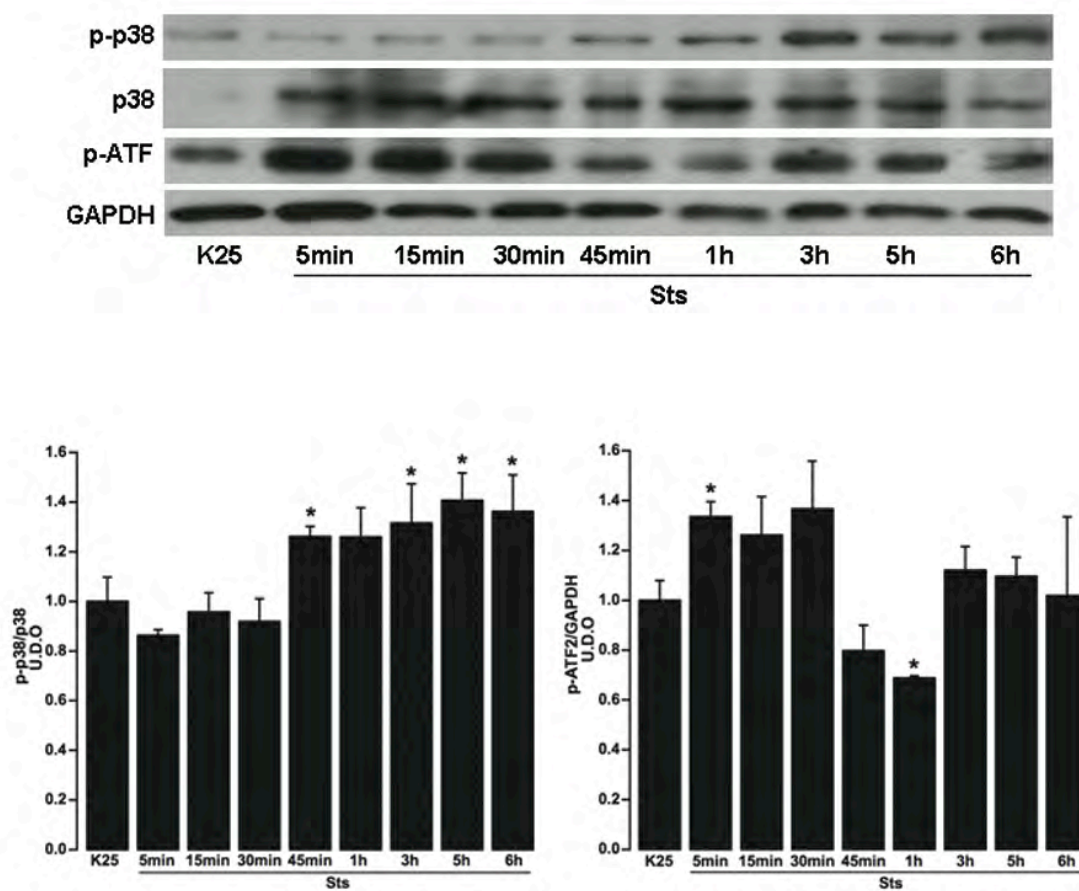


Fig. 16. Curso temporal de activación de p38 y ATF2 inducido por estaurosporina. CGC mantenidas en K25 por 7 DIV, tratadas con Sts 0.5 μ M y lisadas a los 5 min, 15min, 30min, 45min, 1 h, 3 h, 5 h y 6 h. Los niveles de proteínas fueron determinados por western blot. Barras representan la relación entre forma fosforilada y total para p38, y la forma fosforilada y el GAPDH para ATF2, son expresadas como unidades de densidad óptica arbitrarias (U.D.O.). Las barras son las medias \pm E.S. de cinco experimentos independientes. * $p < 0.05$ versus K25.

Para las células tratadas con Sts, se siguió el mismo procedimiento que para K5, se realizó un curso temporal para determinar si había activación de p38 y registrar el tiempo del mismo. Las células fueron tratadas con Sts desde 5 min hasta las 6 h. Observamos que la activación de p38 es inducida por Sts desde los 45 min y se mantiene hasta las 6 h de tratamiento (Fig. 16). Por otra parte, los niveles de fosforilación de ATF2 incrementaron transitoriamente, y sorprendentemente disminuyen por debajo de los niveles basales a 1 h de tratamiento (Fig. 16).

6.2.2. Papel de p38 en la muerte apoptótica inducida por K5 y estaurosporina

De acuerdo a los resultados previos, quisimos determinar si la activación de p38 participaba en la muerte celular inducida por K5 y Sts, hicimos uso de un inhibidor de la activación de p38, SB203580 (SB) 10 μ M, el cual fue administrado simultáneamente con ambos estímulos para medir la viabilidad celular a las 24 h de cada tratamiento. La viabilidad celular fue determinada por el ensayo con FDA y yoduro de propidio (ver sección 5.3).

Cuando las células fueron tratadas con K5 sólo un 54.17 ± 1.25 % de células viables, en comparación con el control donde se registró un 91.74 ± 1 % de células viables. Por el contrario, cuando a las células tratadas con K5 se les administró el inhibidor de la activación de p38 (SB), la muerte celular inducida por K5 fue prevenida registrando un 75.64 ± 1.67 % de células viables (Fig. 17). La muerte celular inducida por Sts (46.43 ± 2.40 % de células viables) también fue prevenida por SB con un 69.91 ± 3.08 % de células viables (Fig. 17).

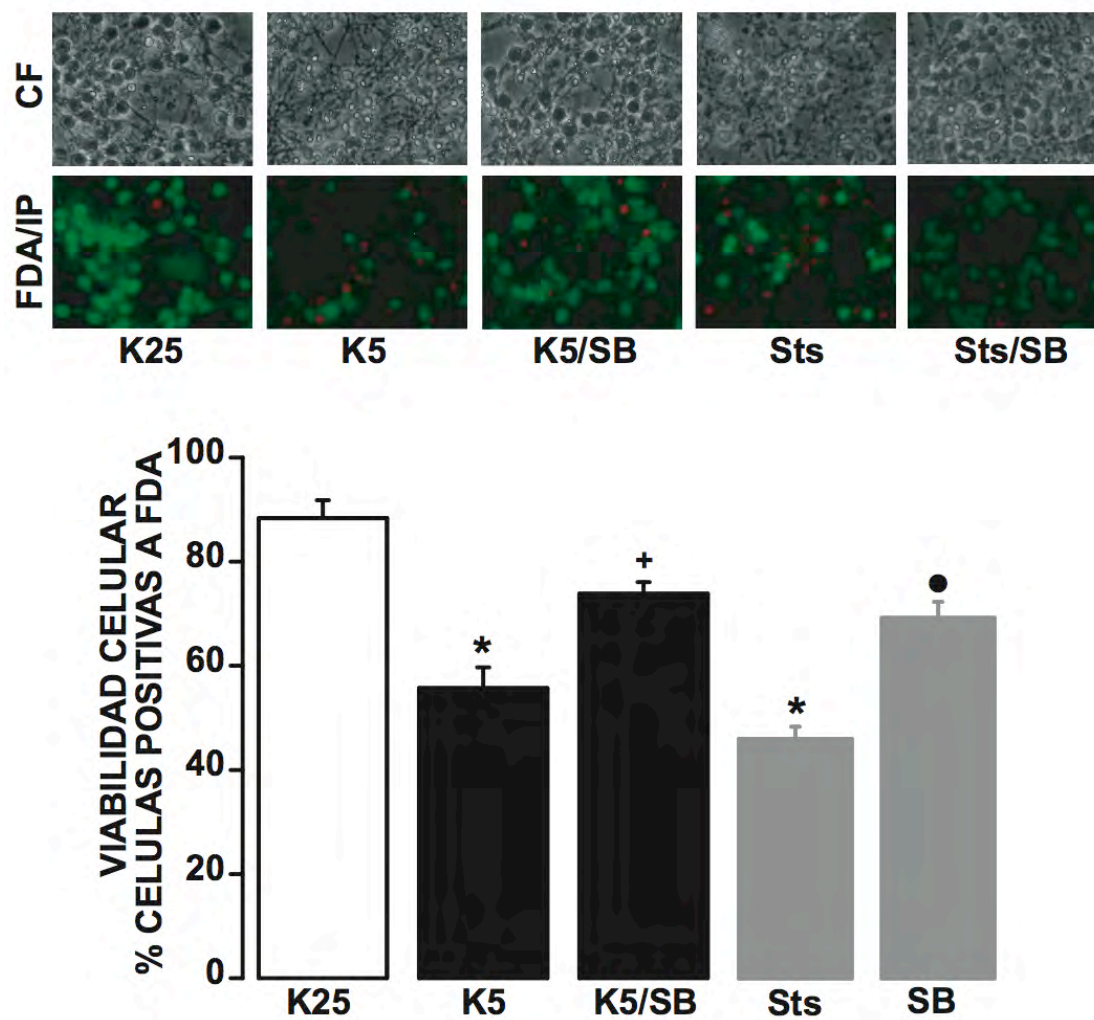


Fig. 17. Efecto de SB203580 en la muerte celular inducida por K5 y estaurosporina. CGC mantenidas en K25 por 7 DIV fueron tratadas con K5 y Sts 0.5 μ M en presencia o ausencia de SB203580 10 μ M por 24 h, la viabilidad celular fue determinada por FDA/IP. Fotomicrografías de CGC en contraste de fases (CF), teñidas con FDA y yoduro de propidio (IP). Cuantificación de la viabilidad celular. Los resultados son expresados como porcentaje de células positivas a FDA del total de células. Barras son las medias \pm S.E. de diez experimentos independientes donde * $p < 0.05$ versus K25, + $p < 0.05$ versus K5, ● $p < 0.05$ versus Sts.

De acuerdo a los resultados previos, donde la inhibición de la activación de p38 previene de la muerte inducida por K5 y Sts, el siguiente paso fue determinar si p38 participa en la muerte apoptótica inducida por ambos

estímulos, para lo cual medimos dos parámetros apoptóticos inducidos por K5 y Sts en presencia de SB. El primer parámetro que medimos fue la actividad de caspasa 3, las células fueron tratadas con K5 y Sts en ausencia y presencia de SB desde 6 h hasta 48 h. Nuestros resultados muestran que la actividad de caspasa 3 incrementó desde las 6 h y alcanzó un nivel máximo entre las 12 h y 24 h del tratamiento con K5 (Fig. 18 A). Sin embargo, cuando las células fueron tratadas simultáneamente con K5 y SB, observamos que el inhibidor previno de la actividad de caspasa 3 inducida por K5, este efecto protector se registró desde las 6 h y permaneció hasta las 24 h del tratamiento (Fig. 18 A).

De la misma forma evaluamos el efecto de la inhibición de la activación de p38 sobre la actividad de caspasa 3 inducida por estaurosporina. Observamos que el incremento en la actividad de caspasa 3 inducido por Sts se presentó desde las 8 h, alcanzando un nivel máximo entre las 12 h y 24 h y permaneció alto hasta las 48 h de tratamiento (Fig. 18B). De acuerdo con los resultados previos de viabilidad celular, donde observamos un efecto protector de SB sobre la muerte inducida por Sts (Fig. 17), la actividad de caspasa 3 inducida por este estímulo fue inhibida por acción SB, el cual inhibió marcadamente la actividad de caspasa 3 desde las 8 h hasta las 24 h de tratamiento (Fig. 18 B).

El segundo parámetro apoptótico que medimos fue la condensación nuclear inducida por K5 y Sts, ambos estímulos incrementaron la condensación nuclear registrando un $30.56 \pm 2.54 \%$ y un $40.17 \pm 3 \%$ de células con núcleos condensados respectivamente, en comparación con la condición control (K25) donde sólo el $5.80 \pm 1.57 \%$ de células presentaron núcleos condensados (Fig. 18 D). Este incremento en la condensación nuclear inducido por K5 y Sts fue inhibido cuando las células fueron tratadas con SB (Fig. 18 C), sólo el $10.11 \pm 2.29 \%$ de células presentaron núcleos condensados cuando fueron tratadas con K5 y SB, y para células tratadas con Sts y SB sólo el $24.51 \pm 4.52 \%$ de células presentaron núcleos condensados (Fig. 18D).

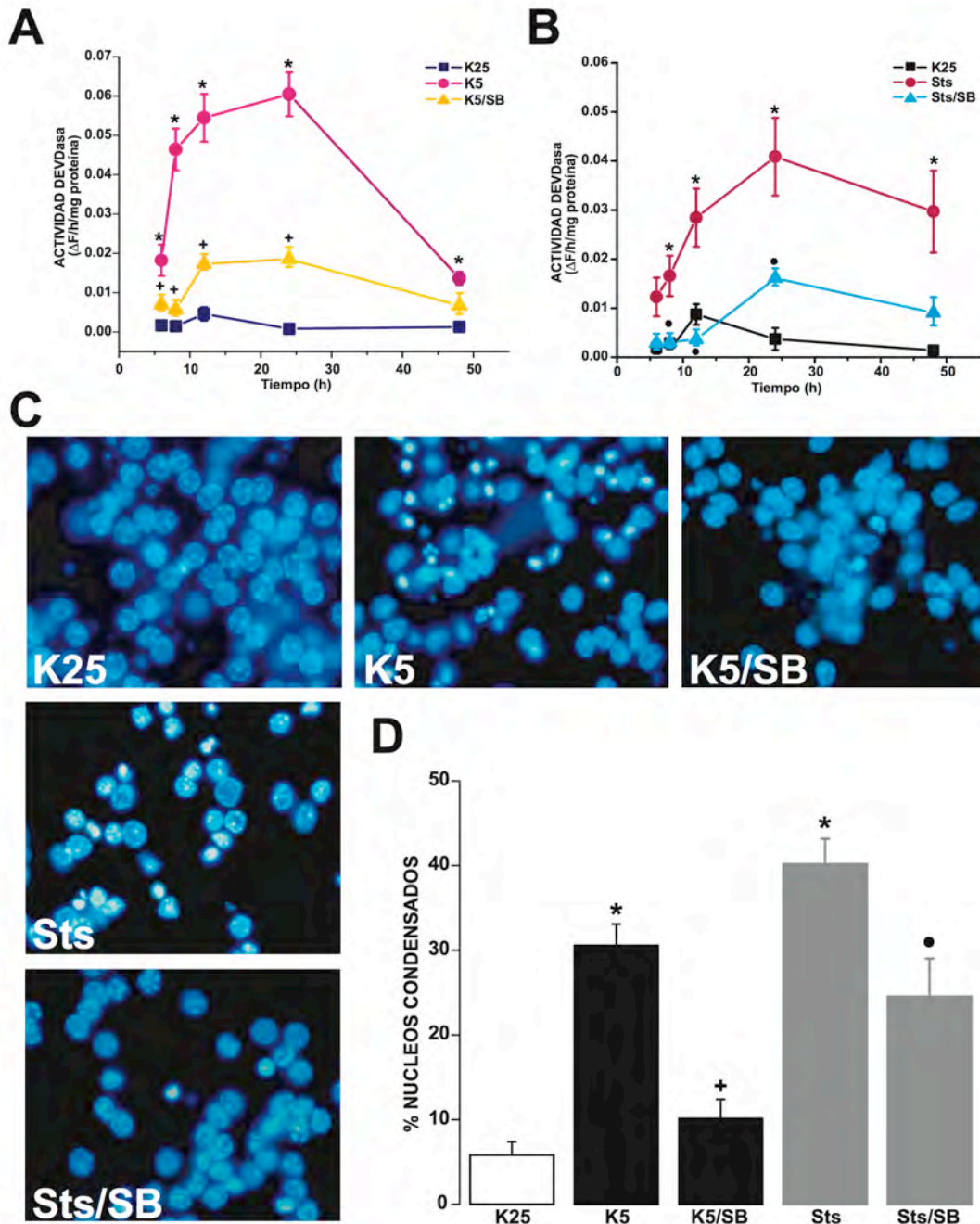


Fig. 18. Efecto de SB203580 en la actividad de caspasa 3 y la condensación nuclear inducida por K5 y estaurosporina. **A, B:** Las CGC mantenidas en K25 por 7 DIV fueron transferidas a un medio K5 o tratadas con Sts 0.5 μ M en presencia o ausencia de SB203580(SB) 10 μ M de 6 h a 48 h. La actividad de caspasa 3 fue determinada por un método flourométrico. Los resultados son expresados como cambio de fluorescencia/h/mg de proteína y son las medias \pm S.E. de diez experimentos independientes. **C:** Fotomicrografías de CGC mantenidas en K25 por 7 DIV fueron transferidas a un medio K5 o tratadas con Sts 0.5 μ M en presencia o ausencia de SB203580 (SB) 10 μ M por 24 h. La condensación nuclear fue determinada por tinción con Hoechts. **D:** Los resultados son expresados como porcentaje de núcleos condensados y son las medias \pm S.E. de cinco experimentos independientes, * $p < 0.05$ versus K25, + $p < 0.05$ versus K5, ● $p < 0.05$ versus Sts.

6.2.3. Efecto de la inhibición de p38 en la generación de ERO inducida por K5 y estaurosporina

Como se mencionó anteriormente, tanto K5 como Sts promueven la generación de ERO generando un estado de estrés oxidativo. Para dilucidar si la activación de p38 se encuentra río arriba o río debajo de las ERO inducidas por ambos estímulos, utilizamos el inhibidor SB para determinar este punto. Las células fueron tratadas con K5 y Sts en ausencia y presencia de SB por 4.5 h y 5 h respectivamente. Bajo estas condiciones, nosotros observamos que efectivamente, cuando las células fueron tratadas con K5 y Sts un incremento abrupto de los niveles de ERO fue registrado ($46.41 \pm 4.13 \%$ y $13.11 \pm 1.90 \%$ de células positivas a DHEt respectivamente), con respecto al K25 donde sólo un $0.63 \pm 0.26 \%$ de células fueron positivas a DHEt (Fig. 19 A, B).

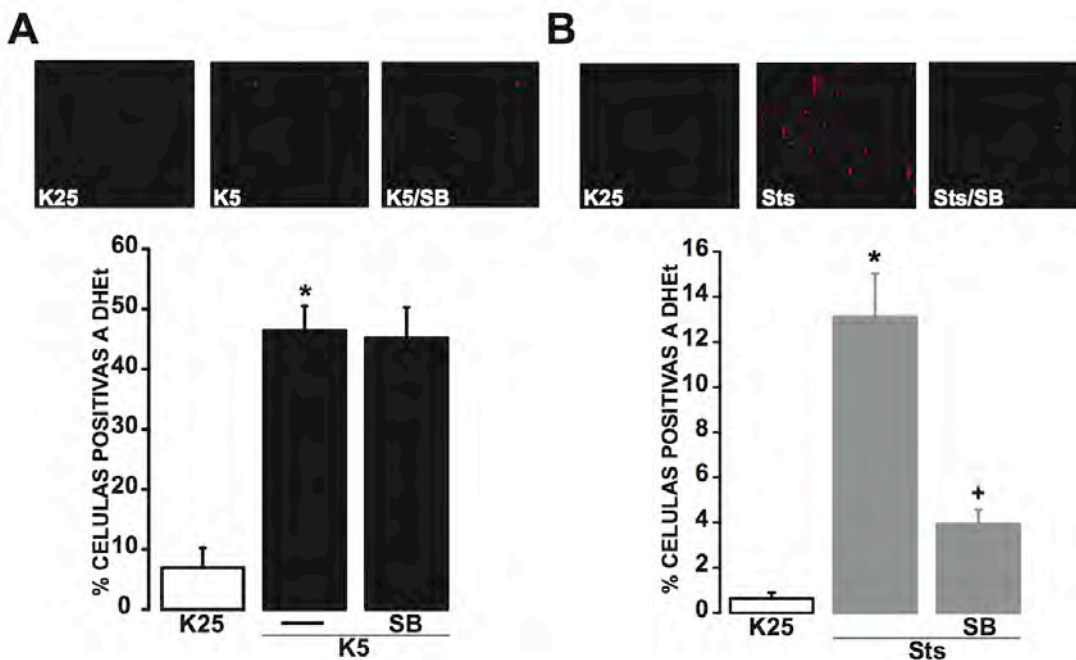


Fig.19. Efecto de SB203580 en la generación de ERO inducida por K5 y estaurosporina. Las CGC mantenidas en K25 por 7 DIV fueron transferidas a un medio K5 o tratadas con Sts $0.5 \mu\text{M}$ por 4.5 h y 5 h respectivamente en ausencia y presencia $10 \mu\text{M}$ SB203580 (SB). Las células fueron observadas y fotografiadas en un microscopio de fluorescencia. Los resultados son expresados como porcentaje de células positivas a DHEt del total de células, son las medias \pm S.E. de diez experimentos independientes, * $p < 0.05$ versus K25, + $p < 0.05$ versus K5.

Cuando las células fueron tratadas con K5 y SB por 4.5 h, observamos que la generación de ERO no disminuyó con respecto al K5 ($46.41 \pm 4.13 \%$), registrando un $45.14 \pm 5.14 \%$ de células positivas a DHEt (Fig. 19 A). Pero de manera sorprendente, cuando las células fueron tratadas con Sts y SB la generación de ERO inducida por Sts ($13.11 \pm 1.90 \%$) fue inhibida por acción de la inhibición la activación de p38, registrando sólo $3.93 \pm 1.90 \%$ de células positivas a DHEt (Fig. 19 B).

Para determinar si p38 estaba participando en la actividad de la enzima NADPH-oxidasa inducida por Sts en CGC. Las células fueron tratadas por 5 h con Sts en ausencia y presencia de SB. Observamos que Sts induce la actividad de enzima NADPH-oxidasa y esta actividad fue prevenida por SB (Fig. 20).

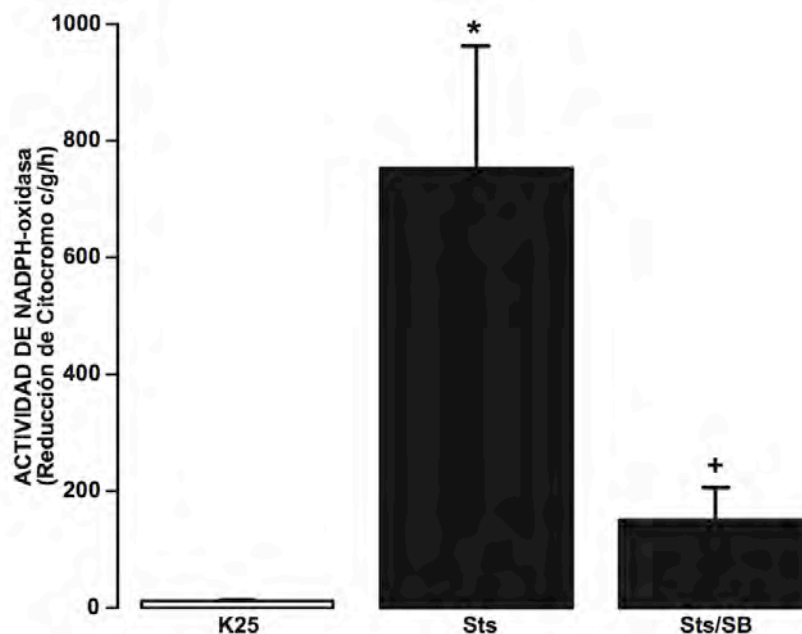


Fig.20. Efecto de SB203580 en la actividad de NADPH-oxidasa inducida por estaurosporina. Las CGC mantenidas en K25 por 7 DIV fueron tratadas con Sts $0.5 \mu\text{M}$ por 5 h en ausencia y presencia $10 \mu\text{M}$ SB203580 (SB). La actividad de la NADP-oxidasa fue medida espectrofotométricamente como oxidación del citocromo c en homogenados celulares. Los resultados son expresados como reducción de citocromo c por gramo de proteína por hora, son las medias \pm S.E. de tres experimentos independientes, * $p < 0.05$ versus K25, + $p < 0.05$ versus K5.

7. DISCUSION

El proceso de muerte apoptótica inducido por privación de potasio o tratamiento con Sts en CGC requiere de la síntesis y participación de gran cantidad de proteínas (5, 9, 88, 89, 97, 98). En este sentido, en el presente trabajo observamos que K5 indujo un incremento en los niveles proteicos de JNK1, JNK2 y c-Jun, además también incrementó la activación de estas proteínas.

Corroboramos que c-Jun fue activada por K5 en CGC, como había sido reportado previamente (97, 99-103). Sin embargo, existe controversia acerca del hecho de que la activación de c-Jun inducida por K5 sea mediada o no por JNK. Algunos reportes sugieren que JNK no es activado por K5 y no es responsable de la activación de c-Jun en esta condición en CGC (97, 99, 101), mientras otros estudios han mostrado que JNK es responsable de la activación de c-Jun durante la apoptosis inducida por K5 en CGC (100, 102). Nuestro trabajo apoya la idea de que la muerte apoptótica de CGC inducida por K5 es mediada por la activación de JNK involucrando la participación de c-Jun. De acuerdo a lo anterior, nosotros observamos un marcado incremento en la fosforilación de JNK1 y JNK2 cuya activación temporal correspondió claramente con el incremento observado en los niveles de fosforilación de c-Jun. Una manera de comprobar que la activación de c-Jun estaba siendo mediada por JNK fue utilizando el inhibidor de la activación de JNK, SP600125 (SP), evaluando la fosforilación de c-Jun inducida por K5. Respecto a lo anterior, observamos que SP efectivamente redujo los niveles de fosforilación de JNK1 y JNK2 inducidos por K5, además de manera muy determinante, SP también redujo a niveles basales la fosforilación de c-Jun inducida por K5. Estos resultados apoyan la idea que c-Jun es activada por JNK en CGC tratadas con K5.

Además, nosotros encontramos que SP previene la muerte celular inducida por K5 e inhibe casi totalmente los parámetros apoptóticos evaluados como la actividad de caspasa 3 y condensación nuclear. Por lo tanto, todos estos resultados sugieren un papel importante de la vía de JNK en la muerte apoptótica inducida por K5 en CGC.

En contraste a K5, el mecanismo de acción de la apoptosis inducida por estaurosporina (Sts) en CGC no ha sido bien definido, pues no se sabe que vías de señalización están activando la maquinaria apoptótica en este modelo. Nuestros resultados mostraron que la vía de JNK no es activada por Sts, lo anterior está basado en el hecho de que bajo este estímulo ninguno de los elementos que componen la vía de JNK, incluyendo JNK1, JNK2 y c-Jun modificaron su estado de fosforilación, excepto ASK1, el cual presentó un incremento en los niveles de fosforilación en el residuo de Ser-967, ASK1 es reconocida por el anticuerpo cuando es fosforilada solamente en este residuo. En consecuencia a lo anterior, la inhibición de la activación de JNK por SP no tuvo efecto protector en la muerte celular, la actividad de caspasa y la condensación nuclear inducida por Sts.

El carente efecto observado de Sts sobre la activación de la vía de JNK, puede deberse a que se ha reportado que la Sts pueda estar actuando como un inhibidor de la activación de ASK1, bloqueando la unión del ATP al sitio catalítico de la cinasa, puesto que la Sts puede unirse directamente a ASK1 en este sitio (104). Otra posible explicación de la no activación de JNK por Sts, que como mencionamos anteriormente es un inhibidor no selectivo de PKCs, ha sido reportado que PKC puede estar regulando la activación de JNK en respuesta a un estímulo de muerte (105), además la inhibición de PKC por Sts puede contribuir al decremento en la actividad pro-apoptótica de JNK (106, 107). A pesar de que la muerte celular inducida por K5 y Sts comparten algunos mecanismos comunes como la activación de caspasas (108, 109), la apoptosis inducida por Sts es independiente de la activación de la vía de JNK, esto sugiere un mecanismo alternativo de muerte apoptótica inducido por este estímulo en CGC.

Por otra parte, nosotros y otros grupos de investigación han reportado previamente la generación de ERO inducida por K5 en CGC en tiempos tempranos dentro del proceso apoptótico, alrededor de las 3.5 a 4.5 h (93), además se ha reportado que los antioxidantes previenen de la apoptosis en este modelo y en otros modelos neuronales (90, 93, 94). De acuerdo con los reportes

previos, en el presente trabajo nosotros encontramos que los antioxidantes utilizados para nuestro estudio fueron eficientes previniendo la generación de ERO y la muerte celular inducida por K5.

Una parte fundamental de este trabajo fue determinar si la vía de JNK estaba relacionada con el estrés oxidativo inducido tanto por K5 como por Sts. En relación a este punto, nosotros encontramos que la generación de ERO inducida por K5 parece estar río arriba de la activación de la vía de JNK debido a que, la inhibición de la activación de JNK no previno la generación de ERO inducida por K5. De acuerdo con estos resultados, también encontramos que JNK1, JNK2 y c-Jun permanecieron activos hasta las 4.5 h del tratamiento con K5, tiempo en el cual se alcanza el nivel máximo de ERO, sugiriendo que la vía de JNK puede ser activada por las ERO inducidas por K5.

Ha sido reportado que las MAPKs son activadas por ERO durante la apoptosis inducida por diferentes estímulos en una variedad de modelos (73, 110, 111). También ha sido descrito que la vía de JNK puede ser activada por estrés oxidativo a través de ASK1 (46, 65, 70, 112). Respecto a lo anterior, ha sido reportado que en fibroblastos embrionarios de ratones $ASK1^{-/-}$, que estas células son incapaces de mantener una activación sostenida de JNK inducida por H_2O_2 y son resistentes a la apoptosis inducida por este oxidante debido a la carencia de ASK1 (113). También ha sido reportado en células COS7 que el estrés oxidativo inducido por H_2O_2 promueve la disociación entre la proteína 14-3-3 y ASK1, lo cual induce la defosforilación en el residuo de Ser-967 de ASK1 y la subsecuente activación de ASK1 y JNK (72, 73).

Basados en los reportes previos, nosotros investigamos una posible relación del estrés oxidativo inducido por K5 en la activación de la vía de JNK a través de la fosforilación de ASK1 en el residuo de Ser-967. Como mencionamos anteriormente, reportes previos y en este trabajo diferentes antioxidantes previenen parcialmente la muerte inducida por K5 (93, 94), nosotros encontramos que los antioxidantes utilizados en este trabajo incrementaron los

niveles de fosforilación de ASK1, y previnieron el incremento en la fosforilación de JNK1, JNK2 y c-Jun inducida por K5.

Es interesante mencionar que a pesar de que la Sts no tuvo efecto en la activación de la vía de JNK, este estímulo induce la generación de ERO en CGC, lo cual ha sido previamente reportado en neuronas de la retina y células PC12 (8, 114). Todos los antioxidantes utilizados en este trabajo disminuyeron la generación de ERO y la muerte celular inducida por Sts. Sin embargo, el inhibidor de la activación de JNK, SP, no previno la generación de ERO inducida por Sts. Finalmente, los niveles basales de fosforilación de ASK1, JNK1, JNK2 y c-Jun no fueron modificados por los antioxidantes.

Como ya demostramos a lo largo de este trabajo, la muerte apoptótica de CGC inducida por K5 es dependiente de la activación de JNK, sin embargo no hay una recuperación del cien por ciento cuando se inhibe la activación de JNK, de tal modo que otra posible vía de señalización podría estar participando en este proceso. De acuerdo a reportes previos, nosotros corroboramos que el estímulo de K5 en CGC induce la activación de p38 (115, 116) desde tiempos cortos como había sido reportado previamente (115), además la activación de factores de transcripción como c-Jun y ATF2 es adjudicado a p38 en CGC (115-117), esto concuerda con el hecho de que nosotros observamos un incremento en la fosforilación de ATF2 que temporalmente correlaciona con la activación de p38, y de acuerdo con el anticuerpo usado para ATF2 el cual solo reconoce la forma dual fosforilada en los residuos de Thr-69/Thr-71 del factor de transcripción, y se sabe que p38 es el responsable de la fosforilación en estos residuos (118), resultados preliminares muestran que el uso del inhibidor de la activación de p38 (SB203580) (119, 120) disminuye la fosforilación de ATF2, sugiriendo que p38 puede ser responsable de la activación de ATF2 inducida por K5.

Por otro lado, en la primera parte del presente trabajo demostramos que estaurosporina no induce la activación de la vía de JNK y que ésta no participa en la muerte apoptótica inducida por este estímulo, lo cual sugiere que otra vía

es la responsable de activar la maquinaria apoptótica. Como mencionamos anteriormente, existe poca información acerca del mecanismo de acción de la estaurosporina en la muerte celular de CGC. Sin embargo, se ha reportado que en astrocitos la muerte celular inducida por estaurosporina induce la activación de p38 (121). De acuerdo con este reporte, en nuestras células también hay un incremento en la activación de p38 inducido por estaurosporina, pero de manera contraria a K5, ATF2 sólo incrementa transitoriamente e incluso a la hora de tratamiento disminuye la fosforilación por debajo de los niveles basales, lo cual sugiere una posible relación entre PKCs y ATF2. El tiempo de fosforilación de ATF2 no corresponde con el de activación de p38, lo que sugiere que ATF2 no es activada de manera estable por estaurosporina y la activación observada no es dependiente de p38.

La muerte celular inducida por K5 y Sts en CGC fue prevenida por la inhibición de la activación de p38, lo que es coherente con el hecho de que en ambas condiciones p38 fue activado, como se había reportado previamente en diferentes modelos de muerte (103, 121, 122). Demostramos además que p38 participa de manera importante en la muerte apoptótica inducida por K5, pues previene de la actividad de caspasa y la condensación nuclear inducida por K5. Por otra parte determinamos que p38 si participa en la apoptosis inducida por estaurosporina, pues previno la activación de caspasa 3 y la condensación nuclear inducida por Sts. Lo anterior aporta un dato muy importante pues se desconocía cual vía de señalización promovía la activación de la maquinaria apoptótica en CGC tratadas con Sts.

Finalmente, tratamos de dilucidar si p38 estaba siendo activada antes o después de la generación de ERO inducida por K5 y Sts, pues reportes previos han mostrado que p38 está activa cuando se genera un estrés oxidativo inducido por diversas ERO y promueve la apoptosis en diferentes modelos celulares (123-125), en células PC12 se ha demostrado que la activación de p38 inducida por malonato, es prevenida por antioxidantes (126). Respecto a este punto, nosotros observamos que en CGC tratadas con K5 la generación de ERO participa río arriba de la activación de p38, pues la inhibición de la activación de p38 no

disminuyó la generación de ERO inducida por K5, resultados preliminares muestran que el uso de antioxidantes disminuye la activación de p38 y ATF2 inducida por K5. Estos datos sugieren que las ERO promueven la activación de p38 y ATF2 en CGC tratadas con K5.

De manera completamente diferente a K5, nosotros observamos que la inhibición de p38 disminuye la generación de ERO inducida por Sts, esto sugiere que p38 pueda estar regulando de alguna manera la generación de ERO. De manera muy interesante se ha reportado que la Sts incrementa la actividad de la enzima MAO-A e induce la activación sostenida de p38 en una línea celular de neuroblastoma, de acuerdo a esto último, nosotros detectamos una activación sostenida de p38 inducida por Sts. Recientemente, un estudio reporta que p38 induce la activación de la enzima NADPH-oxidasa en astrocitos cuando son tratados con lipopolisacárido (127). Estos datos sugieren que p38 puede estar activando a la NADPH-oxidasa, la cual es activada por Sts en este modelo y su inhibición previene de la muerte apoptótica inducida por este estímulo (128). En este sentido, nuestros resultados mostraron que la inhibición de p38 previene la activación de NADPH-oxidasa inducida por Sts en CGC. Sin embargo, no descartamos un proceso de retroalimentación, pues resultados preliminares muestran que la activación temprana de p38 inducida por Sts parece ser prevenida por antioxidantes.

8. CONCLUSIONES

- 1) La vía de JNK es activada por K5 en CGC, este estímulo induce la activación de ASK1, JNK1, JNK2 y c-Jun. Además, la activación de c-Jun inducida por K5 es dependiente de la activación de JNK.
- 2) Estaurosporina no induce la activación de la vía de JNK, debido a que puede estar actuando como un inhibidor de la activación pro-apoptótica de ASK1, por tal motivo la fosforilación de ASK1 en el residuo de Ser-967 incrementa cuando las CGC son tratadas con estaurosporina.
- 3) La muerte celular inducida por K5 es dependiente de la activación de JNK, pues la inhibición de JNK promueve la sobrevivencia. De manera contraria, la muerte celular inducida por estaurosporina es independiente de la activación de JNK.
- 4) De acuerdo a la conclusión previa, la apoptosis inducida por K5 es dependiente de la activación de JNK, mientras que la apoptosis inducida por estaurosporina es independiente de JNK.
- 5) K5 induce la generación de ERO en tiempos cortos, empezando desde los 30 min y alcanza un nivel máximo a las 4.5 h. Estaurosporina al igual que K5, induce la generación de ERO, alcanzando un nivel máximo a las 5 h de tratamiento. La generación de ERO inducida por K5, se encuentra río arriba de la activación de JNK. Esto sugiere que la generación temprana de ERO pueda estar actuando como una señal para la activación de la vía de JNK.
- 6) Los antioxidantes previenen de la generación de ERO y de la muerte celular inducida por K5 y estaurosporina. La activación de la vía de JNK inducida por K5 es mediada por el estrés oxidativo, pues los antioxidantes previenen de la activación de los componentes de la vía de JNK.

- 7) K5 induce la activación de p38 y ATF2, por otra parte estaurosporina induce una activación sostenida de p38 y una activación transitoria de ATF2.
- 8) La muerte celular inducida por K5 y estaurosporina es dependiente de la activación de p38, además la apoptosis inducida por estos estímulos también es dependiente de la activación de p38.
- 9) La generación de ERO inducida por K5 se presenta río arriba de la activación de p38. Por el contrario, la generación de ERO inducida por estaurosporina se presenta río abajo de la activación de p38. La inhibición de la activación de p38 previene de la activación de la NADPH-oxidasa inducida por Sts, sugiriendo que p38 participa en la activación de la NADPH-oxidasa regulando de esta forma la generación de ERO inducida por Sts en CGC.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Blomgren K, Leist M, Groc L. Pathological apoptosis in the developing brain. *Apoptosis*. 2007 May;12(5):993-1010.
2. Cozzolino M, Ferri A, Ferraro E, Rotilio G, Cecconi F, Carri MT. Apaf1 mediates apoptosis and mitochondrial damage induced by mutant human SOD1s typical of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis*. 2006 Jan;21(1):69-79.
3. Gao Y, Signore AP, Yin W, Cao G, Yin XM, Sun F, et al. Neuroprotection against focal ischemic brain injury by inhibition of c-Jun N-terminal kinase and attenuation of the mitochondrial apoptosis-signaling pathway. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2005 Jun;25(6):694-712.
4. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*. 1997 Aug 15;326 (Pt 1):1-16.
5. Alavez S, Pedroza D, Moran J. Mechanisms of cell death by deprivation of depolarizing conditions during cerebellar granule neurons maturation. *Neurochem Int*. 2003 Nov;43(6):581-90.
6. Martin DP, Schmidt RE, DiStefano PS, Lowry OH, Carter JG, Johnson EM, Jr. Inhibitors of protein synthesis and RNA synthesis prevent neuronal death caused by nerve growth factor deprivation. *J Cell Biol*. 1988 Mar;106(3):829-44.
7. Oppenheim RW, Prevetie D, Tytell M, Homma S. Naturally occurring and induced neuronal death in the chick embryo in vivo requires protein and RNA synthesis: evidence for the role of cell death genes. *Dev Biol*. 1990 Mar;138(1):104-13.
8. Gil J, Almeida S, Oliveira CR, Rego AC. Cytosolic and mitochondrial ROS in staurosporine-induced retinal cell apoptosis. *Free Radic Biol Med*. 2003 Dec 1;35(11):1500-14.
9. Nardi N, Avidan G, Daily D, Zilkha-Falb R, Barzilai A. Biochemical and temporal analysis of events associated with apoptosis induced by lowering the extracellular potassium concentration in mouse cerebellar granule neurons. *J Neurochem*. 1997 Feb;68(2):750-9.
10. Leist M, Jaattela M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001 Aug;2(8):589-98.
11. Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem*. 2000;69:217-45.
12. Kumar S. Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ*. 2007 Jan;14(1):32-43.

13. Kaufmann SH, Hengartner MO. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol.* 2001 Dec;11(12):526-34.
14. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000 Oct 12;407(6805):770-6.
15. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science.* 1998 Aug 28;281(5381):1312-6.
16. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem.* 1999;68:383-424.
17. Cuevas BD, Abell AN, Johnson GL. Role of mitogen-activated protein kinase kinases in signal integration. *Oncogene.* 2007 May 14;26(22):3159-71.
18. Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature.* 2001 Mar 1;410(6824):37-40.
19. Tibbles LA, Woodgett JR. The stress-activated protein kinase pathways. *Cell Mol Life Sci.* 1999 Aug 15;55(10):1230-54.
20. Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev.* 1999 Jan;79(1):143-80.
21. Pimienta G, Pascual J. Canonical and alternative MAPK signaling. *Cell Cycle.* 2007 Nov 1;6(21):2628-32.
22. Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science.* 2002 Dec 6;298(5600):1911-2.
23. Uhlik MT, Abell AN, Cuevas BD, Nakamura K, Johnson GL. Wiring diagrams of MAPK regulation by MEKK1, 2, and 3. *Biochem Cell Biol.* 2004 Dec;82(6):658-63.
24. Johnson GL, Dohlman HG, Graves LM. MAPK kinase kinases (MKKKs) as a target class for small-molecule inhibition to modulate signaling networks and gene expression. *Curr Opin Chem Biol.* 2005 Jun;9(3):325-31.
25. Abe MK, Kuo WL, Hershenson MB, Rosner MR. Extracellular signal-regulated kinase 7 (ERK7), a novel ERK with a C-terminal domain that regulates its activity, its cellular localization, and cell growth. *Mol Cell Biol.* 1999 Feb;19(2):1301-12.

26. Abe MK, Saelzler MP, Espinosa R, 3rd, Kahle KT, Hershenson MB, Le Beau MM, et al. ERK8, a new member of the mitogen-activated protein kinase family. *J Biol Chem*. 2002 May 10;277(19):16733-43.
27. Zhou G, Bao ZQ, Dixon JE. Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem*. 1995 May 26;270(21):12665-9.
28. Rossomando AJ, Payne DM, Weber MJ, Sturgill TW. Evidence that pp42, a major tyrosine kinase target protein, is a mitogen-activated serine/threonine protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Sep;86(18):6940-3.
29. Turjanski AG, Vaque JP, Gutkind JS. MAP kinases and the control of nuclear events. *Oncogene*. 2007 May 14;26(22):3240-53.
30. Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2004 Jun;68(2):320-44.
31. Raman M, Chen W, Cobb MH. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*. 2007 May 14;26(22):3100-12.
32. Krishna M, Narang H. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. *Cell Mol Life Sci*. 2008 Nov;65(22):3525-44.
33. English JM, Cobb MH. Pharmacological inhibitors of MAPK pathways. *Trends Pharmacol Sci*. 2002 Jan;23(1):40-5.
34. Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev*. 2001 Apr;81(2):807-69.
35. Pulverer BJ, Kyriakis JM, Avruch J, Nikolakaki E, Woodgett JR. Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature*. 1991 Oct 17;353(6345):670-4.
36. Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, et al. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature*. 1994 May 12;369(6476):156-60.
37. Derijard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Su B, Deng T, et al. JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell*. 1994 Mar 25;76(6):1025-37.
38. Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*. 2000 Oct 13;103(2):239-52.
39. Wada T, Penninger JM. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene*. 2004 Apr 12;23(16):2838-49.

40. Zhou Q, Lam PY, Han D, Cadenas E. c-Jun N-terminal kinase regulates mitochondrial bioenergetics by modulating pyruvate dehydrogenase activity in primary cortical neurons. *J Neurochem.* 2008 Jan;104(2):325-35.
41. Mielke K, Herdegen T. JNK and p38 stresskinases--degenerative effectors of signal-transduction-cascades in the nervous system. *Prog Neurobiol.* 2000 May;61(1):45-60.
42. Harper SJ, LoGrasso P. Signalling for survival and death in neurones: the role of stress-activated kinases, JNK and p38. *Cell Signal.* 2001 May;13(5):299-310.
43. Bode AM, Dong Z. The functional contrariety of JNK. *Mol Carcinog.* 2007 Aug;46(8):591-8.
44. Ip YT, Davis RJ. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)-from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol.* 1998 Apr;10(2):205-19.
45. Nishina H, Wada T, Katada T. Physiological roles of SAPK/JNK signaling pathway. *J Biochem.* 2004 Aug;136(2):123-6.
46. Schroeter H, Boyd CS, Ahmed R, Spencer JP, Duncan RF, Rice-Evans C, et al. c-Jun N-terminal kinase (JNK)-mediated modulation of brain mitochondria function: new target proteins for JNK signalling in mitochondrion-dependent apoptosis. *Biochem J.* 2003 Jun 1;372(Pt 2):359-69.
47. Chang L, Jones Y, Ellisman MH, Goldstein LS, Karin M. JNK1 is required for maintenance of neuronal microtubules and controls phosphorylation of microtubule-associated proteins. *Dev Cell.* 2003 Apr;4(4):521-33.
48. Ham J, Babij C, Whitfield J, Pfarr CM, Lallemand D, Yaniv M, et al. A c-Jun dominant negative mutant protects sympathetic neurons against programmed cell death. *Neuron.* 1995 May;14(5):927-39.
49. Karin M, Liu Z, Zandi E. AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol.* 1997 Apr;9(2):240-6.
50. Ham J, Eilers A, Whitfield J, Neame SJ, Shah B. c-Jun and the transcriptional control of neuronal apoptosis. *Biochem Pharmacol.* 2000 Oct 15;60(8):1015-21.
51. Minden A, Karin M. Regulation and function of the JNK subgroup of MAP kinases. *Biochim Biophys Acta.* 1997 Oct 24;1333(2):F85-104.
52. Yang DD, Kuan CY, Whitmarsh AJ, Rincon M, Zheng TS, Davis RJ, et al. Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene. *Nature.* 1997 Oct 23;389(6653):865-70.

53. Kuan CY, Yang DD, Samanta Roy DR, Davis RJ, Rakic P, Flavell RA. The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. *Neuron*. 1999 Apr;22(4):667-76.
54. Han J, Lee JD, Tobias PS, Ulevitch RJ. Endotoxin induces rapid protein tyrosine phosphorylation in 70Z/3 cells expressing CD14. *J Biol Chem*. 1993 Nov 25;268(33):25009-14.
55. Zarubin T, Han J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res*. 2005 Jan;15(1):11-8.
56. Ono K, Han J. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal*. 2000 Jan;12(1):1-13.
57. Mittelstadt PR, Salvador JM, Fornace AJ, Jr., Ashwell JD. Activating p38 MAPK: new tricks for an old kinase. *Cell Cycle*. 2005 Sep;4(9):1189-92.
58. Jiang Y, Chen C, Li Z, Guo W, Gegner JA, Lin S, et al. Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta). *J Biol Chem*. 1996 Jul 26;271(30):17920-6.
59. Jiang Y, Gram H, Zhao M, New L, Gu J, Feng L, et al. Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38delta. *J Biol Chem*. 1997 Nov 28;272(48):30122-8.
60. Li Z, Jiang Y, Ulevitch RJ, Han J. The primary structure of p38 gamma: a new member of p38 group of MAP kinases. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996 Nov 12;228(2):334-40.
61. Takeda K, Ichijo H. Neuronal p38 MAPK signalling: an emerging regulator of cell fate and function in the nervous system. *Genes Cells*. 2002 Nov;7(11):1099-111.
62. Maruyama M, Sudo T, Kasuya Y, Shiga T, Hu B, Osada H. Immunolocalization of p38 MAP kinase in mouse brain. *Brain Res*. 2000 Dec 29;887(2):350-8.
63. Nebreda AR, Porras A. p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends Biochem Sci*. 2000 Jun;25(6):257-60.
64. Kang YJ, Seit-Nebi A, Davis RJ, Han J. Multiple activation mechanisms of p38alpha mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*. 2006 Sep 8;281(36):26225-34.
65. Saitoh M, Nishitoh H, Fujii M, Takeda K, Tobiume K, Sawada Y, et al. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J*. 1998 May 1;17(9):2596-606.

66. Ichijo H, Nishida E, Irie K, ten Dijke P, Saitoh M, Moriguchi T, et al. Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science*. 1997 Jan 3;275(5296):90-4.
67. Matsukawa J, Matsuzawa A, Takeda K, Ichijo H. The ASK1-MAP kinase cascades in mammalian stress response. *J Biochem*. 2004 Sep;136(3):261-5.
68. Tobiume K, Saitoh M, Ichijo H. Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 by the stress-induced activating phosphorylation of pre-formed oligomer. *J Cell Physiol*. 2002 Apr;191(1):95-104.
69. Ortner E, Moelling K. Heteromeric complex formation of ASK2 and ASK1 regulates stress-induced signaling. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Oct 19;362(2):454-9.
70. Gotoh Y, Cooper JA. Reactive oxygen species- and dimerization-induced activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 in tumor necrosis factor-alpha signal transduction. *J Biol Chem*. 1998 Jul 10;273(28):17477-82.
71. Morita K, Saitoh M, Tobiume K, Matsuura H, Enomoto S, Nishitoh H, et al. Negative feedback regulation of ASK1 by protein phosphatase 5 (PP5) in response to oxidative stress. *EMBO J*. 2001 Nov 1;20(21):6028-36.
72. Zhang L, Chen J, Fu H. Suppression of apoptosis signal-regulating kinase 1-induced cell death by 14-3-3 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Jul 20;96(15):8511-5.
73. Goldman EH, Chen L, Fu H. Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 by reactive oxygen species through dephosphorylation at serine 967 and 14-3-3 dissociation. *J Biol Chem*. 2004 Mar 12;279(11):10442-9.
74. Jones DP. Disruption of mitochondrial redox circuitry in oxidative stress. *Chem Biol Interact*. 2006 Oct 27;163(1-2):38-53.
75. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem*. 2006 Jun;97(6):1634-58.
76. Andersen JK. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med*. 2004 Jul;10 Suppl:S18-25.
77. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002 Jan;82(1):47-95.
78. Adler V, Yin Z, Tew KD, Ronai Z. Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. *Oncogene*. 1999 Nov 1;18(45):6104-11.
79. Covarrubias L, Hernandez-Garcia D, Schnabel D, Salas-Vidal E, Castro-Obregon S. Function of reactive oxygen species during animal development: passive or active? *Dev Biol*. 2008 Aug 1;320(1):1-11.

80. Ueda S, Masutani H, Nakamura H, Tanaka T, Ueno M, Yodoi J. Redox control of cell death. *Antioxid Redox Signal*. 2002 Jun;4(3):405-14.
81. Langley B, Ratan RR. Oxidative stress-induced death in the nervous system: cell cycle dependent or independent? *J Neurosci Res*. 2004 Sep 1;77(5):621-9.
82. Fujino G, Noguchi T, Takeda K, Ichijo H. Thioredoxin and protein kinases in redox signaling. *Semin Cancer Biol*. 2006 Dec;16(6):427-35.
83. Finkel T. Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol*. 2003 Apr;15(2):247-54.
84. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 2007 Jan;87(1):245-313.
85. Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*. 2007 May;12(5):913-22.
86. Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2007;47:143-83.
87. Gallo V, Kingsbury A, Balazs R, Jorgensen OS. The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J Neurosci*. 1987 Jul;7(7):2203-13.
88. D'Mello SR, Galli C, Ciotti T, Calissano P. Induction of apoptosis in cerebellar granule neurons by low potassium: inhibition of death by insulin-like growth factor I and cAMP. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Dec 1;90(23):10989-93.
89. Moran J, Itoh T, Reddy UR, Chen M, Alnemri ES, Pleasure D. Caspase-3 expression by cerebellar granule neurons is regulated by calcium and cyclic AMP. *J Neurochem*. 1999 Aug;73(2):568-77.
90. Valencia A, Moran J. Role of oxidative stress in the apoptotic cell death of cultured cerebellar granule neurons. *J Neurosci Res*. 2001 May 1;64(3):284-97.
91. Valencia A, Moran J. Reactive oxygen species induce different cell death mechanisms in cultured neurons. *Free Radic Biol Med*. 2004 May 1;36(9):1112-25.
92. Schulz JB, Weller M, Klockgether T. Potassium deprivation-induced apoptosis of cerebellar granule neurons: a sequential requirement for new mRNA and protein synthesis, ICE-like protease activity, and reactive oxygen species. *J Neurosci*. 1996 Aug 1;16(15):4696-706.
93. Martin-Romero FJ, Garcia-Martin E, Gutierrez-Merino C. Inhibition of oxidative stress produced by plasma membrane NADH oxidase delays low-potassium-induced apoptosis of cerebellar granule cells. *J Neurochem*. 2002 Aug;82(3):705-15.

94. Samhan-Arias AK, Martin-Romero FJ, Gutierrez-Merino C. Kaempferol blocks oxidative stress in cerebellar granule cells and reveals a key role for reactive oxygen species production at the plasma membrane in the commitment to apoptosis. *Free Radic Biol Med.* 2004 Jul 1;37(1):48-61.
95. Greenlund LJ, Deckwerth TL, Johnson EM, Jr. Superoxide dismutase delays neuronal apoptosis: a role for reactive oxygen species in programmed neuronal death. *Neuron.* 1995 Feb;14(2):303-15.
96. Ferri P, Cecchini T, Ciaroni S, Ambrogini P, Cuppini R, Santi S, et al. Vitamin E affects cell death in adult rat dentate gyrus. *J Neurocytol.* 2003 Nov;32(9):1155-64.
97. Coffey ET, Smiciene G, Hongisto V, Cao J, Brecht S, Herdegen T, et al. c-Jun N-terminal protein kinase (JNK) 2/3 is specifically activated by stress, mediating c-Jun activation, in the presence of constitutive JNK1 activity in cerebellar neurons. *J Neurosci.* 2002 Jun 1;22(11):4335-45.
98. Miller TM, Johnson EM, Jr. Metabolic and genetic analyses of apoptosis in potassium/serum-deprived rat cerebellar granule cells. *J Neurosci.* 1996 Dec 1;16(23):7487-95.
99. Harada J, Sugimoto M. An inhibitor of p38 and JNK MAP kinases prevents activation of caspase and apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *Jpn J Pharmacol.* 1999 Mar;79(3):369-78.
100. Harris C, Maroney AC, Johnson EM, Jr. Identification of JNK-dependent and -independent components of cerebellar granule neuron apoptosis. *J Neurochem.* 2002 Nov;83(4):992-1001.
101. Watson A, Eilers A, Lallemand D, Kyriakis J, Rubin LL, Ham J. Phosphorylation of c-Jun is necessary for apoptosis induced by survival signal withdrawal in cerebellar granule neurons. *J Neurosci.* 1998 Jan 15;18(2):751-62.
102. Xifro X, Falluel-Morel A, Minano A, Aubert N, Fado R, Malagelada C, et al. N-methyl-D-aspartate blocks activation of JNK and mitochondrial apoptotic pathway induced by potassium deprivation in cerebellar granule cells. *J Biol Chem.* 2006 Mar 10;281(10):6801-12.
103. Yamagishi S, Matsumoto T, Yokomaku D, Hatanaka H, Shimoke K, Yamada M, et al. Comparison of inhibitory effects of brain-derived neurotrophic factor and insulin-like growth factor on low potassium-induced apoptosis and activation of p38 MAPK and c-Jun in cultured cerebellar granule neurons. *Brain Res Mol Brain Res.* 2003 Nov 26;119(2):184-91.
104. Bunkoczi G, Salah E, Filippakopoulos P, Fedorov O, Muller S, Sobott F, et al. Structural and functional characterization of the human protein kinase ASK1. *Structure.* 2007 Oct;15(10):1215-26.

105. Lang W, Wang H, Ding L, Xiao L. Cooperation between PKC-alpha and PKC-epsilon in the regulation of JNK activation in human lung cancer cells. *Cell Signal*. 2004 Apr;16(4):457-67.
106. Lopez-Bergami P, Habelhah H, Bhoumik A, Zhang W, Wang LH, Ronai Z. RACK1 mediates activation of JNK by protein kinase C [corrected]. *Mol Cell*. 2005 Aug 5;19(3):309-20.
107. Lopez-Bergami P, Ronai Z. Requirements for PKC-augmented JNK activation by MKK4/7. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40(5):1055-64.
108. Krohn AJ, Preis E, Prehn JH. Staurosporine-induced apoptosis of cultured rat hippocampal neurons involves caspase-1-like proteases as upstream initiators and increased production of superoxide as a main downstream effector. *J Neurosci*. 1998 Oct 15;18(20):8186-97.
109. Caballero-Benitez A, Moran J. Caspase activation pathways induced by staurosporine and low potassium: role of caspase-2. *J Neurosci Res*. 2003 Feb 1;71(3):383-96.
110. Bhat NR, Zhang P. Hydrogen peroxide activation of multiple mitogen-activated protein kinases in an oligodendrocyte cell line: role of extracellular signal-regulated kinase in hydrogen peroxide-induced cell death. *J Neurochem*. 1999 Jan;72(1):112-9.
111. Wang W, Hou XY, Gao C, Liu Y, Zong YY, Zhang GY. Regulation of c-Jun N-terminal kinase activation in hydrogen peroxide induced neurotoxicity. *J Neurocytol*. 2003 Feb;32(2):143-51.
112. Schroeter H, Spencer JP, Rice-Evans C, Williams RJ. Flavonoids protect neurons from oxidized low-density-lipoprotein-induced apoptosis involving c-Jun N-terminal kinase (JNK), c-Jun and caspase-3. *Biochem J*. 2001 Sep 15;358(Pt 3):547-57.
113. Tobiume K, Matsuzawa A, Takahashi T, Nishitoh H, Morita K, Takeda K, et al. ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep*. 2001 Mar;2(3):222-8.
114. Kruman I, Guo Q, Mattson MP. Calcium and reactive oxygen species mediate staurosporine-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis in PC12 cells. *J Neurosci Res*. 1998 Feb 1;51(3):293-308.
115. Nath R, McGinnis K, Dutta S, Shivers B, Wang KK. Inhibition of p38 kinase mimics survival signal-linked protection against apoptosis in rat cerebellar granule neurons. *Cell Mol Biol Lett*. 2001;6(2):173-84.

116. Yamagishi S, Yamada M, Ishikawa Y, Matsumoto T, Ikeuchi T, Hatanaka H. p38 mitogen-activated protein kinase regulates low potassium-induced c-Jun phosphorylation and apoptosis in cultured cerebellar granule neurons. *J Biol Chem.* 2001 Feb 16;276(7):5129-33.
117. Yamagishi S, Yamada M, Koshimizu H, Takai S, Hatanaka H, Takeda K, et al. Apoptosis-signal regulating kinase-1 is involved in the low potassium-induced activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun in cultured cerebellar granule neurons. *J Biochem.* 2003 Jun;133(6):719-24.
118. Waas WF, Lo HH, Dalby KN. The kinetic mechanism of the dual phosphorylation of the ATF2 transcription factor by p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase alpha. Implications for signal/response profiles of MAP kinase pathways. *J Biol Chem.* 2001 Feb 23;276(8):5676-84.
119. Godl K, Wissing J, Kurtenbach A, Habenberger P, Blencke S, Gutbrod H, et al. An efficient proteomics method to identify the cellular targets of protein kinase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Dec 23;100(26):15434-9.
120. LoGrasso PV, Frantz B, Rolando AM, O'Keefe SJ, Hermes JD, O'Neill EA. Kinetic mechanism for p38 MAP kinase. *Biochemistry.* 1997 Aug 26;36(34):10422-7.
121. D'Alimonte I, Ballerini P, Nargi E, Buccella S, Giuliani P, Di Iorio P, et al. Staurosporine-induced apoptosis in astrocytes is prevented by A1 adenosine receptor activation. *Neurosci Lett.* 2007 May 11;418(1):66-71.
122. Porras A, Zuluaga S, Black E, Valladares A, Alvarez AM, Ambrosino C, et al. P38 alpha mitogen-activated protein kinase sensitizes cells to apoptosis induced by different stimuli. *Mol Biol Cell.* 2004 Feb;15(2):922-33.
123. Zhuang S, Demirs JT, Kochevar IE. p38 mitogen-activated protein kinase mediates bid cleavage, mitochondrial dysfunction, and caspase-3 activation during apoptosis induced by singlet oxygen but not by hydrogen peroxide. *J Biol Chem.* 2000 Aug 25;275(34):25939-48.
124. Wang JY, Shum AY, Ho YJ. Oxidative neurotoxicity in rat cerebral cortex neurons: synergistic effects of H₂O₂ and NO on apoptosis involving activation of p38 mitogen-activated protein kinase and caspase-3. *J Neurosci Res.* 2003 May 15;72(4):508-19.
125. Gomez-Lazaro M, Galindo MF, Melero-Fernandez de Mera RM, Fernandez-Gomez FJ, Concannon CG, Segura MF, et al. Reactive oxygen species and p38 mitogen-activated protein kinase activate Bax to induce mitochondrial cytochrome c release and apoptosis in response to malonate. *Mol Pharmacol.* 2007 Mar;71(3):736-43.

126. Hong JT, Yen JH, Wang L, Lo YH, Chen ZT, Wu MJ. Regulation of heme oxygenase-1 expression and MAPK pathways in response to kaempferol and rhamnocitrin in PC12 cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009 May 15;237(1):59-68.
127. Yoo BK, Choi JW, Shin CY, Jeon SJ, Park SJ, Cheong JH, et al. Activation of p38 MAPK induced peroxynitrite generation in LPS plus IFN-gamma-stimulated rat primary astrocytes via activation of iNOS and NADPH oxidase. *Neurochem Int*. 2008 May;52(6):1188-97.
128. Coyoy A, Valencia A, Guemez-Gamboa A, Moran J. Role of NADPH oxidase in the apoptotic death of cultured cerebellar granule neurons. *Free Radic Biol Med*. 2008 Oct 15;45(8):1056-64.