



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

PAPEL DE LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO EN LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA DE LAS MAP CINASAS INVOLUCRADA EN LA MUERTE NEURONAL APOPTÓTICA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

MARCO ANTONIO ZARAGOZA CAMPILLO

TUTOR PRINCIPAL

DR. JULIO EDUARDO ROQUE MORÁN ANDRADE
[Instituto de Fisiología Celular](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. MARINA MACÍAS SILVA
[Instituto de Fisiología Celular](#)

DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

Ciudad Universitaria, CDMX. Enero, 2019



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.

Este proyecto de investigación se realizó bajo la dirección del Dr. Julio Morán Andrade en la División de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Este trabajo fue financiado por donativos otorgados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, 179234 y 285184), el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la UNAM (DGAPA-PAPIIT, (IN206213 e IN210716) y por la beca para estudios de posgrado a nivel de doctorado del CONACyT.

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

Dr. Julio Eduardo Roque Morán Andrade

Dra. Marina Macías Silva

Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte

El jurado que revisó la tesis estuvo conformado por:

Dra. María de Lourdes Massieu Trigo

Dra. María Elena Ibarra Rubio

Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez

Dra. Diana María Escalante Alcalde

Dr. Jaime Iván Velasco Velázquez

Por otro lado, el Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) proporcionó apoyos para la asistencia a cursos y congresos con el fin de enriquecer la investigación que derivó en esta tesis de doctorado.

Este trabajo también contó con el apoyo técnico de la Maestra en Ciencias Guadalupe Domínguez Macouzet.

Agradecimientos

A mi tutor, el Dr. Julio Morán Andrade por sus consejos, apoyo y confianza que me otorgó a lo largo de mi estancia en su laboratorio, laboratorio en donde pude conocer varias facetas de mi persona.

A los miembros de mi comité tutorial, la Dr. Marina Macías Silva y la Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte, por sus valiosas aportaciones, comentarios y sugerencias para enriquecer el presente trabajo de investigación.

A los miembros de mi jurado: Dra. Lourdes Massieu, Dra. Clorinda Arias, Dra. María Elena Ibarra Rubio, Dra. Ana Escalante y Dr. Iván Velasco, por contribuir al enriquecimiento de este trabajo con sus observaciones.

A mis compañeros y amigos del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM: Mauricio, Diego, Carolina, Guadalupe, Marcelino, Brenda, Gabriela, Gaby pequeña, Janeth, Tere...

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por ser la segunda casa de todos aquellos que perseguimos un sueño...

A mi familia: Yesenia Isabel Zaragoza Campillo, Gabriela Zaragoza Campillo, Ana Victoria Zaragoza Campillo y Maximiliano Zaragoza Campillo, por el sólo hecho de ser mi familia...

A mi madre, María Trinidad Campillo Alvarado por enseñarme que rendirse no es una opción, que la vida está llena de sorpresas...

A mis amigos: Luis Enrique Pérez Silva, Eduardo Báez Buenabad, Roberto Zamora Zamora, por compartir tantas experiencias que engrandecen el alma...A mis amigos y compañeros de la pista y la montaña: Javier, Patricia, Natalia, Mariana, Mónica, Dersu, Haza, Julio, por ser partícipes de esta locura inmensa que nos atrapó en el camino y que se llama correr...

A Carolina Cid Castro por tanto apoyo incondicional...

A Natalia Palma Linares por el placer de coincidir en este planeta.

Índice

Abreviaturas.....	1
Resumen.....	3
Abstract.....	4
1. Introducción.....	5
1.1 Apoptosis.....	5
1.2. Especies reactivas del oxígeno.....	7
1.2.1. Especies reactivas del oxígeno y apoptosis.....	9
1.3. Señalización redox.....	11
1.3.1. Vía de las MAP cinasas.....	11
1.3.2. ASK1 en la muerte celular inducida por estrés oxidativo.....	13
1.3.3. Sistema de la tiorredoxina.....	16
1.3.4. Regulación redox de Akt.....	18
1.4. Vía de señalización mitocondrial TXNIP-Trx2-ASK1.....	20
1.5. Las neuronas granulares de cerebelo como modelo de muerte apoptótica.....	23
2. Planteamiento del problema.....	24
3. Hipótesis.....	26
4. Objetivos.....	27
4.1. Objetivo general.....	27
4.2. Objetivos particulares.....	27
5. Métodos.....	28
5.1. Modelo experimental.....	28
5.2. Cultivos primarios de NGC.....	28
5.3. Viabilidad celular.....	29
5.4. Determinación de ROS.....	29
5.5. Análisis de proteínas (Western Blot).....	30
5.6. Co-inmunoprecipitación (Co-IP).....	30
5.7. Anticuerpos.....	31
5.8. Análisis estadístico.....	32

6. Resultados	32
6.1. Condiciones apoptóticas inducen la generación de ROS en NGC.....	32
6.2. La expresión de TXNIP inducida por privación de potasio está mediada por ROS	34
6.3. H ₂ O ₂ Induce la expresión de TXNIP en NGC	36
6.4. La expresión de TXNIP inducida por estaurosporina está mediada por ROS	37
6.5. Privación de potasio y estaurosporina reducen la activación de Akt en NGC	39
6.6. H ₂ O ₂ disminuye la activación de Akt en NGC	42
6.7. La activación de Akt y la expresión de TXNIP son dos mecanismos acoplados en la muerte neuronal	43
6.8. TXNIP se une a Trx2 en NGC bajo privación de potasio	49
6.9. La interacción entre ASK1 y Trx2 es sensible al estado redox.....	50
6.10. K5 y Sts inducen la separación entre Trx2 y ASK1 a tiempos cortos	51
6.11. K5 incrementa la activación de ASK1 a tiempos cortos (fosforilación de Thr845).....	54
6.12. Sts incrementa la activación de ASK1 a tiempos cortos (desfosforilación de Ser967)	55
7. Discusión	57
8. Conclusiones	63
8.1 Conclusión general.....	64
9. Perspectivas	64
10. Figuras suplementarias	65
11. Bibliografía.....	66
12. Publicaciones	72

Abreviaturas

ASK1: Cinasa 1 reguladora de señales apoptóticas (Apoptosis signal-regulating kinase 1)

DHEt: Dihidroetidio

DIV: Días *in vitro*

DPI: Cloruro de difenil iodonio (Diphenyleneiodonium chloride)

EGF: Factor de crecimiento endotelial

ERK1/2: Cinasa 1/2 regulada por señales extracelulares

FOXO: Forkhead box protein O

Grx: Glutarredoxina

GSH: Glutación

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

HSP90: Proteína de choque térmico (Heat shock protein)

JNK: Cinasa del amino terminal de c-Jun

K25: 25 mM de cloruro de potasio

K5: 5 mM de cloruro de potasio

MAPKs: Proteínas cinasas activadas por mitógeno

MAPKK: Cinasa de la MAPK

MAPKKK: Cinasa de la cinasa de la MAPK

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NGC: Neuronas granulares de cerebelo

NMDA: N-metil-D-aspartato

NMDAR: Receptor de NMDA

NOX: NADPH oxidasa

O₂^{•-}: Radical anión superóxido

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PDK1: Cinasa 1 dependiente de fosfoinosítidos

PDK2: Cinasa 2 dependiente de fosfoinosítidos

PI3K: Fosfatidilinositol 3-cinasa

PIP₃: PI(3,4,5)P₃, Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato

PKB: Proteína cinasa B

PP2A: Proteína fosfatasa 2A

PTEN: Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa

ROS: Especies reactivas del oxígeno (Reactive oxygen species)

SAPK: Proteínas cinasas activadas por estrés

SNC: Sistema nervioso central

Sts: Estaurosporina

TNF: Factor de necrosis tumoral

TNFR: Receptor del factor de necrosis tumoral

Trx1: Tiorredoxina 1

Trx2: Tiorredoxina 2

TrxR1: Tiorredoxina reductasa 1

TXNIP: Proteína que interacciona con la tiorredoxina (Thioredoxin-interacting protein)

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

VEGFR: Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular

Resumen

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) juegan un papel muy importante en la apoptosis neuronal. Sin embargo, aún no se conocen a detalle sus mecanismos moleculares. Se ha demostrado que la sobreexpresión de TXNIP (thioredoxin-interacting protein) hace a las células más susceptibles al estrés oxidativo y promueve apoptosis, y que la activación de la vía de señalización PI3K/Akt lleva a una regulación a la baja de TXNIP a nivel transcripcional. En el presente trabajo, evaluamos el papel de las ROS como una señal en la regulación de la actividad de Akt y la subsecuente regulación de la expresión de TXNIP en un modelo de muerte apoptótica de Neuronas Granulares de Cerebelo (NGC) de rata. Observamos que dos condiciones apoptóticas (privación de potasio y estaurosporina) que generan ROS a tiempos cortos en NGC conducen a un incremento en la expresión de TXNIP en una forma dependiente del tiempo, mientras que en la condición despolarizante K25 no se presenta expresión de TXNIP. Además, antioxidantes e inhibidores de la NADPH Oxidasa redujeron significativamente esta expresión. También, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) causó un incremento en la expresión de TXNIP. Además, la privación de potasio (K5) y la estaurosporina (Sts) indujeron la inactivación de Akt en una manera dependiente del tiempo, similar a lo encontrado con la expresión de TXNIP. También, el tratamiento con H_2O_2 produjo inactivación de Akt. Por otro lado, bajo el estímulo apoptótico de K5, encontramos que TXNIP se une a Trx2 con un patrón similar al de la expresión de la proteína TXNIP sugiriendo que ésta se une enseguida a Trx2. Asimismo, bajo el estímulo de K5, Trx2 se desprende físicamente de ASK1 (Apoptosis signal-regulating kinase 1), la cinasa de la apoptosis, en correspondencia temporal con la unión TXNIP-Trx2. Evaluamos que la interacción ASK1-Trx2 es sensible al estado redox, sugiriendo que las ROS generadas por K5 pueden ser responsables de la interacción TXNIP-Trx2 así como de la separación física entre Trx2 y ASK1. De manera similar, también encontramos que con el tratamiento de Sts, Trx2 se separa de ASK1 a partir de las 4 h de exposición, lo cual corresponde temporalmente con el aumento en la expresión de TXNIP en este modelo. Confirmamos la activación de ASK1 bajo estas diferentes condiciones de muerte. También observamos que la interacción Trx1-ASK1 es sensible al estado redox, así como que K5 y Sts producen una separación entre Trx1 y ASK1 a tiempos cortos, pero de magnitud mucho menor que la encontrada entre Trx2 y ASK1, indicando que las ROS actúan primordialmente sobre esta última vía en este modelo de muerte neuronal. Estos datos indican que diferentes condiciones apoptóticas, probablemente debido a las ROS que generan, provocan la muerte neuronal actuando principalmente a través de las proteínas TXNIP, Trx2 y ASK1. En su conjunto, nuestros resultados sugieren que las ROS promueven apoptosis neuronal a través de la señalización Akt-TXNIP-Trx2-ASK1 y apoyan la idea de que la vía PI3K/Akt regula la expresión de TXNIP. Este estudio destaca la relevancia de este mecanismo en la muerte neuronal.

Abstract

ROS play a critical role in neuronal apoptosis. However, their molecular mechanisms are not well understood. It has been shown that TXNIP (thioredoxin-interacting protein) overexpression renders cells more susceptible to oxidative stress and promotes apoptosis, and that the activation of PI3K/Akt pathway leads to a down-regulation of TXNIP at the transcriptional level. Here, we evaluated the role of ROS as a signal in the regulation of Akt activity and the subsequent regulation of the TXNIP expression in a model of apoptotic death of cerebellar granule neurons (CGN). We observed that two apoptotic conditions (potassium deprivation and staurosporine) that generate ROS at short times in CGN led to an increase in the expression of TXNIP in a time-dependent manner; while in the depolarizing condition (K25) there is no TXNIP expression. Moreover, antioxidants and inhibitors of the NADPH-oxidase significantly reduced this expression. Also, H₂O₂ caused an increase in TXNIP expression. Moreover, potassium deprivation (K5) and staurosporine (Sts) induced inactivation of Akt in a time-dependent manner, similar to TXNIP expression. Also, H₂O₂ treatment led to Akt inactivation. On the other hand, under K5, we found that TXNIP binds to Trx2 with a pattern similar to the expression of the TXNIP protein, suggesting that it binds to Trx2. Also, under K5, Trx2 is physically released from ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1), the kinase of apoptosis, in temporal correspondence with the TXNIP-Trx2 junction. We evaluated if ASK1-Trx2 interaction is sensitive to the redox state, suggesting that the ROS generated by K5 may be responsible for the TXNIP-Trx2 interaction as well as for the physical separation between Trx2 and ASK1. Similarly, we also found that under Sts (proapoptotic condition), Trx2 is separated from ASK1 after 4 h of exposure, which corresponds temporarily with the increase in TXNIP expression in this model. We confirmed the activation of ASK1 under these different death conditions. We also observed that Trx1-ASK1 interaction is sensitive to the redox state, as well as the fact that K5 and Sts produce a separation between Trx1 and ASK1 at short times, but of a much smaller magnitude than that found between Trx2 and ASK1, indicating that ROS act primordially on this last pathway in this neuronal death model. These data indicate that different apoptotic conditions, probably due to the ROS they generate, cause neuronal death acting mainly through the proteins TXNIP, Trx2 and ASK1. Together, our results suggest that ROS promote neuronal apoptosis through the Akt-TXNIP-Trx2-ASK1 signaling, and support the idea that the PI3K/Akt pathway regulates the TXNIP expression. This study highlights the potential importance of this mechanism in neuronal death.

1. Introducción

Actualmente se sabe muy bien que las especies reactivas del oxígeno (ROS) son reguladores esenciales de numerosas funciones celulares, y en los últimos años se ha profundizado más sobre el papel de estas moléculas como señales involucradas en varios procesos fisiológicos, incluida la regulación de la muerte programada [1]. Esto ha sido posible gracias a los avances en las metodologías empleadas para el estudio de las funciones de las ROS, lo cual ha permitido obtener un mayor conocimiento del papel de estas moléculas como mediadores de diferentes patologías. De manera similar, los estudios logrados en el sistema nervioso acerca de las funciones de las ROS se han enfocado principalmente en las diferentes neuropatologías y enfermedades neurodegenerativas, lo cual ha contribuido de manera muy importante a la comprensión de las diferentes proteínas blanco y los mecanismos mediante los cuales se producen y se regulan las ROS [2]. Aunque hay grandes avances en el campo, aún existen muchas interrogantes acerca del papel de las ROS en los diferentes eventos fisiológicos relacionados al sistema nervioso.

1.1 Apoptosis

La apoptosis es un tipo de muerte celular genéticamente programado esencial para el desarrollo embrionario y la homeostasis en organismos multicelulares [3]. 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 [4, 5].

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 [6, 7]. La apoptosis es un proceso activo que requiere de ATP y de la síntesis de proteínas [8, 9]. Se caracteriza por presentar una serie de cambios morfológicos y moleculares distintivos, como el encogimiento celular, condensación nuclear, pérdida de la estructura membranal, formación de cuerpos apoptóticos, fragmentación internucleosomal de ADN, translocación de fosfatidilserina y activación de caspasas [10-12]. Un componente central de la muerte apoptótica es el sistema proteolítico que involucra a la familia de proteínas denominadas caspasas que son proteasas de cisteína que fragmentan sustratos después de un residuo de ácido aspártico. Se han identificado 14 caspasas en mamíferos [13], las cuales difieren en su secuencia primaria y su especificidad de sustratos. Las caspasas se sintetizan como zimógenos, y estructuralmente poseen un predominio en su región N-terminal, una subunidad larga (~20 kDa) y una subunidad corta (~10 kDa) [14, 15]. Estos zimógenos se

activan proteolíticamente por otras caspasas, por proximidad entre ellas o por la formación de una holoenzima denominada apoptosoma [16].

Canónicamente se han descrito tres vías apoptóticas. La vía extrínseca o vía de receptor de muerte 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, 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 [15, 16]. La segunda vía es la vía intrínseca o mitocondrial que se activa por daño al ADN o por estímulos externos, lo cual genera, entre otras cosas, 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 con la procaspasa 9, formando el apoptosoma, el cual es capaz de activar a la caspasa 3 [15] (Figura1). La vía del estrés del retículo involucra la activación de una serie de proteínas asociadas al retículo endoplásmico que lleva a la activación de la caspasa 12 y la eventual activación de la caspasa 3. Tanto esta vía como la mitocondrial parecen estar controladas por la activación de vías de señalización pro-apoptóticas, entre las que se incluye a las vías de proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK).

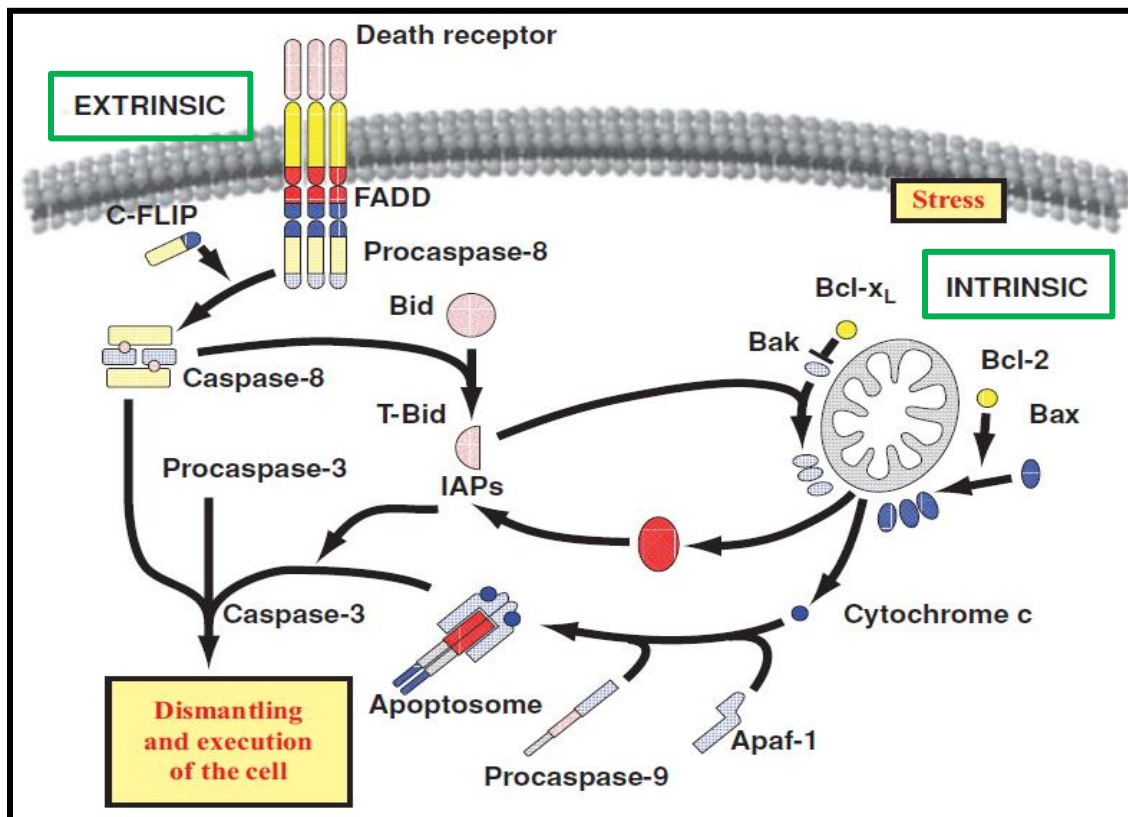


Figura 1. Vías canónicas de apoptosis en células de mamíferos. La vía intrínseca involucra a la mitocondria, la cual, cuando se estimula por una señal apoptótica, libera varios reguladores apoptóticos, incluido el citocromo c y otras proteínas normalmente secuestradas entre las membranas mitocondriales interna y externa. Tras la liberación, el citocromo c citosólico se une a Apaf-1, resultando en la formación del apoptosoma compuesto de oligómeros de citocromo c, Apaf-1 y procaspasa 9. Este complejo de alto peso molecular da como resultado la activación proteolítica de la caspasa 9, la cual activa las caspasas río abajo para la muerte celular. La vía extrínseca está ejemplificada por los miembros de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR). Después de la unión de ligandos de "muerte" específicos, los receptores se agregan, formando un complejo de señalización inductor de la muerte que resulta en la activación de la caspasa 8, una caspasa iniciadora. Posteriormente, la caspasa 8 activa proteolíticamente a las caspasas "ejecutoras" (p. ej., caspasa 3, 6 ó 7), las cuales fragmentan proteínas estructurales y de otro tipo para el desmantelamiento coordinado de la célula. Tomado de [17].

1.2. Especies reactivas del oxígeno

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) son moléculas que se originan a partir de la reducción secuencial del oxígeno molecular (O_2). Básicamente se dividen en dos grupos principales: los radicales libres y las especies no radicales. La reducción univalente del O_2 genera al radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y a partir de esta molécula se generan otras ROS de importancia biológica, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y los radicales hidroxilo (OH^{\cdot}), peroxilo (ROO^{\cdot}), alcoxilo (RO^{\cdot}) e hidroperoxilo (HO_2^{\cdot}) [18, 19]. Si las ROS no son contenidas pueden causar daños en el ADN, las proteínas y los lípidos [17]. De entre las distintas ROS producidas en las células, el H_2O_2 es la ROS de mayor relevancia en la fisiología celular, ya que posee distintas propiedades que la hacen una molécula propicia para la señalización, incluyendo su relativa alta capacidad de difundir a través de las membranas biológicas, su relativamente baja reactividad y una vida media relativamente más larga que otras ROS. Además, es capaz de modificar la función de distintas proteínas a través de su oxidación [20, 21].

En este sentido, existe una serie de condiciones que deben cumplirse para que el H_2O_2 pueda actuar en la señalización redox. Primero, su producción debe ser restringida a un espacio y tiempo específicos, de esta forma sería capaz de modular eventos particulares de las vías de señalización en regiones específicas de la célula. Puesto que el ambiente de la célula es altamente reducido, el H_2O_2 no podría viajar largas distancias sin que éste fuese degradado por una enzima antioxidante. Segundo, su producción debe ser controlada, de lo contrario, se produciría un daño inespecífico a diversos componentes de la célula a través de la formación del radical hidroxilo [22].

Las modificaciones a las proteínas provocadas por el H_2O_2 varían según el tipo de reacción, lo cual determina a su vez el grado de reversibilidad. Básicamente existen dos formas en las que el H_2O_2 interacciona con las proteínas. La primera es la oxidación de determinados aminoácidos, siendo la

cisteína el más importante [21] y la segunda es la modificación de los pares proteína-glutación y proteína-tiorredoxina [23, 24]. Para que los residuos de cisteínas de las proteínas puedan reaccionar con el H_2O_2 existen dos consideraciones espaciales que se deben considerar: a) los residuos de cisteína deben ser accesibles al H_2O_2 y b) la composición de aminoácidos aledaños a la cisteína, ya que si éstos poseen carga positiva, pueden neutralizar la carga negativa del grupo tiol de las cisteínas (R-SH), disminuyendo su pKa y favoreciendo la forma desprotonada o tiolato (R-S⁻), la cual es mucho más reactiva al H_2O_2 que el grupo tiol. Para que esto ocurra, el pKa de los residuos de cisteína en las proteínas debe ser más bajo o alrededor del pH intracelular.

En estas condiciones, aproximadamente la mitad de los grupos tiol se encuentran en su forma desprotonada. Por lo anterior, las proteínas que posean cisteínas expuestas y con valores de pKa más bajos a la media (8.0-8.5), serán más susceptibles de una modificación por el H_2O_2 [22, 25]. Las reacciones que pueden darse son las siguientes: cuando un tiolato entra en contacto con el H_2O_2 , éste cambia de tiolato a ácido sulfénico (R-SOH). A partir de aquí pueden ocurrir diferentes reacciones en ausencia de glutación, tiorredoxina (Trx) y glutarredoxina (Grx): 1) Algunos aminoácidos adyacentes pueden favorecer la estabilización del intermediario sulfonato (R-SO⁻), como ocurre en el caso de las proteínas OxyR y Orp1, sin embargo, este estado es inestable y usualmente es reducido. 2) El ácido sulfénico formado es altamente reactivo, por lo que si en la proteína existe un grupo tiol adyacente, éste lo reducirá y se formará un enlace disulfuro. 3) Si existiese un nitrógeno próximo al ácido sulfénico se formará una sulfenil amida (RSNR'R''). 4) El ácido sulfénico puede oxidarse nuevamente por el H_2O_2 , formando ácido sulfínico (R-SO₂H). A pesar de ser estable, este ácido puede reducirse nuevamente a ácido sulfénico por las sestrinas [26]. 5) Si el ácido sulfínico se oxida por el H_2O_2 , se formará ácido sulfónico (R-SO₃H) [22, 24].

Por otra parte, el ácido sulfénico en presencia de glutación reducido, forma un enlace disulfuro entre el glutación y el residuo de cisteína, formando una proteína glutationilada, por el contrario, si el glutación se encuentra oxidado, se puede formar el mismo enlace con un grupo tiol de un residuo aminoácido de una proteína. Además, los enlaces disulfuro formados entre los átomos de azufre de las cisteínas pueden ser reducidos por tiorredoxina y glutarredoxina independientemente, formando un enlace disulfuro entre la proteína y la tiorredoxina u otro entre la proteína y la glutarredoxina, enlaces que nuevamente puede romper el H_2O_2 . Ambos procesos ocurren y pueden ser importantes en la regulación de la actividad de las proteínas, como es el caso de la cinasa proapoptótica ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase-1). Todo esto refleja una serie de reacciones de óxido-reducción que son controladas por el estado redox de la célula (Figura 2) [27, 28].

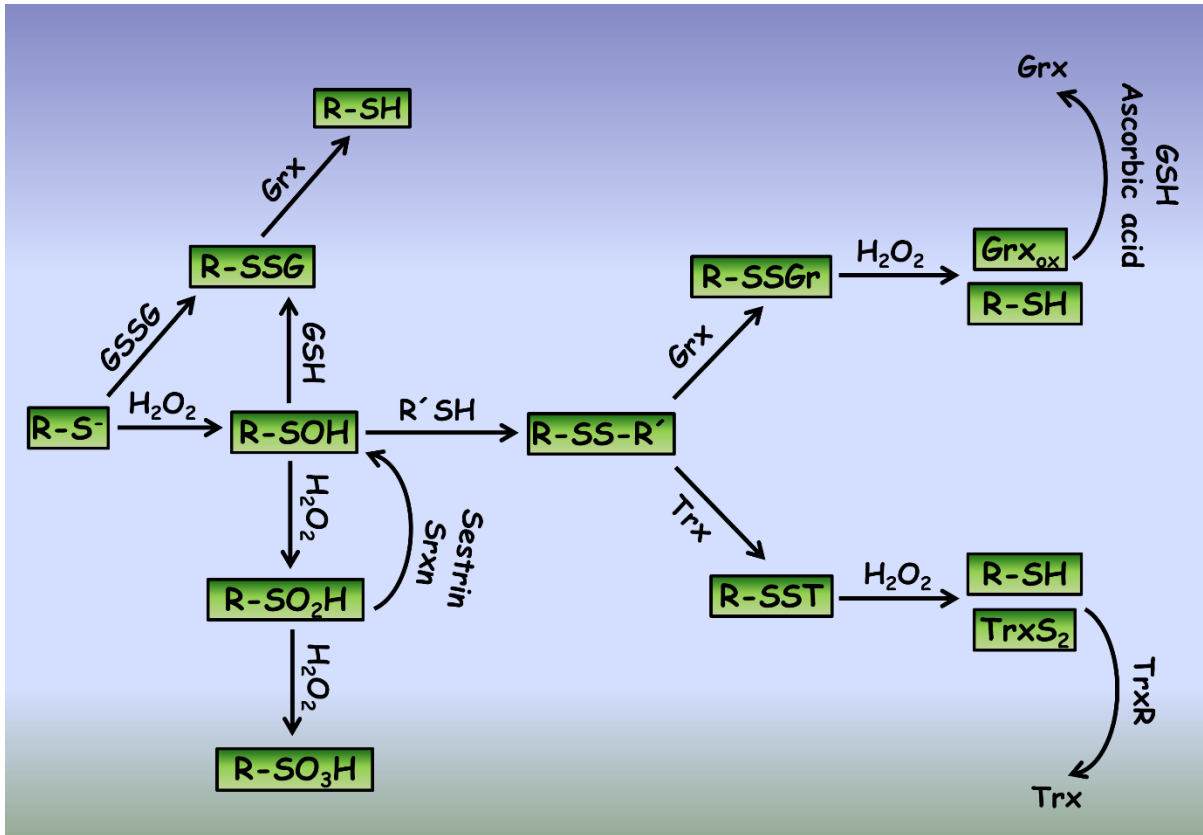


Figura 2. Mecanismos de óxido-reducción en la señalización redox. Cuando el H_2O_2 reacciona con una cisteína reactiva de un grupo tiolato ($R-S-$) produce ácido sulfénico ($R-SOH$). Si el H_2O_2 oxida al $R-SOH$ entonces se forma el ácido sulfínico (RSO_2H). Y cuando el H_2O_2 oxida a $R-SO_2H$, se forma ácido sulfónico ($R-SO_3H$). Las distintas tioredoxinas y glutaredoxinas pueden reducir los enlaces disulfuro entre las proteínas oxidadas a través de la formación de enlaces disulfuro intermoleculares, los cuales a su vez pueden ser disociados por el H_2O_2 . Tomado de [1].

1.2.1. Especies reactivas del oxígeno y apoptosis

Muchas proteínas sensibles a los estados redox están involucradas en la regulación de vías apoptóticas, sugiriendo que el ambiente redox de la célula es esencial. Y en particular, la producción de ROS está asociada con muerte celular programada en muchos contextos fisiológicos incluyendo inflamación, isquemia y neurodegeneración [16]. La mayor fuente fisiológica de ROS en los mamíferos es la mitocondria, donde el oxígeno es reducido a agua. Un evento crucial asociado con la vía intrínseca es el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa en la mitocondria, lo cual provoca la disipación del potencial transmembranal mitocondrial, un decremento en el ATP así como incremento en las ROS [29].

La familia Bcl-2 de reguladores apoptóticos contiene tanto proteínas proapoptóticas como antiapoptóticas que se localizan en la membrana externa mitocondrial; frecuentemente, la sensibilidad de las células a estímulos apoptóticos depende del balance entre estas proteínas miembros de la familia Bcl-2. Bajo condiciones de estrés oxidativo, proteínas como Bcl-2 previenen la habilidad de las ROS para inducir apoptosis. Y al contrario, Bad y Bax, miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2, actúan como sensores de daño celular, translocan a la mitocondria posterior a tal estrés, incrementa la generación de ROS, y alteran la habilidad de las proteínas antiapoptóticas para inhibir la muerte; las caspasas se activan y el mecanismo de muerte continúa [16]

El fenotipo resultante depende de la concentración, es decir, a niveles relativamente bajos de ROS éstas funcionan como moléculas señalizadoras que promueven proliferación y supervivencia, mientras que niveles altos de ROS promueven apoptosis y a niveles aún más altos provocan necrosis [30]. La apoptosis mediada por ROS altera la transición de permeabilidad así como el potencial de la membrana mitocondrial llevando a una perturbación de la función celular: se bloquea la síntesis de ATP, se oxidan moléculas sensibles redox como NADH, NADPH y GSH, además de que incrementan los niveles de ROS.

En las vías del receptor de muerte, las ROS se acumulan antes que todas las alteraciones morfológicas y bioquímicas asociadas con la apoptosis comiencen a aparecer. Se ha visto que tratamientos antioxidantes previenen la apoptosis mediada por el receptor de muerte. En la mayoría de los casos, las ROS desencadenan la muerte celular programada al alterar oxidativamente a proteínas y otros componentes o por activación directa de la vía mitocondrial [30]. Efectores apoptóticos, particularmente las caspasas, son sensibles al estado redox. Todas las caspasas albergan un motivo QACXG, el cual contiene la cisteína del sitio activo que es sensible a los cambios del estado de óxido-reducción [31]. Por otro lado, se sabe que se requiere la tiorredoxina (Trx) y el glutatión (GSH) para la actividad de la caspasa 3 y en la regulación de la proteína ASK1, una cinasa de la cinasa de las MAPKs (MAP3K) que regula la activación de JNK (c-Jun N-terminal kinase) [32]. JNK es una MAPK que está involucrada en las vías de transducción de señales por estrés así como en la apoptosis celular [32]. Por todo esto es que las células requieren un ambiente reductor con el fin de que las caspasas funcionen adecuadamente.

Si bien los mecanismos precisos por los que ROS regulan la apoptosis no están del todo claros, la modificación de residuos de cisteína importantes puede explicar la regulación del equilibrio redox en células que experimentan muerte celular programada. El estado redox de la cisteína puede influir en la estructura de la proteína llevando a activación o inhibición de su función. Los antioxidantes como la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa también influyen en el estado redox mediante

la captación de ROS. Aunque cada vez hay más preguntas, la regulación redox del estrés oxidativo es central para la modulación de la muerte celular programada [25, 30].

1.3. Señalización redox

Se ha considerado que la oxidación de cisteínas críticas en varias proteínas que participan en la señalización celular es un evento regulador postraducciona l muy importante [33], es decir, la regulación de la actividad de proteínas por oxidación bajo condiciones fisiológicas de ROS estimuladas por diferentes fuentes (NADPH oxidasa, cadena de transporte de electrones en la mitocondria, etc.), indica que la célula está equipada con la maquinaria suficiente y necesaria para usar la oxidación con el fin de ajustar el tiempo y la amplitud de los eventos de señalización transmitidos a través de proteínas de señalización sensibles al estado redox. En los últimos años se ha conocido más sobre el papel de las ROS como moléculas señal involucradas en varias funciones fisiológicas, incluida la regulación de la muerte programada. A nivel molecular, el estrés oxidativo tiene el potencial de alterar la homeostasis de los tioles que lleva a una modificación de las características funcionales de aquellas proteínas con residuos de cisteínas reactivos. Esta condición aumenta si se inhibe el sistema de la tioredoxina, que se encargan de revertir los puentes disulfuro inter- o intramoleculares, o si se inhibe el de la glutarredoxina, que se encarga de la S-glutationilación de proteínas [32, 34].

A continuación se presentan algunos mecanismos fisiológicamente relevantes en donde la oxidación de proteínas produce un evento de señalización celular que ha sido relacionado con la apoptosis celular.

1.3.1. Vía de las MAP cinasas

Las células eucariontes están equipadas con múltiples sistemas de transducción de señales intracelulares, los cuales detectan diversas señales provenientes del medio externo e interno y producen una amplia variedad de respuestas celulares, incluyendo detención del ciclo celular, reparación del ADN, producción de citocinas y apoptosis. Las cascadas de MAPKs se encuentran entre estos sistemas de señalización. Cada cascada consiste de tres clases de proteínas cinasas: MAPK, la cinasa de MAPK (MAP2K), y la cinasa de MAP2K (MAP3K). Estas vías están conservadas evolutivamente en todas las células eucariontes [35, 36] y los miembros definidos de la superfamilia de las MAPK incluyen al menos 11 genes para MAPK, 7 para MAP2K y 21 para MAP3K, en mamíferos [37]. Se han caracterizado muy bien las cuatro principales cascadas de MAPK que convergen sobre las cinasas ERK1/2, ERK5, JNK y p38. Estas vías son estructuralmente similares, pero funcionalmente distintas entre sí [38]. De entre

estas cascadas, las cascadas de JNK y p38 sirven como potentes reguladores de funciones celulares en respuesta a una amplia variedad de estresantes ambientales, tales como estrés oxidativo, radiación ultravioleta (UV), rayos X, choque calórico y osmótico, así como citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF) e interleucina 1 (IL)-1 [39]. Por lo tanto, JNK y p38 se agrupan juntas y se les refiere como proteínas cinasas activadas por estrés (SAPK) [38]. Las MAPKs se activan por fosforilación dual en residuos de treonina y tirosina dentro del motivo conservado Thr-X-Tyr en el loop de activación, por ejemplo, JNK y p38 tienen los motivos Thr-Pro-Tyr y Thr-Gly-Tyr, respectivamente. JNK es un sustrato de MKK4/SEK1 y MKK7, y p38 es sustrato de MKK3, MKK4 y MKK6 [38].

ASK1, también llamada MAPKKK5 o MAP3K5, es una de las MAP3Ks identificadas en las vías de JNK y p38 [40, 41]. ASK1 se activa por varios estresantes, incluyendo estrés oxidativo, estrés del retículo endoplásmico (RE) e incremento en la concentración de calcio, así como por señales inflamatorias mediadas por receptor, tales como TNF y lipopolisacáridos (LPS) [42-45]. La expresión exógena de ASK1 silvestre o ASK1 constitutivamente activa induce muerte en varios tipos celulares, principalmente a través de la activación de caspasas dependientes de la mitocondria [42, 46, 47]. Células deficientes de ASK1 son resistentes a la muerte celular inducida por estrés oxidativo, TNF y estrés del RE, sugiriendo que ASK1 es un componente fundamental en la muerte celular inducida por estrés [43, 48]. Estudios previos también sugieren que ASK1 media la supervivencia y diferenciación, probablemente dependiendo del contexto celular [49, 50]. Por tanto, ASK1 parece ser un componente fundamental en un amplio rango de actividades biológicas. Finalmente, las vías de las MAPKs activadas por estrés influyen sobre la expresión de proteínas pro- y antiapoptóticas, tales como el ligando Fas y proteínas de la familia Bcl-2, a través de la activación de factores de transcripción como c-Jun y p53. También regulan las funciones de varios factores pro- y antiapoptóticos, tales como caspasas, otras cinasas y proteínas de la familia Bcl-2, a través de fosforilaciones directas [38].

En particular, en neuronas granulares de cerebelo (NGC), se sabe que la estaurosporina (Sts) y la privación de potasio alto (K5) inducen la muerte de estas neuronas [51, 52]. Se ha encontrado que K5 activa tanto a la vía de JNK como a la de p38, mientras que Sts sólo activa a la vía de p38 en NGC. La muerte apoptótica de NGC inducida por K5 está mediada por la vía ASK1-JNK-cJun y ASK1-p38-ATF2, mientras que la muerte apoptótica inducida por Sts en NGC sólo está mediada por la vía ASK1-p38-ATF2 [51, 52]. Tanto en K5 como en Sts se induce la generación de ROS, la cual es transitoria y ocurre en tres diferentes tiempos: a los 15 minutos, 30-45 minutos y alrededor de las 4 horas, después del estímulo de muerte [51, 53]. En este sentido, en la muerte apoptótica de NGC inducida por K5 las ROS

actúan río arriba de la activación de ASK1 [51, 52], mientras que en la muerte apoptótica inducida por Sts las ROS generadas por Sts actúan a un diferente nivel [52].

1.3.2. ASK1 en la muerte celular inducida por estrés oxidativo

ASK1 es blanco central de muchas proteínas relacionadas con la supervivencia, las cuales se unen a diferentes dominios de ASK1. La tioredoxina (Trx) y la glutaredoxina (Grx) forman parte de este grupo de proteínas. Trx se une al dominio N-terminal de ASK1, mientras que la Grx lo hace en el C-terminal de esta cinasa, lo que inhibe la actividad de ASK1 [36-38]. Se ha propuesto que ASK1 regula las vías apoptóticas extrínseca e intrínseca y la independiente de caspasas, las cuales son inducidas por condiciones como la estimulación de receptores de muerte, agentes de daño al DNA, estrés oxidativo y estrés del retículo endoplásmico [35]. La vía apoptótica intrínseca modulada por ASK1 involucra la fragmentación de Bid, translocación de Bax a la mitocondria, liberación de citocromo c de la mitocondria y activación de caspasa 9 y 3 [15]. Aunque ASK1 participa en proliferación, diferenciación y supervivencia celular en varios tipos celulares, su papel en la apoptosis ha sido el más ampliamente caracterizado [43, 47, 54, 55]. Por otro lado, ASK1 se expresa en el citosol y en la mitocondria [56]. Es interesante notar que el papel de las tioredoxinas y glutaredoxinas en la señalización redox no se limita a su participación en reacciones de óxido-reducción, sino también a las interacciones proteína-proteína las cuales están reguladas por el estado redox de las cisteínas de su sitio activo.

Las proteínas de ASK1 de humano y ratón consisten de 1374 y 1380 aminoácidos, respectivamente, y cada una posee un dominio de cinasa de serina/treonina en su porción media flanqueado por dominios reguladores N- y C-terminal [57]. Se ha reportado que la activación de ASK1 está estrechamente regulada por la fosforilación de un residuo de treonina dentro del segmento de activación en el dominio de cinasa de ASK1 (Thr838 y Thr845 de ASK1 de humano y de ratón, respectivamente), así el anticuerpo que reconoce la fosforilación en este residuo de treonina, monitorea el estado de activación de ASK1 [58]. Consistente con los descubrimientos de que se requiere la homo-oligomerización a través del dominio coiled-coil C-terminal (CCC) para la activación de ASK1 [58], se ha mostrado que ASK1 forma un complejo de alto peso molecular (1500-2000 kDa) que incluye otras proteínas reguladoras [59, 60]. Este complejo forma parte del señalosoma ASK1 que parece servir como plataforma para la regulación de la actividad basal y activación de ASK1 inducida por estrés (Figura 3) [59, 60].

Entre las proteínas que interactúan con ASK1, Trx1 fue la primera identificada y ahora se sabe que juega un rol crítico en la regulación de la actividad de ASK1 [42]. Trx1 inhibe la actividad cinasa de ASK1 por unión directa a su región N-terminal. Trx1 tiene un sitio activo redox, en el cual dos residuos de cisteína

(Cys32 y Cys35) proveen los grupos tioles que participan en la actividad reductora dependiente de Trx1. Sólo la forma reducida [Trx-(SH)₂], y no la forma oxidada (Trx-S₂) o un mutante del sitio activo redox de Trx1, se une a ASK1. Por tanto, la actividad de ASK1 depende del estado redox de Trx1 [42, 61]. Las ROS como el H₂O₂ disocian Trx1 de ASK1 y de esta manera activan ASK1 al inducir la fosforilación de su residuo de treonina crítico [42, 61].

Se ha encontrado que Trx1 no interrumpe la interacción homofílica de ASK1 a través de su dominio CCC, el cual se requiere para la actividad basal de ASK1. En cambio, Trx1 inhibe la interacción homofílica a través del dominio coiled-coil N-terminal (NCC) de ASK1 [62]. Ya que se requiere el dominio NCC para la activación total de ASK1 inducida por ROS, ASK1 parece estar estrechamente oligomerizada a través de sus dominios NCC cuando se activa bajo la disociación de Trx1 de ASK1 dependiente de ROS. En respuesta a H₂O₂, el señalosoma ASK1 forma un complejo de peso molecular más alto (<3000 kDa) debido al reclutamiento de 2 miembros de la familia TRAF, el factor 2 asociado al receptor de TNF (TRAF2) y TRAF6, de una manera dependiente de ROS [60, 63].

En fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) deficientes en TRAF6, el señalosoma ASK1 no cambia de peso molecular y se suprime marcadamente la activación de ASK1 en presencia de H₂O₂, sugiriendo que se requiere TRAF6 para la activación del señalosoma ASK1 por las ROS [61]. Estas investigaciones sugieren que después de la disociación de Trx1 del señalosoma ASK1 por acción de las ROS, es necesario el reclutamiento recíproco de TRAF2 y TRAF6, al menos para la facilitación efectiva de la interacción homofílica a través del dominio NCC, siendo éste un prerrequisito para la configuración activa del señalosoma ASK1.

Las proteínas 14-3-3 también regulan negativamente a ASK1. Estas proteínas se unen a ASK1 a través del sitio que incluye a la Ser967 cuando se fosforila la Ser967 de ASK1 en estado basal [64]. Las ROS inducen la defosforilación de ASK1, resultando en la disociación de las proteínas 14-3-3 de ASK1 y activación de ASK1 [64, 65] (Figura 3). ASK1 también se regula por el sistema ubiquitina-proteosoma bajo estrés oxidativo [66]. Ha sido reportado que la peptidasa 9 específica de ubiquitina, ligada al cromosoma X (USP9X) se une a ASK1 y la desubiquitina en respuesta a estrés oxidativo, resultando en la estabilización de ASK1. La activación de ASK1 inducida por estrés oxidativo se suprimió en células con el knockdown de USP9X, sugiriendo que USP9X contribuye a la activación sostenida de ASK1 bajo estrés oxidativo [66]. Aunque ASK1 forma homo-oligómeros, considerando el alto peso molecular del señalosoma ASK1, es posible que este señalosoma pueda contener otros componentes desconocidos involucrados en la regulación de ASK1 [67] (Figura 3).

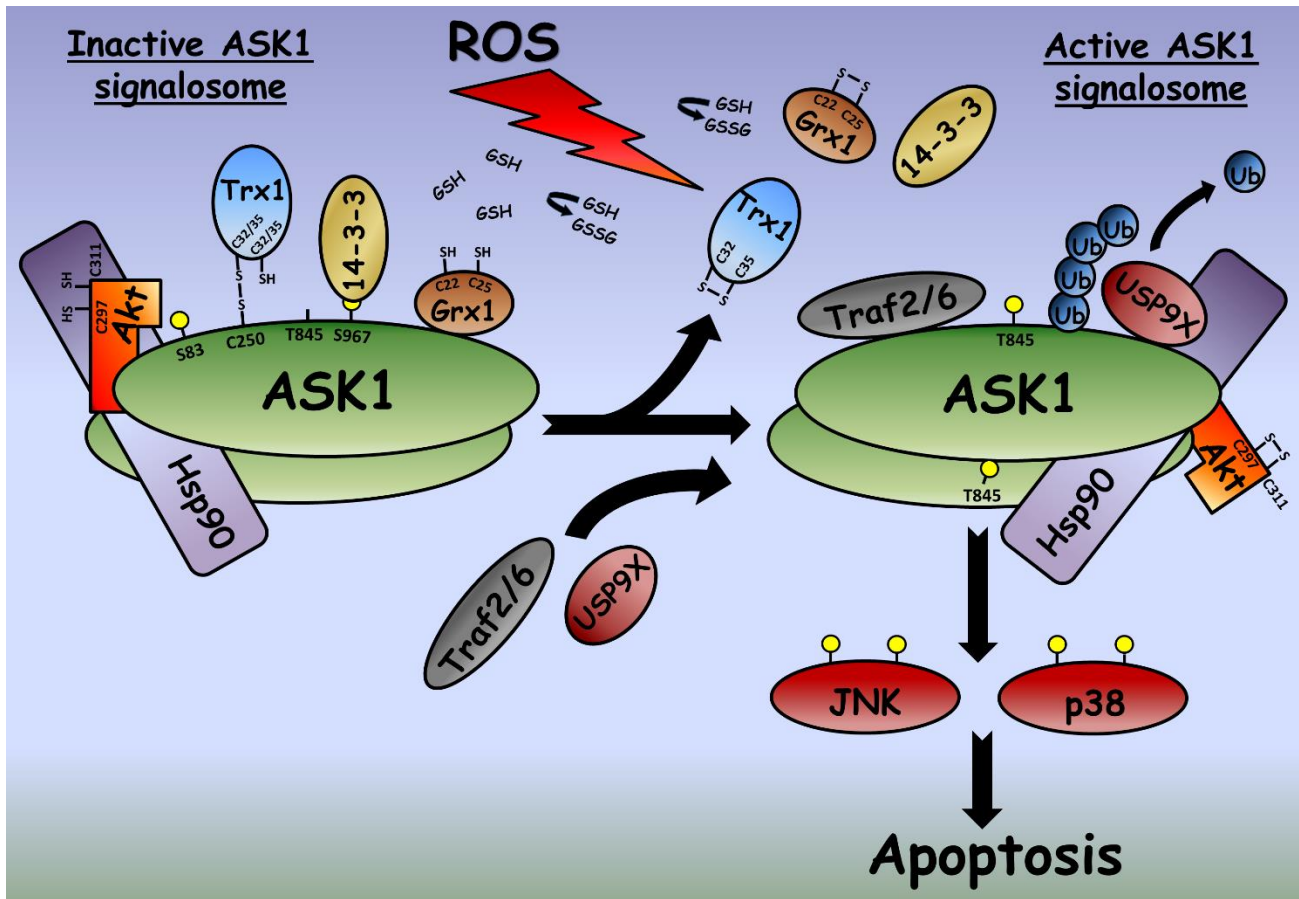


Figura 3. Las ROS inducen la activación de ASK1 a través de sus reguladores sensibles redox. En condiciones basales ASK1 forma homo-oligómeros a través de sus dominios CCC, y se le unen a cada monómero Trx1, Grx1, las proteínas 14-3-3, Akt y HSP90, los cuales regulan negativamente la activación de ASK1, formándose el señalosoma de ASK1 inactivo. HSP90 funciona como “scaffold” para mantener unido Akt reducido con ASK1, permitiendo que Akt fosforile la Ser83 de ASK1 y estimule su inactivación. Trx1 forma un puente disulfuro intermolecular con la Cys250 de ASK1, Grx1 se une en el C-terminal y las proteínas 14-3-3 se unen en la Ser967 fosforilada de ASK1. En respuesta a la generación de ROS, Trx1, Grx1 y las proteínas 14-3-3 se disocian de ASK1, HSP90 y Akt sufren un rearrreglo conformacional con respecto a ASK1, lo cual aleja físicamente a Akt de ASK1 impidiendo que la fosforile y la siga inactivando, además de que Akt se inactiva al generarse un puente disulfuro intramolecular entre las Cys297 y Cys311. Mientras tanto, TRAF2 y/o TRAF6 se unen a ASK1, lo cual resulta en la interacción homofílica entre las dos proteínas de ASK1 a través de sus NCC, permitiendo que se produzca la autofosforilación en la T845 de ASK1. Cuando se forma el señalosoma de ASK1 activo también se une la enzima USP9X, la cual estabiliza a ASK1 activo al evitar su degradación proteosómica por desubiquitinación. Una vez que ASK1 está totalmente activo, fosforila a MAPKK, las cuales a su vez fosforilan a las MAPK JNK y p38, induciendo apoptosis celular. Tomado de [1].

Por otro lado, la ASK1 puede ser fosforilada en varios sitios, regulando así su actividad de manera positiva o negativa [59]. En este sentido, se sabe que la cinasa Akt fosforila directamente a ASK1 en la serina 83 (Ser83) lo que lleva a la inhibición de la apoptosis. De igual manera, la inhibición de Akt

(utilizando inhibidores de PI3K) induce la activación de las MAPKs p38 y JNK [68]. Se ha reportado que la activación de Akt inducida por EGF o angiotensina está mediada por ROS, sugiriendo que Akt es sensible al estado redox [69, 70]. Wang Min y colegas [71] han propuesto el siguiente modelo de regulación de Akt sobre ASK1 para controlar la apoptosis: HSP90 y Akt forman un complejo con ASK1 en células en condiciones basales para retener a ASK1 en un estado inactivo. HSP90, a través de su dominio central, se une a Akt y ASK1, y permite que Akt se encuentre en cercanía con el dominio N-terminal de ASK1 para fosforilarlo en la Ser83.

En respuesta a un estímulo apoptótico como el H_2O_2 , el complejo ternario HSP90-Akt-ASK1 se vuelve más estable, debido a que Akt se mueve al dominio C-terminal de ASK1, lo cual provoca una disminución de la fosforilación de la Ser83 y posterior activación de ASK1 que activa las vías p38 y/o JNK llevando a la apoptosis. En este modelo, HSP90 serviría como una proteína scaffold para mantener a Akt y ASK1 en proximidad. A diferencia de Trx y Grx, el complejo HSP90-Akt no se disocia de ASK1 en respuesta a estímulos de estrés oxidativo, sino que sólo sufre un cambio conformacional que lo desplaza al carboxilo terminal [71]. Como vemos, la regulación redox de ASK1 es muy compleja debido al gran número de proteínas que participan tanto en su activación como en su inhibición (Figura 3).

1.3.3. Sistema de la tiorredoxina

El sistema de la tiorredoxina, compuesto de NADPH, tiorredoxina reductasa (TrxR) y Trx, es un sistema antioxidante clave en la defensa contra el estrés oxidativo a través de su actividad reductasa de disulfuros regulando el balance ditiol/disulfuro (oxidado/reducido) de diversas proteínas. Este sistema proporciona los electrones a las peroxirredoxinas para eliminar las especies reactivas del oxígeno y nitrógeno con una tasa de reacción rápida [72]. En las células de mamíferos, los sistemas Trx1 citosólico y Trx2 mitocondrial son las principales reductasas de disulfuros, los cuales suministran electrones a las enzimas para la proliferación y viabilidad celular. Como se había mencionado anteriormente, la forma reducida de las Trxs se une a la ASK1 e inhibe su actividad para prevenir la apoptosis inducida por estrés oxidativo. Cuando Trx se oxida, se disocia de ASK1 y se estimula la apoptosis. Además, la unión de Trx con su inhibidor TXNIP también contribuye al proceso de apoptosis removiendo Trx de ASK1. Es decir, el sistema de la tiorredoxina es fundamental para mantener el equilibrio redox celular y la función antioxidante, incluido el control del estrés oxidativo y la muerte celular [73].

La actividad reductora de tioles que caracteriza a Trx1 se debe a las cisteínas 32 (Cys32) y 35 (Cys35), las cuales forman un motivo CGPC catalítico redox [42, 74], mientras que la isoforma mitocondrial (Trx2),

contiene a la Cys90 y a la Cys93 [56]. La prolina en el motivo CGPC es el residuo clave que determina el poder reductor de Trx1 y el reemplazarlo por una serina o una treonina provoca cambios notables en las propiedades redox de la proteína así como en la estabilidad entre la forma oxidada o reducida de la tiorredoxina [75]. La Cys250 en el N-terminal de ASK1 es la que se une a Trx1 y sólo una de sus cisteínas reactivas (Cys32 o Cys35) es crítica para la unión a ASK1, es decir, se propone que la Cys250 de ASK1 se une a la Cys32 o a la Cys35 de Trx1 mediante un puente disulfuro intermolecular, el cual se rompe por ROS [56, 76]. La Cys30 en el dominio N-terminal de ASK1 es la que interacciona con Trx2, y se propone que esta Cys30 de ASK1 forma un puente disulfuro intermolecular con la Cys90 de Trx2 [56].

TXNIP es una proteína redox expresada de manera ubicua que promueve apoptosis. También se le conoce como VDUP1 (vitamin D3 up-regulated protein-1) o TBP2 (thioredoxin-binding protein-2) y es el principal regulador negativo de Trx [77]. Se ha mostrado que TXNIP en estado oxidado contiene un puente disulfuro intramolecular entre la Cys63 y la Cys247 que permite la interacción con Trx en estado reducido mediante una reacción que permite el intercambio del disulfuro donde la Cys247 es la que se une a la Cys32 de Trx [78], formándose un puente disulfuro intermolecular estable entre estas dos proteínas; dicha propiedad de unión a Trx es particular de TXNIP [78]. Bajo estrés oxidativo TXNIP y Trx se encontrarían en estado oxidado y la presencia de enzimas antioxidantes puede provocar que Trx regrese a su estado reducido, lo cual promovería la unión de TXNIP con Trx. Y bajo este esquema, la reducción de TXNIP o la oxidación de Trx podrían prevenir esta interacción.

La interacción entre Trx1 y ASK1 se regula principalmente por la unión de TXNIP a las cisteínas catalíticas de Trx1, lo cual inhibe por un lado, la actividad de Trx1 y por otro, la habilidad de Trx1 para unirse a ASK1 [79]. En un reciente reporte [80] se hicieron estudios estructurales de la interacción entre Trx y TXNIP, mostrando que la inhibición de Trx por TXNIP se inicia por una interacción transitoria entre la Trx y el puente disulfuro Cys63-Cys247 que se forma entre moléculas de TXNIP, y dicha interacción transitoria resulta en la interacción intermolecular estable entre la Cys32 de Trx y la Cys247 de TXNIP que se observa en el complejo entre estas dos proteínas. Esto explica cómo es que se puede presentar un puente disulfuro intramolecular entre las Cys63 y Cys247 (si topológicamente están alejadas una de la otra) de TXNIP para luego formar el puente disulfuro intermolecular entre la Cys32 de Trx y la Cys247 de TXNIP. Este grupo también demuestra que las ROS pueden reaccionar con el puente disulfuro intermolecular entre la Cys32 de Trx y la Cys247 de TXNIP. Ellos proponen el siguiente mecanismo de interacción entre Trx y TXNIP: En condiciones sin estrés oxidativo, TXNIP se une a Trx a través de un puente disulfuro intermolecular que se forma entre la Cys247 de TXNIP y la Cys32 de Trx, inhibiendo su actividad reductora.

Durante un estrés oxidativo, altos niveles de ROS pueden causar una oxidación posterior de este puente y llevar a la disociación de estas proteínas. Después de la restauración de un potencial redox reductor (originado por vías antioxidantes activadas por ROS), las cisteínas reactivas de Trx pueden interactuar con el puente disulfuro transitorio formado entre la Cys63 y la Cys247 de dos proteínas de TXNIP. Posteriormente las moléculas de TXNIP sufren un rearrreglo estructural que involucra, el intercambio del puente disulfuro anterior para formar ahora uno entre la Cys63 y la Cys190 de las dos proteínas de TXNIP, culminando en la formación de novo del puente disulfuro intermolecular entre la Cys32 de Trx y la Cys247 de TXNIP [80].

Recientemente se ha propuesto el concepto de “redoxisoma” para referirse al complejo Trx-TXNIP como un transductor de señales relativo al estado redox [81], con el fin de destacar la relevancia de este complejo de señalización dependiente del estado redox tanto en condiciones normales como patológicas.

En lo referente al sistema nervioso, en particular a las neuronas granulares de cerebelo, se ha descrito que el gen de TXNIP pertenece a los genes de respuesta temprana en la apoptosis neuronal cuya expresión está directamente regulada por el flujo de calcio [82]. Por ello, es posible que TXNIP regule la vía de las MAPKs formando una red compleja de transducción de señales en la apoptosis neuronal [79, 83, 84].

1.3.4. Regulación redox de Akt

Akt (o proteína cinasa B) es una cinasa de serina treonina, el cual es un mediador crítico de la supervivencia celular [85, 86]. Akt fosforila a varias proteínas proapoptóticas incluyendo a la cinasa de la sintasa de glucógeno 3 (GSK 3), BAD, caspasa 9 y los factores de transcripción Forkhead (FOXO) para suprimir sus actividades proapoptóticas [87-90]. Bajo activación de PI3K en respuesta a estímulos de crecimiento/supervivencia, Akt, vía su dominio PH, se dirige a la membrana celular, donde es fosforilada por PDK1 en la Ser473 y PDK2 en la Thr308 [91]. Por el contrario, la inhibición de PI3K con inhibidores tales como el LY 294002 bloquea la fosforilación de Akt llevando a apoptosis. Además, se sabe que Akt se regula por unión a la proteína chaperona celular HSP90, la cual mantiene la estabilidad y actividad de Akt [92, 93]. Varios estudios han mostrado que Akt es una cinasa sensible redox y que la modificación oxidativa de las cisteínas reactivas de Akt tiene relevancia en su actividad [94-97].

Murata *et al.* reportaron que la exposición a H₂O₂ de células cardíacas causó la formación de un puente disulfuro intramolecular entre las cisteínas 297 (Cys297) y 311 (Cys311) del dominio cinasa de Akt, cisteínas conservadas en las tres isoformas de Akt, lo cual provoca su desfosforilación. Utilizando mutagenesis dirigida (site-directed mutagenesis) de estas cisteínas en Akt, ellos muestran que este puente disulfuro dirige las proteínas de Akt hacia degradación proteosomal [94]. Se ha mostrado que la estimulación con PDGF induce generación de ROS en células del músculo liso de rata, sugiriendo que el H₂O₂ puede transmitir señales redox para regular señalización fisiológica en respuesta a factores de crecimiento [98]. De manera interesante, este grupo encuentra que el Akt inactivo se encuentra totalmente en estado oxidado, mientras que el activo está tanto parcialmente oxidado como reducido. En este sentido, recientemente se reportó que las ROS provenientes de NOX1 oxidan a las cisteínas reactivas de Akt promoviendo su interacción con PP2A, la cual la inhibe y por tanto induce apoptosis celular en cardiomiocitos [96]. Este mecanismo ya ha sido estudiado a nivel de sistema nervioso *in vivo*. A saber, en ratones tratados con MPTP (una neurotoxina que entra selectivamente a las neuronas dopaminérgicas) en el mesencéfalo ventral, las cisteínas críticas de Akt se oxidan produciendo casi la mitad de pérdida de Akt en su estado reducido, lo que aumenta su asociación con la fosfatasa PP2A, y por tanto, disminuyen los niveles de Akt activo (fosforilado). El uso de antioxidantes revierte todos estos efectos y favorece la activación de Akt [97]. Lo anterior muestra que la modificación redox de cisteínas críticas en Akt es relevante para mantener su fosforilación en el mesencéfalo de ratón. Al sobreexpresar a Grx1 en neuronas primarias derivadas de células progenitoras humanas se mantiene el estado reducido de Akt y se inhibió la pérdida de fosforilación mediada por MPP⁺ (el metabolito tóxico del MPTP) [97], indicando que el mantenimiento de la homeostasis redox por la sobreexpresión de Grx1 puede preservar los niveles de Akt fosforilado.

Recientemente se reportó que las ROS inducidas por PDGF provocan la oxidación de la cisteína 124 (Cys124) de Akt2, cisteína no conservada en Akt1 y Akt3, modulando su inactivación; dicha regulación redox de Akt2 participa en el consumo de glucosa inducido por PDGF. Sus resultados apuntan a Cys124-Cys297 y Cys124-Cys311 como potenciales puentes disulfuro intramoleculares responsables de la inhibición de Akt2 por oxidación [95]. Interesantemente, observaron que al suministrar H₂O₂ de manera exógena se indujo la activación por fosforilación de Akt1 y Akt2, pero la acumulación intracelular de H₂O₂ resultó en la inactivación sólo de Akt2 por oxidación, mostrando un efecto específico del origen de las ROS sobre las isoformas de Akt. Ellos proponen un modelo en el cual la activación de Akt2 se da por fosforilación y la oxidación cambiaría este nivel de activación con resultado neto a la baja. Esto destaca que la señalización de Akt puede inhibirse a concentraciones fisiológicas de ROS con consecuencias funcionales sobre procesos celulares y moleculares inducidos por PDGF [95], además de mostrar el

grado de especificidad que se logra en la señalización redox a nivel de la discriminación entre diferentes isoformas de Akt basada en la localización relativa de las cisteínas que son susceptibles de ser oxidadas.

La inactivación reversible de PTEN, inhibidor de la vía PI3K/Akt, se ha descrito en estudios en donde se usa H_2O_2 o ROS producidas por la NADPH Oxidasa en macrófagos [99, 100]. Se ha reportado que Trx1 en estado reducido se une directamente a PTEN de una manera dependiente redox para inhibir su actividad de fosfatasa de PIP_3 , lo cual resulta en un aumento en la actividad de Akt [101]. A través de sus dominios PH (dominios de homología a pleckstrina) Akt se une a PIP_3 , lo cual permite que PDK1 fosforile la Thr308 y PDK2, la Ser473, llevando a la activación total de Akt. En este sentido, se propone que en condiciones basales PTEN está activo, entonces lleva a cabo la desfosforilación de PIP_3 lo cual genera PIP_2 , y por tanto, una actividad reducida de Akt. Bajo estrés oxidativo, Trx1 se une a PTEN evitando que PTEN desfosforile a PIP_3 llevando a una activación constitutiva de Akt, y por tanto a señales antiapoptóticas. Como se mencionó anteriormente, bajo estrés oxidativo Trx1 se oxida disociándose de ASK1 y se sabe que se requiere la TrxR1 para mantener a Trx1 en su estado reducido, por ello cabe la posibilidad de que esta Trx1, una vez reducida, ahora se una a PTEN generando señales de supervivencia para contrarrestar las señales apoptóticas desencadenadas por ASK1 [1, 101].

1.4. Vía de señalización mitocondrial TXNIP-Trx2-ASK1

La proteína que interactúa con la tiorredoxina TXNIP, también conocida como VDUP1 [102] o TBP-2, se une a Trx1 y de esta manera la regula negativamente, además de controlar el estado redox celular [78, 79, 103-105]. Como se mencionó anteriormente, Trx1 es una proteína redox con importantes funciones antioxidantes y de señalización celular que sufre oxidación reversible de sus dos residuos de cisteína en el sitio activo, cuya reducción la cataliza la tiorredoxina reductasa [79, 103, 104, 106]. La expresión de TXNIP es ubicua y se induce por una variedad de estresantes, incluyendo luz UV, rayos γ , choque térmico y H_2O_2 [79, 107], además de glucosa [108, 109]. La sobreexpresión de TXNIP hace a las células más susceptibles al estrés oxidativo y promueve apoptosis [84, 109-111].

Aunque la mayoría de los estudios se han enfocado en la interacción entre Trx1 y ASK1 citosólico, se sabe, en células endoteliales, que la isoforma mitocondrial de la tiorredoxina (Trx2) también interacciona con ASK1 mitocondrial, inhibe su actividad y previene apoptosis inducida por ASK1 [56, 112]. Se ha mostrado que Trx2 tiene un papel crítico en controlar el estrés oxidativo mitocondrial inducido por ROS y la apoptosis dependiente de la mitocondria [113]. De esta manera Trx2 ayuda a reparar el daño oxidativo de proteínas al reducir los puentes disulfuro que se forman por la oxidación de cisteínas. A

diferencia de Trx1, Trx2 regula específicamente una vía apoptótica intrínseca independiente de JNK en células del endotelio vascular, sugiriendo que Trx1 y Trx2 controlan apoptosis al modular diferentes vías de señalización río abajo [56].

En células beta pancreáticas, se identificó originalmente a TXNIP como el gen que se indujo de manera más dramática por glucosa en un estudio de microarreglos del islote humano [114] y se mostró que TXNIP es esencial para la apoptosis de las células beta inducida por glucotoxicidad [115]. Interesantemente, TXNIP induce apoptosis de células beta a través de la vía intrínseca mitocondrial [115]. Se ha reportado que la deficiencia de TXNIP protege de la diabetes tipo 1 y 2 al inhibir la apoptosis de las células beta pancreáticas y mantener su masa y función [116]. En este sentido, en células beta pancreáticas de ratón, se ha descrito que TXNIP se localiza predominantemente en el núcleo en condiciones basales y que ASK1 está unido a Trx2 en la mitocondria y de esta manera Trx2 mantiene inactivo a ASK1, permitiendo la supervivencia de estas células. Sin embargo, en respuesta a estrés oxidativo, TXNIP transloca del núcleo a la mitocondria donde forma un complejo con Trx2, removiendo Trx2 de ASK1, y por tanto eliminando la unión entre estas dos proteínas. Al desaparecer la inhibición de ASK1 mediada por Trx2, ocurre una activación de ASK1, liberación de citocromo c, activación de caspasa 3 y apoptosis [77]. En este estudio, se describió por primera vez la existencia de la cascada de señalización mitocondrial sensible al estado redox TXNIP-Trx2-ASK1, en la cual TXNIP compete con ASK1 por la unión a Trx2. De esta manera, TXNIP estaría promoviendo la actividad de ASK1 y la apoptosis a través de su interacción directa con Trx2 mitocondrial, inhibiendo su función (Figura 4). La translocación de TXNIP a la mitocondria, inducida por estrés oxidativo, parece encajar bien con el papel que TXNIP juega como un regulador del estado redox celular y la vía de muerte iniciada por la mitocondria [1].

En condiciones basales con niveles fisiológicos de ROS se favorece la formación del complejo TXNIP-Trx1 que transloca del núcleo a la membrana plasmática, activando procesos inflamatorios y promoviendo la supervivencia de células endoteliales. En este contexto, TXNIP actúa como una proteína scaffold (tipo arrestina) para transportar a Trx1 a la membrana plasmática. Se requiere la traslocación de este complejo a la membrana plasmática para llevar a cabo la transactivación del receptor tipo 2 de VEGF (VEGFR2) mediado por H₂O₂, y la posterior activación de ERK1/2. Es decir, el complejo TXNIP-Trx1 actúa como un mediador sensible al estado redox para controlar la señalización de VEGFR2, lo cual promueve supervivencia celular bajo niveles fisiológicos de ROS [117]. Así, TXNIP puede funcionar como un intermediario de la señalización dependiente del compartimento celular, que puede ser un

elemento proapoptótico a altas concentraciones de ROS o una proteína de supervivencia a niveles fisiológicos de ROS (Figura 4).

Aunque se ha estudiado mucho la interacción TXNIP-Trx1, la unión TXNIP-Trx2 sólo ha sido descrita en un solo trabajo [77], aun cuando Trx1 y Trx2 comparten los dos residuos de cisteína críticos en el sitio activo requeridos para su interacción [112, 113, 118]. Se ha observado que Trx2 se oxida fácilmente en respuesta a H₂O₂ o a la sobreexpresión de TXNIP, así como a otros estímulos [112].

Con respecto al sistema nervioso, se sabe que la sobreestimulación de receptores tipo NMDA (NMDAR) es uno de los mecanismos que lleva a la generación de radicales libres tóxicos para las neuronas, los cuales causan daño oxidativo llevando a enfermedades neurodegenerativas [119]. Sin embargo, se ha reportado que los componentes de la actividad sináptica aumentan las defensas antioxidantes (tioredoxina, peroxiredoxina y sulfiredoxina) de las neuronas al activar una serie de eventos transcripcionales. Este grupo [119] encontró que el bloqueo del NMDAR provocó muerte neuronal, el cual estuvo asociado con la carbonilación de proteínas [119, 120]. En principio, la estimulación del NMDAR sináptico activa la vía de PI3K-Akt, y una vez que Akt se activa ésta fosforila al factor de transcripción FOXO en el núcleo, provocando que éste se disocie del promotor de TXNIP (gen blanco de los factores de transcripción FOXO), lo cual estimula la exportación de este factor fuera del núcleo. Y así es como menos transcripción de TXNIP resulta en menos inhibición de Trx, contribuyendo, de esta manera, a neuroprotección contra daño oxidativo [120].

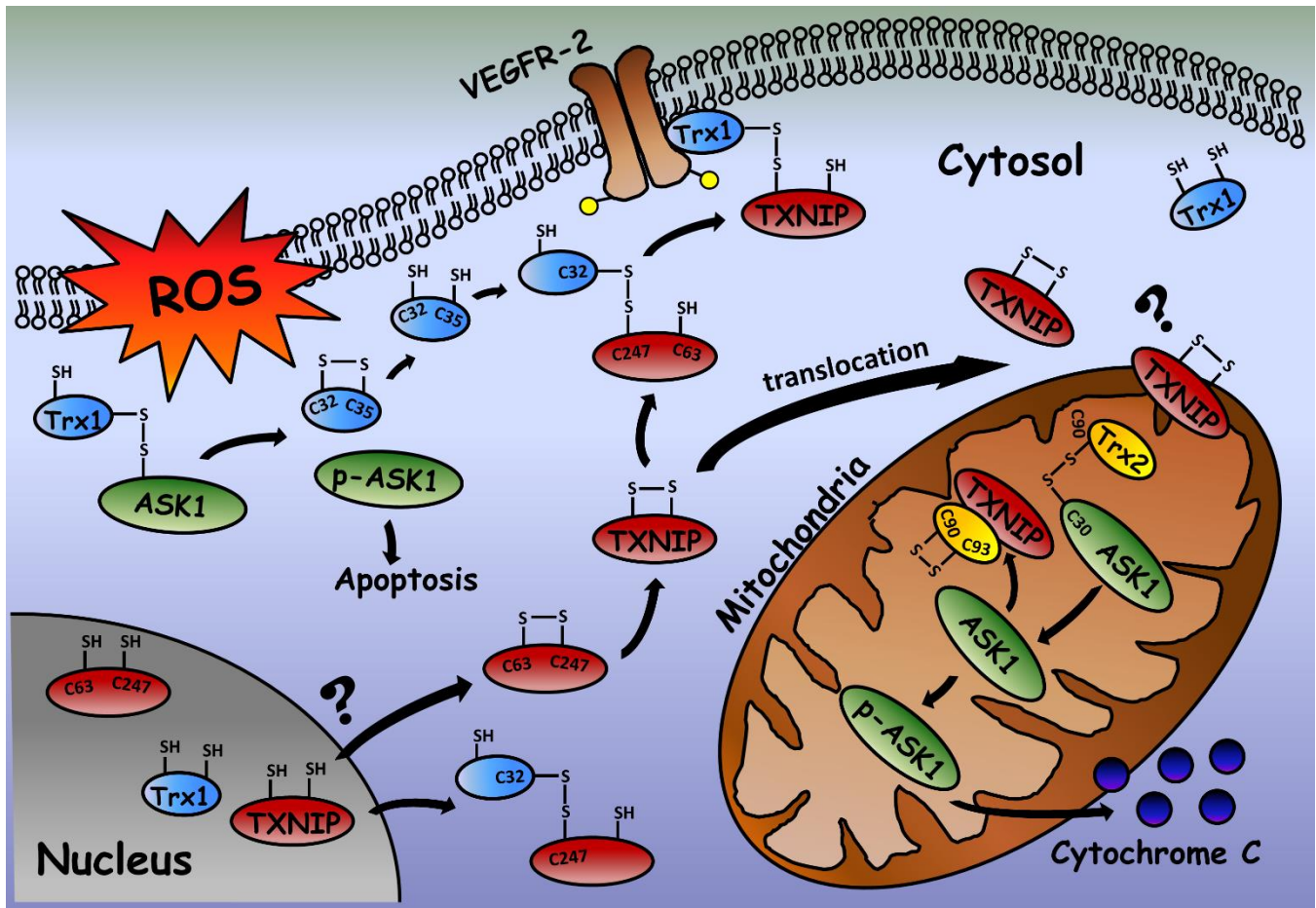


Figura 4. Participación de TXNIP en las cascadas de transducción de señales que promueven supervivencia y muerte celular. En condiciones basales TXNIP se encuentra en el núcleo, mientras que Trx1 se encuentra tanto en el citosol como en el núcleo y Trx2 sólo se localiza en la mitocondria. ASK1 se encuentra tanto en el citosol (interactuando con Trx1 reducido), como en la mitocondria (unido con Trx2 reducido), en estado inactivo. En respuesta a estrés oxidativo, TXNIP trasloca del núcleo a la mitocondria, en donde se une a Trx2, lo cual libera a ASK1 de la inhibición por Trx2 (oxidado ahora), esto permite que ASK1 se active en la mitocondria e induzca señalización que lleva a muerte apoptótica. Mientras tanto Trx1 se oxida y se libera de ASK1, el cual se activa e induce vías de muerte apoptótica. Vías antioxidantes activadas por ROS son capaces de reducir a Trx1 oxidado. Por otro lado, si se generan niveles fisiológicos de ROS, se favorece la unión del complejo TXNIP-Trx1 en el núcleo y en el citosol, este complejo trasloca a la membrana plasmática donde lleva a cabo la transactivación del receptor de VEGFR-2, el cual activa a ERK1/2 mediando supervivencia celular. Tomado de [1].

1.5. Las neuronas granulares de cerebelo como modelo de muerte apoptótica

Las neuronas granulares de cerebelo (NGC) constituyen el tipo neuronal más abundante del sistema nervioso central (SNC) de mamíferos. Durante el desarrollo del cerebelo casi la mitad de las NGC

mueren de forma programada. 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 [121]. Uno de los modelos más estudiados son los cultivos primarios de NGC de rata. Cuando estas células se mantienen en un medio despolarizante con KCl 25 mM (K25) durante 7-8 días in vitro (DIV), y posteriormente se transfieren a un medio que contiene KCl 5 mM (K5) las células mueren en un lapso de 24 a 48 horas con características apoptóticas, incluyendo la activación de caspasas, traslocación de fosfatidilserina, condensación nuclear y liberación de citocromo c [122-126]. Para que las neuronas granulares sobrevivan en cultivo se deben mantener en un medio despolarizante (KCl 25 mM), lo que se cree que mimetiza la acción trófica excitadora de una población glutamatérgica de las fibras musgosas durante un periodo crítico del desarrollo posnatal del cerebelo [127]. Esta condición induce un incremento en los niveles de calcio intracelular, lo que ayuda a promover su sobrevivencia y diferenciación. Existen otras condiciones experimentales utilizadas para inducir apoptosis en el modelo de las NGC como la estaurosporina (Sts), un inhibidor general de proteínas cinasas [128]. Aunque ambos estímulos producen muerte apoptótica en neuronas granulares los mecanismos moleculares parecen ser diferentes: por ejemplo, como ya se dijo el K5 involucra un cambio en los niveles de calcio intracelular [53, 124] mientras que la acción de la Sts es independiente de calcio y activa un grupo distinto de caspasas [128].

2. Planteamiento del problema

El mecanismo mediante el cual las ROS modulan la apoptosis en NGC aún no está suficientemente claro. De acuerdo con estudios previos, las MAP cinasas (MAPKs) JNK y p38 son sensibles al estrés oxidativo en NGC, además de promover la apoptosis. Por otro lado, aún no se conoce el mecanismo por el cual JNK y p38 son activadas en la muerte apoptótica de las NGC. En este sentido, se conoce que un blanco de las ROS es la cinasa ASK1 (una MAP3K río arriba de las vías de JNK y p38), la cual está involucrada en la muerte apoptótica y responde a estrés oxidativo. Al respecto, se sabe que la Trx1 modula la activación de la MAP3K ASK1 en el citoplasma y Trx2 lo hace en la mitocondria. Este sistema se conoce como el sistema de la tiorredoxina, el cual se encuentra tanto en el citoplasma como en la mitocondria y TXNIP es el principal regulador negativo de este sistema.

Se ha demostrado en células no neuronales que, en su estado reducido, la Trx1 está unida a ASK1 en condiciones basales lo que mantiene a ASK1 en estado inactivo, y por ende, no se lleva a cabo la muerte apoptótica. En condiciones oxidantes, Trx1 se disocia de ASK1 permitiendo su activación y por ende la

activación de JNK y p38, lo que conduce a la muerte programada. Aunque la mayoría de los estudios se han enfocado en la interacción entre Trx1 y ASK1 citosólico, se sabe, en células endoteliales, que la isoforma mitocondrial de la tiorredoxina, Trx2, también interacciona con ASK1 mitocondrial, inhibe su actividad y previene apoptosis inducida por ASK1. Se ha mostrado que Trx2 tiene un papel crítico en controlar el estrés oxidativo mitocondrial inducido por ROS y la apoptosis dependiente de la mitocondria. De esta manera, Trx2 ayuda a reparar el daño oxidativo de proteínas al reducir los puentes disulfuro que se forman por la oxidación de cisteínas.

Por otro lado, varios estudios han demostrado que el H₂O₂ regula algunos procesos fisiológicos al modificar la actividad de varias proteínas cinasas y proteínas fosfatasas a través de la oxidación de cisteínas. Además, algunas proteínas regulan el estado redox de otras proteínas que están involucradas en el control de los niveles oxidativos en la célula, además de la activación/inactivación de múltiples vías de señalización. Este es el caso de TXNIP, la cual se une y regula negativamente a Trx1 y Trx2, tiorredoxinas que controlan el estado redox celular, y protegen a las células contra la acción dañina de las ROS, incluyendo la muerte celular.

En células beta pancreáticas de ratón, se ha descrito que TXNIP se localiza predominantemente en el núcleo en condiciones basales y que ASK1 está unido a Trx2 en la mitocondria y de esta manera Trx2 mantiene inactivo a ASK1, permitiendo la supervivencia de estas células. Sin embargo, en respuesta a estrés oxidativo, TXNIP transloca del núcleo a la mitocondria donde forma un complejo con Trx2, removiendo Trx2 de ASK1, y por tanto eliminando la unión entre estas dos proteínas. Al desaparecer la inhibición de ASK1 mediada por Trx2, ocurre una activación de ASK1, liberación de citocromo c, activación de caspasa 3 y apoptosis. En esta cascada de señalización mitocondrial sensible al estado redox, TXNIP-Trx2-ASK1, TXNIP compite con ASK1 por la unión a Trx2. De esta manera, TXNIP estaría promoviendo la actividad de ASK1 y la apoptosis a través de su interacción directa con Trx2 mitocondrial, inhibiendo su función. La translocación de TXNIP a la mitocondria, inducida por estrés oxidativo, parece encajar bien con el papel que TXNIP juega como un regulador del estado redox celular y la vía de muerte mitocondrial.

Se ha observado que células que sobreexpresan TXNIP son más susceptibles al estrés oxidativo y a la apoptosis. Por otro lado, ha sido reportado que la vía de señalización PI3K/Akt regula la expresión de TXNIP. En células cancerosas, se ha sugerido que la activación de la vía de PI3K/Akt lleva a una regulación a la baja de TXNIP a nivel transcripcional, y viceversa, la inhibición de esta vía incrementa la expresión de TXNIP. Akt es una proteína cinasa involucrada en diferentes procesos fisiológicos tales como proliferación, migración y apoptosis, regula algunos miembros de la familia Bcl-2 e, indirectamente, controla la apoptosis a través de factores de transcripción que median eventos apoptóticos. Varios

estudios han mostrado que la actividad de Akt puede ser directamente modificada por ROS. Por ejemplo, se ha encontrado que el MPTP, una neurotoxina que selectivamente daña a las neuronas dopaminérgicas, induce oxidación de cisteínas específicas en Akt, lo cual incrementa su asociación con la fosfatasa PP2A, reduciendo su nivel de fosforilación. La presencia de antioxidantes revierte totalmente estos efectos y reduce la toxicidad por MPTP. Estos estudios sugieren que Akt es una proteína sensible redox, una condición que puede modular su participación en la supervivencia celular.

Las neuronas son susceptibles al daño oxidativo debido a sus altos niveles de producción de ROS y relativamente bajos niveles de enzimas antioxidantes. Puesto que TXNIP juega un papel muy importante en el estado redox celular, investigamos la posibilidad de que diferentes condiciones apoptóticas que inducen la generación de ROS podrían regular la expresión de TXNIP, además de la actividad de Akt en NGC. Con base en estos estudios, un posible escenario en las NGC es que las ROS generadas tempranamente por condiciones apoptóticas modulen el estado de activación de la vía de PI3K/Akt, lo cual permitiría la participación de TXNIP en la maquinaria de muerte al inhibir el sistema antioxidante de la tiorredoxina en diferentes compartimentos de la neurona permitiendo de esta forma que la cinasa pro-apoptótica ASK1 se pueda activar conduciendo a la muerte apoptótica neuronal. En cualquier caso, el mecanismo molecular preciso de regulación de Akt, TXNIP, Trx1, Trx2 y ASK1 durante la muerte apoptótica de NGC aún no ha sido explorado, por lo que su estudio contribuiría al conocimiento de los mecanismos de muerte apoptótica. El presente trabajo, es un aporte al conocimiento científico en el cual se busca aclarar el papel que juegan las ROS como reguladores de la muerte apoptótica neuronal y que, en última instancia, participan en la fisiología y patología del sistema nervioso.

3. Hipótesis

Las ROS actúan como una señal para regular vías de señalización que controlan a las proteínas del sistema de la tiorredoxina y a la MAP cinasa ASK1, lo cual regula a la muerte apoptótica de las neuronas granulares de cerebelo.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Conocer el papel de las ROS como una señal temprana en la activación de las vías de señalización que involucran el sistema de la tiorredoxina (TXNIP, Trx1 y Trx2) y el de la cinasa ASK1, durante la muerte neuronal.

4.2. Objetivos particulares

- 1) Evaluar la expresión basal de Akt, Trx1, Trx2 y TXNIP en NGC.
- 2) Medir el efecto de las ROS producidas por K5 y Sts a tiempos tempranos sobre la activación de Akt.
- 3) Investigar el papel de la activación de Akt en la muerte apoptótica de las NGC.
- 4) Evaluar el efecto de condiciones oxidantes sobre la activación de Akt.
- 5) Medir el efecto de las ROS producidas por K5 y Sts a tiempos tempranos sobre la expresión de TXNIP.
- 6) Evaluar el efecto de condiciones oxidantes sobre la expresión de TXNIP.
- 7) Determinar la relación entre la vía de señalización de Akt y la expresión de TXNIP.
- 8) Medir el efecto de las ROS producidas por K5 y Sts a tiempos tempranos sobre la activación de la MAP cinasa ASK1.
- 9) Medir el efecto de las ROS producidas por K5 y Sts a tiempos tempranos sobre la unión TXNIP-Trx2, y analizar su participación en la muerte apoptótica.
- 10) Medir el efecto de las ROS producidas por K5 y Sts a tiempos tempranos sobre la unión Trx2-ASK1, y analizar su participación en la muerte apoptótica.

5. Métodos

5.1. Modelo experimental

Las neuronas granulares de cerebelo (NGC) aisladas en cultivo se emplean ampliamente como un modelo de apoptosis. Se sabe que las NGC de rata mueren cuando se mantienen *in vitro* por más de 5 DIV con concentraciones fisiológicas de potasio [K⁺] (3.5–5 mM), bajo condiciones no despolarizantes (K5). Para evitar esta situación, las NGC se cultivan en concentraciones altas de potasio [K⁺] (25 mM); bajo despolarización sostenida (K25) y al cambiar a un medio con K5 (privación de potasio) o viceversa es posible alterar la supervivencia celular y evaluar la expresión génica, maduración neuroquímica y otras características fisiológicas de estas células [129].

Por otra parte, se ha mostrado que la estaurosporina (Sts) induce muerte apoptótica en una amplia variedad de tipos celulares. Se cree que las proteínas que se requieren para llevar a cabo la muerte celular programada inducida por la estaurosporina están constitutivamente presentes en todas las células nucleadas de mamíferos [130]. La estaurosporina induce la muerte apoptótica en el rango de 0.2–1 μM [131, 132], y se le ha reconocido como un modelo muy útil para investigar el mecanismo de la apoptosis en las células de mamíferos. Con base en estos estudios, en el presente trabajo empleamos ambas condiciones (privación de potasio y estaurosporina) como inductores de muerte apoptótica.

5.2. Cultivos primarios de NGC

Se realizaron cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelos de rata, preparadas como describen previamente Morán y Patel [133]. Se utilizó medio de cultivo basal Eagle suplementado con suero fetal bovino (10%) inactivado por calor, 2 mM de glutamina, 50 U/ml de penicilina, y 50 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina. La densidad final de los cultivos fue de 1.5×10^6 células/ml. Para permitir la adherencia neuronal, las cajas fueron tratadas previamente con 25 μM de poli-L-lisina. Después de 24 h a las células se les añadió citosina arabinosa (10 μM) para impedir la proliferación de células no neuronales. Los cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera de CO₂ (5%) y aire saturado con vapor de agua (95%). En el texto, nos referiremos a este medio como K25. Al final de la preparación, los cultivos de NGC contuvieron aproximadamente 95% de neuronas. Los cultivos se mantuvieron 7 días en el medio despolarizante (K25) y en esta condición temporal la muerte apoptótica de las NGC se indujo por dos estímulos diferentes: a) por una reducción en la concentración de K⁺ extracelular, es decir, las neuronas se transfirieron a un medio libre de suero conteniendo 5 mM de KCl (al

que nos referiremos en el texto como K5) o b) por la administración de 0.5 μM de estaurosporina (Sts) a diferentes tiempos de interés (0.25 h-5.5 h).

5.3. Viabilidad celular

La viabilidad celular se determinó por la acumulación de calceína-AM y exclusión de ioduro de propidio (IP) para teñir células vivas y muertas, respectivamente. Las células viables contienen esterasas endógenas y se identifican por su capacidad de convertir calceína AM a calceína, un producto fluorescente verde. El IP atraviesa la membrana plasmática de células dañadas, se une al ADN y ARN de doble cadena por intercalación, y emite una intensa señal de fluorescencia roja. No unido y en solución acuosa, este colorante muestra fluorescencia débil, además de que las células vivas y aquellas en las primeras etapas de apoptosis excluyen el IP. Las células se incubaron con calceína AM (1 μM) por 15 minutos e IP (40 μM) por 15 minutos a 37 ° C y las células se observaron en un microscopio de epifluorescencia y se contaron las células teñidas con calceína e IP.

Para evaluar la viabilidad celular también se utilizó la técnica de reducción de MTT [Bromuro de 3-(4,5 dimetiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio], basada en la capacidad de la succinato deshidrogenasa mitocondrial de transformar MTT en azul de formazán. Midiendo la cantidad de formazán producido se equipara la actividad deshidrogenasa mitocondrial con la viabilidad de nuestro cultivo; como sólo en las células vivas se puede producir esta reacción, la cantidad de formazán producido es directamente proporcional al número de células viables presentes en el ensayo. Las células se incubaron con MTT (100 μM) durante 15 minutos, se lavaron y se extrajo el azul de formazán con DMSO (dimetil sulfóxido; 100%) y se leyó en el espectrofotómetro a 570 nm.

5.4. Determinación de ROS

Se sabe que el Dihidroetidio (DHEt) difunde a las células y al entrar en contacto con anión superóxido se oxida produciendo etidio y 2-hidroietidio en el citosol que al unirse al DNA emiten un rojo fluorescente brillante, por lo tanto, la intensidad de la fluorescencia es un parámetro indirecto de los niveles de ROS. Las células se mantuvieron en un medio K25 por 7 DIV y después de este tiempo las NGC se transfirieron a un medio con K5 o tratadas con Sts y mantenidas en estas condiciones a diferentes tiempos. Después de cada tratamiento las células fueron incubadas con 3.2 μM de DHEt por 20 minutos a 37°C. Después se lavaron con PBS y se fotografiaron en un microscopio de fluorescencia con un filtro de rodamina con

una longitud de onda de 488-515 nm. La intensidad de la fluorescencia se midió con el programa Image J. La producción de ROS debida al sistema de la xantina/xantina oxidasa se usó como control positivo, en este caso, los cultivos de 7 DIV se incubaron con 10 μ M de xantina (X) por 1 h y posteriormente se añadió la enzima xantina oxidasa (XO) (45 mU/mL) al medio y la producción de ROS se midió después de 2 h [125].

5.5. Análisis de proteínas (Western Blot)

Las NGC se cultivaron en un medio K25 por 7 DIV y luego se les cambió a un medio K5 o se trataron con estaurosporina desde los 15 min a las 5.5 h. Algunos cultivos se trataron con peróxido de hidrógeno, antioxidantes, o inhibidores de la enzima NADPH-Oxidasa (NOX). Las NGC en cultivo se lavaron 2 veces con PBS frío y se homogenizaron a 4°C en un buffer de lisis (Tris-HCl 25 mM; NaCl 50 mM; los detergentes IGEPAL 2%, SDS [dodecil sulfato de sodio] 0.2% y un coctel de inhibidores de proteasas, pH 7.4). Los homogenados de cerebelo obtenidos se sonicaron y se centrifugaron a 4,500 rpm por 5 minutos y se recuperó el sobrenadante. Se determinó la cantidad de proteína en los homogenados de células en cultivo con el método de Bradford.

Las proteínas de los homogenados (60 μ g por carril) se separaron por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE por sus siglas en inglés [PolyAcrylamide Gel Electrophoresis], 10, 15 ó 20%) y se transfirieron a una membrana de PVDF (Polyvynilidene fluoride; Immobilon P, Millipore), a 100 V por 1.5 h. Las membranas se bloquearon con leche descremada al 2.5 y 5 % en una solución salina de Tris: buffer (TBS)/Tween 20 (TTBS) (Tris base 100 mM, NaCl 150 mM, Tween 0.1 %, pH 7.4), toda la noche y posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario de interés a 4°C toda la noche. Después de lavar las membranas 3 veces (15 minutos cada vez), éstas se incubaron con el anticuerpo secundario adecuado: anti-mouse conjugado a peroxidasa (1:10,000), anti-rabbit conjugado a peroxidasa (1:10,000), anti-mouse acoplado a fosfatasa alcalina (1:30,000) o anti-rabbit acoplado a fosfatasa alcalina (1:20,000) durante 1 h a temperatura ambiente. La inmunodetección se realizó utilizando un sustrato quimioluminiscente de acuerdo a las instrucciones del fabricante y expuestas a una película (BioMax Ligh Film, Kodak Film).

5.6. Co-inmunoprecipitación (Co-IP)

Se utilizó esta técnica para evaluar la interacción TXNIP-Trx2, Trx2-ASK1 y Trx1-ASK1. Es muy similar a la inmunoprecipitación (IP) porque la técnica básica utiliza un anticuerpo inmovilizado específico a un antígeno

de interés; sin embargo, mientras que el propósito de la IP es purificar un sólo antígeno, una Co-IP se diseña para aislar el antígeno junto con algunas otras proteínas o ligandos que están unidos a él.

Las NGC en cultivo se lavaron con PBS y después de obtener los homogenados de proteínas, éstos se cuantificaron por el método de Bradford colocando la misma cantidad de proteína de cada condición en microtubos. Para la co-inmunoprecipitación de las proteínas de interés se utilizó el siguiente buffer de lisis e inmunoprecipitación: Tritón X-100 al 1%, Tris HCl 50 mM pH 7.5 y EDTA 10 mM. En la inmunoprecipitación se colocó 1 µl (0.2 µg/µl) de anticuerpo específico para ASK1 (American Research Products, Inc.TM; No. catálogo: 01-7931) para evaluar la interacción Trx1-ASK1, y 1 µl (0.2 µg/µl) de anticuerpo policlonal para Trx2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.; No. catálogo: sc-50336) para evaluar la interacción TXNIP-Trx2 y Trx2-ASK1. Los lisados celulares, junto con el anticuerpo y una vez cuantificados, se dejaron incubando toda la noche a 4°C en agitación constante con el fin de propiciar la interacción entre el anticuerpo y la proteína blanco. Al siguiente día, para precipitar el complejo anticuerpo-proteína blanco, se incubaron las muestras con 20 µl de proteína A agarosa (Millipore), en agitación constante por 2 h a 4°C. Transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm por un minuto y se desechó el sobrenadante. Después se resuspendieron en 30 µl de solución Laemmli 4x, se calentaron las muestras a 100°C por 7 minutos y se corrieron en un gel híbrido (2 fases) al 10% y 20% de poli(acrilamida)-SDS. Finalmente se realizó el Western Blot y se reveló contra las proteínas de interés asociada (en este caso, Trx1, TXNIP y ASK1).

5.7. Anticuerpos

Se utilizaron los siguientes anticuerpos de las siguientes compañías:

- a) Cell Signaling: anti-pAkt S473 (D9E) (#4060S), anti-Akt pan (C67E7) (#4691L), anti-Trx1 (#2429S) y anti-ASK1 (D11C9) (#8662).
- b) Santa Cruz Biotechnology: anti-Trx2 (#sc-50336)
- c) Novus Biologicals: anti-TXNIP (JY2) (#NBP1-S4578)
- d) Merck Millipore: anti-GAPDH (#MAB374)

Las concentraciones relativas fueron las siguientes: 1 : 3,000 mouse anti-GAPDH, 1 : 1,000 rabbit anti-pAkt, 1 : 1,000 rabbit anti-Akt, 1 : 500 mouse anti-TXNIP, 1 : 500 rabbit anti-Trx1, 1 : 1,000 rabbit anti-Trx2 y 1 : 1,000 rabbit anti-ASK1.

5.8. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el programa SigmaPlot 11.0. Los datos obtenidos de los diferentes ensayos se expresaron como el valor de la media \pm error estándar. La significancia estadística de los resultados se determinó mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA de una vía), seguidas de la prueba post hoc Bonferroni; un valor de $p < 0.05$ se consideró como estadísticamente significativo, indicando el número de experimentos. La significancia estadística de los datos de la Figura 5 se determinó por un análisis no paramétrico seguida por una prueba post hoc de Dunnett.

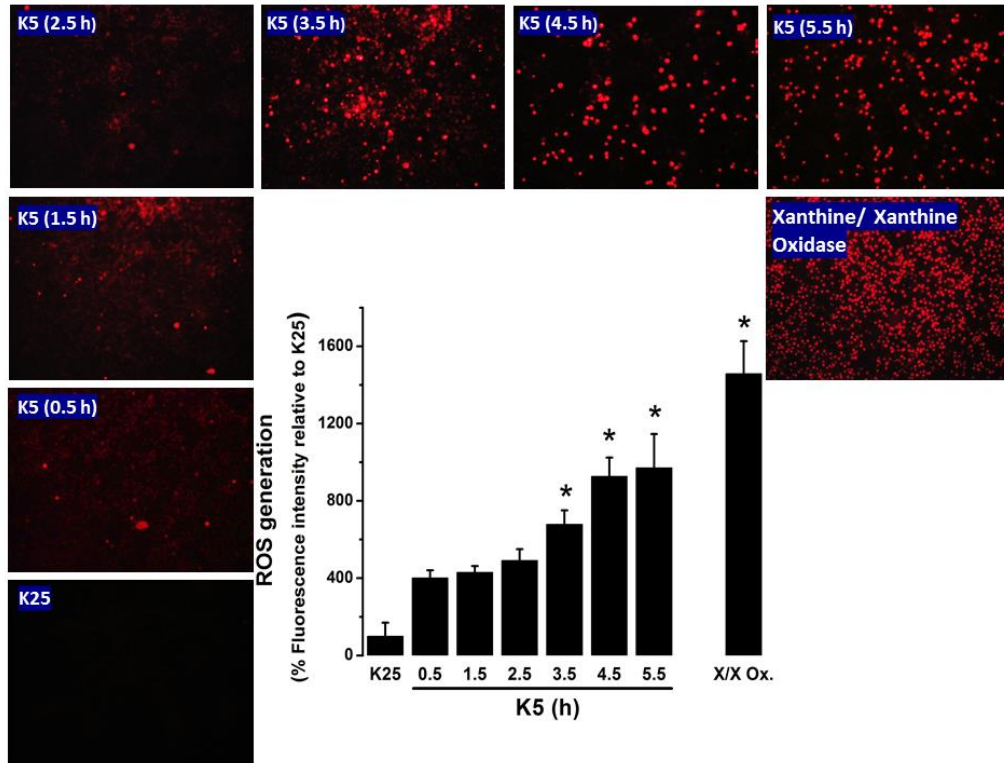
6. Resultados

6.1. Condiciones apoptóticas inducen la generación de ROS en NGC

Con el objetivo de analizar el efecto de dos condiciones de muerte, K5 y Sts, en la generación de ROS en NGC, los cultivos neuronales se mantuvieron en K25 por 7 DIV, es decir, en una condición despolarizante y de supervivencia por 7 DIV, y luego se les cambió el medio a K5 o se trataron con Sts por 0.5 h, 1.5 h, 2.5 h, 3.5 h, 4.5 h ó 5.5 h. Los niveles de ROS se midieron como se detalla en Materiales y Métodos.

De acuerdo con resultados previos [53], en las NGC tratadas con K5 se muestra un incremento en los niveles de ROS desde los 30 minutos, las cuales van incrementando progresivamente hasta alcanzar un máximo a las 5.5 h (Figura 5A, suplementaria 1A). De forma similar, también se observa un incremento en los niveles de ROS en las neuronas tratadas con Sts, este incremento se presenta desde los 30 minutos y se mantiene hasta las 5.5 h evaluadas. Sin embargo, la intensidad de las células positivas a DHEt es relativamente más bajo que lo que se observa en el caso de la condición con K5 (Figura 5B, suplementaria 1B).

A)



B)

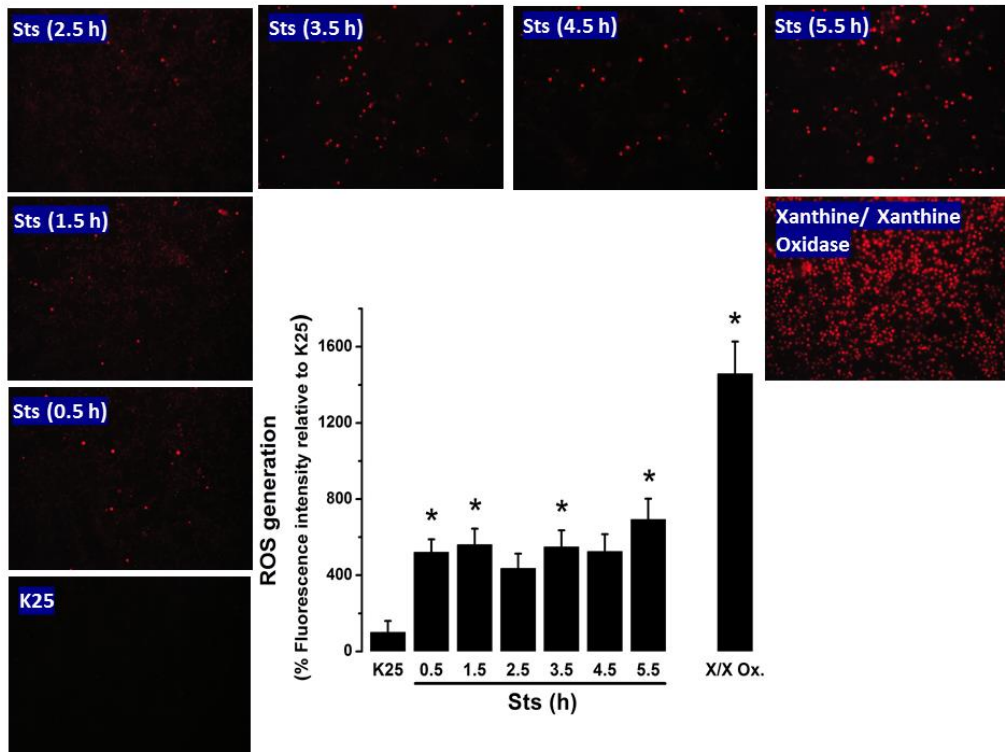


Figura 5. K5 y Sts inducen la generación de especies reactivas del oxígeno a tiempos cortos. Los cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo (NGC) de rata, se cultivaron en K25 como se describe en Materiales y Métodos. Después de 7 DIV, A) las neuronas se transfirieron a un medio con K5 o B) se trataron con Sts (0.5 μ M) desde 0.5 h hasta 5.5 h. Los niveles de ROS se expresan como el porcentaje de la intensidad de fluorescencia media del catión etidio (producto de la oxidación del dihidroetidio) con respecto a K25. El tratamiento con xantina/xantina oxidasa se usó como control positivo de la producción de ROS. Los datos se expresan como el promedio \pm error estándar de 5 experimentos independientes. * $p < 0.05$, significativamente diferente de K25, X/X Ox: sistema xantina/xantina oxidasa.

También se midió la generación de ROS en neuronas tratadas con el sistema xantina/xantina oxidasa, sistema enzimático que se utilizó como control positivo, encontrándose un incremento del $26.20\% \pm 4.39$ de células positivas a DHEt con respecto al total de células por campo (Figura suplementaria 1). Se ha reportado que esta aproximación genera la especie reactiva anión superóxido, sin embargo, se ha mostrado que el anión superóxido generado exógenamente dismuta espontáneamente a H_2O_2 en un tiempo muy corto [134, 135].

El peróxido de hidrógeno puede difundir libremente dentro de las células y llevar a cabo sus efectos, incluyendo la muerte celular. Previamente se ha mostrado y lo hemos corroborado en mi trabajo de maestría [51], que K5 induce una disminución en la viabilidad celular del 20-25 % aproximadamente después de las 8 horas de tratamiento y del 60-70 % después de las 24 h. En el caso de la Sts [51], se encontró una disminución en la viabilidad celular del 50-60 % después de las 24 h. Esta disminución en la viabilidad se corresponde con muerte neuronal con características apoptóticas. Estos datos indican que K5 y Sts son condiciones apoptóticas que inducen una generación temprana de ROS en NGC.

6.2. La expresión de TXNIP inducida por privación de potasio está mediada por ROS

Debido a que TXNIP es una proteína redox expresada de manera ubicua que promueve apoptosis [77], se analizó el patrón de expresión de esta proteína en neuronas tratadas con K5 desde las 0.5 h hasta las 5.5 h. Bajo estas condiciones, se observa que la expresión de TXNIP comienza después de las 2 horas de privación de potasio, alcanza un pico a las 3 y 4 horas y posteriormente disminuye a las 5.5 h (Figura 6). Interesantemente, en condiciones despolarizantes (K25) no hay expresión de TXNIP (Figura 6).

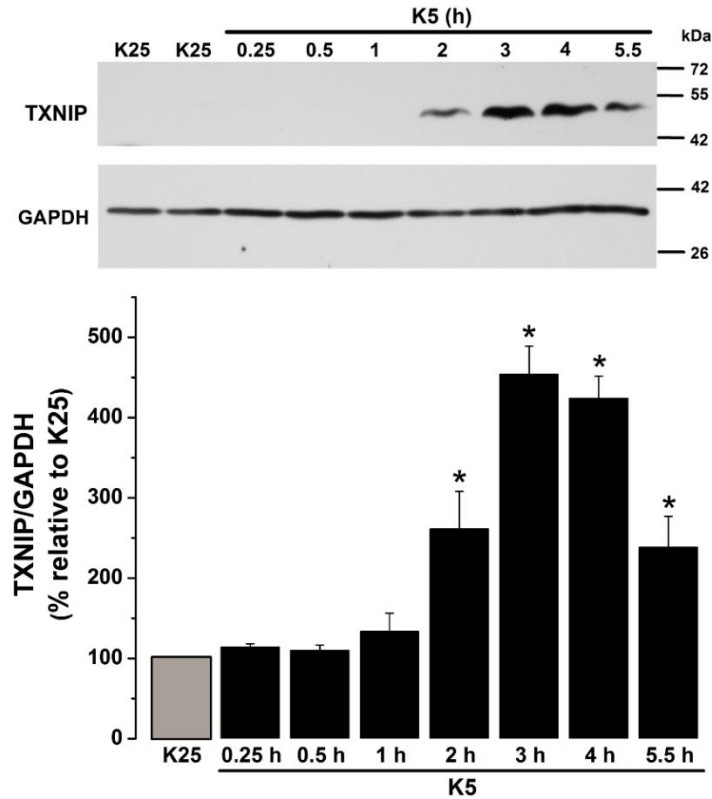


Figura 6. K5 induce la expresión de TXNIP. Los cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo (NGC) de rata, se cultivaron en K25 como se describe en Materiales y Métodos. Después de 7 DIV, las neuronas se transfirieron a un medio con K5 durante los tiempos indicados y se evaluaron los niveles de TXNIP mediante Western Blot. Las barras de la gráfica indican los valores densitométricos de la razón TXNIP/GAPDH. Los resultados se expresan como porcentaje de K25 (K25=100%). GAPDH es el control de carga. TXNIP: 50 kDa, GAPDH: 37 kDa. Los datos se expresan como el promedio \pm error estándar de 4 experimentos independientes. * $p < 0.05$, significativamente diferente de K25. $n=4$.

Para analizar el posible papel de las ROS en la expresión de TXNIP inducida por K5, en estas neuronas, se investigó el efecto de los antioxidantes EUK-134 y Ebselen, además de los inhibidores de la NADPH Oxidasa, DPI y AEBSF, sobre la expresión de TXNIP inducida por K5. Bajo estas condiciones se puede observar que 10 μ M y 20 μ M de EUK-134, así como 10 μ M de Ebselen redujeron notablemente la expresión de TXNIP inducida por K5 a las 4 horas. Además, los dos inhibidores de NOX que se emplearon también redujeron considerablemente la expresión de esta proteína inducida por K5, incluso en mayor grado que los antioxidantes, en particular, DPI inhibió completamente dicha expresión (Figura 7). Estos resultados, en su conjunto, sugieren que las ROS podrían ser moléculas mediadoras en la expresión de TXNIP inducida por privación de potasio en neuronas granulares de cerebelo.

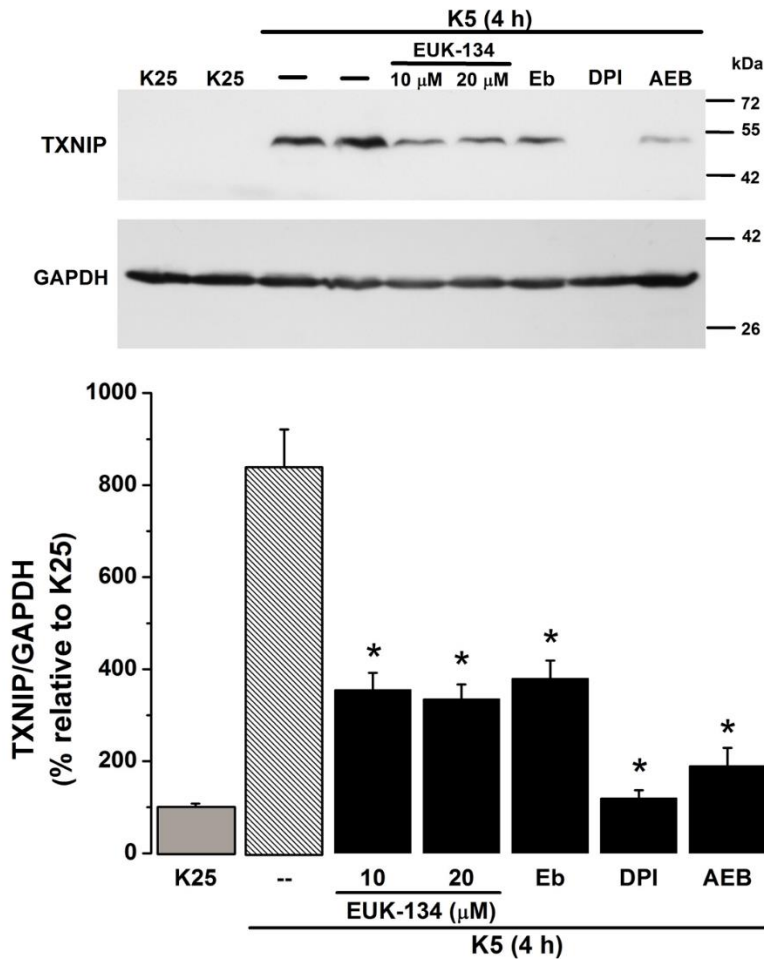


Figura 7. Inhibidores de ROS previenen la expresión de TXNIP inducida por K5. Los cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo (NGC) de rata, se cultivaron en K25 como se describe en Materiales y Métodos. Después de 7 DIV, las neuronas se transfirieron a un medio con K5 durante 4 horas y se evaluaron los niveles de TXNIP mediante Western Blot. En este experimento se usó a K25 como control negativo y a K5 (4 h), como control positivo. En K5 (4 h), las neuronas se preincubaron con los antioxidantes EUK-134 (10 μ M y 20 μ M) y Ebselen (10 μ M), además se probaron los inhibidores de la enzima NOX, DPI (520 nM) y AEBSF (50 μ M). El inmunoblot se realizó contra TXNIP y GAPDH, donde GAPDH es el control de carga. Las barras de la gráfica indican los valores densitométricos de la razón TXNIP/GAPDH. Los resultados se expresan como porcentaje de K25 (K25=100%). Los datos se expresan como el promedio \pm error estándar de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, significativamente diferente de K5 (4 h). TXNIP: 50 kDa, GAPDH: 37 kDa. Eb: Ebselen; AEB: AEBSF. $n=3$.

6.3. H₂O₂ Induce la expresión de TXNIP en NGC

Posteriormente, se analizó el efecto del H₂O₂ en la expresión de TXNIP para corroborar el papel de las ROS en este proceso. En condiciones K25, se encontró que el tratamiento con H₂O₂ indujo la expresión de TXNIP, y este efecto depende de la concentración de esta especie reactiva del oxígeno (Figura 8).

Como se puede observar, la expresión de TXNIP incrementó a partir de los 100 μM y alcanzó una expresión máxima a los 400 μM , la concentración más alta que se probó (Figura 8).

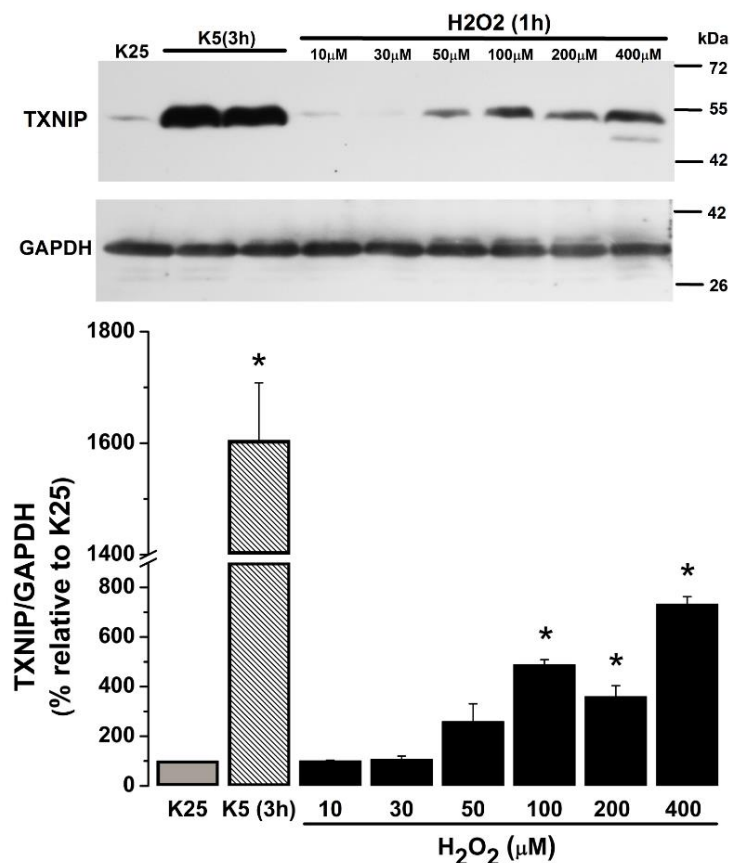


Figura 8. H₂O₂ induce la expresión de TXNIP. Los cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo (NGC) de rata, se cultivaron en K25 como se describe en Materiales y Métodos. Después de 7 DIV, las neuronas se trataron con H₂O₂ a diferentes concentraciones y los niveles de TXNIP se evaluaron mediante Western Blot. K25 se usó como control negativo y K5 (3 h), como control positivo de la expresión de TXNIP. Las barras de la gráfica indican los valores densitométricos de la razón TXNIP/GAPDH. Los resultados se expresan como porcentaje de K25 (K25=100%). GAPDH es el control de carga. TXNIP: 50 kDa, GAPDH: 37 kDa. Los datos se expresan como el promedio \pm error estándar de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, significativamente diferente de K25.

6.4. La expresión de TXNIP inducida por estaurosporina está mediada por ROS

Con el objeto de evaluar el efecto de otra condición apoptótica sobre la expresión de TXNIP, se analizó el efecto de la estaurosporina (0.5 μM). En la figura 9 se puede observar que el tratamiento con Sts indujo un incremento en la expresión de TXNIP aproximadamente a partir de las 3 h, el cual fue creciendo

hasta las 5.5 h evaluadas (Figura 9). Se puede notar que el incremento en la expresión de esta proteína inducido por Sts es más tardío que el que se presenta bajo tratamiento con K5 (Figura 6).

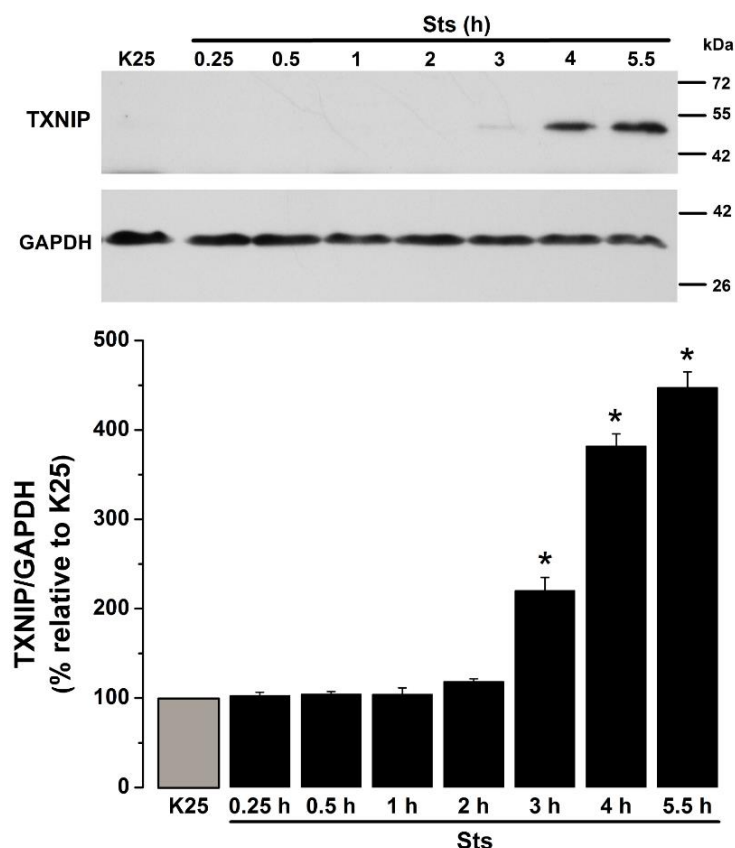


Figura 9. Estaurosporina incrementa la expresión de TXNIP. Los cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo (NGC) de rata, se cultivaron en K25 como se describe en Materiales y Métodos. Después de 7 DIV, las neuronas se trataron con Sts (0.5 μ M) durante los tiempos indicados y se evaluaron los niveles de TXNIP mediante Western Blot. Las barras de la gráfica indican los valores densitométricos de la razón TXNIP/GAPDH. Los resultados se expresan como porcentaje de K25 (K25=100%). GAPDH es el control de carga. TXNIP: 50 kDa, GAPDH: 37 kDa. Los datos se expresan como el promedio \pm error estándar de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, significativamente diferente de K25.

Para encontrar el posible papel de las ROS en la expresión de TXNIP inducida por Sts, se puso a prueba el efecto de los antioxidantes EUK-134 y Ebselen, así como de los inhibidores de la NOX, DPI y AEBSF, en los ensayos de Western Blot sobre la expresión de esta proteína. Se observa que la expresión de TXNIP inducida por Sts a las 5.5 h se redujo por EUK-134 (20 μ M), Ebselen (10 μ M) y AEBSF (50 μ M). De manera análoga a lo encontrado con los efectos de los inhibidores de NOX sobre la expresión de TXNIP inducida por K5, la expresión de esta proteína inducida por Sts se inhibió completamente con DPI (520 nM) (Figura 10). Esto sugiere un papel preponderante de la NADPH Oxidasa sobre la expresión de TXNIP inducida por Sts.

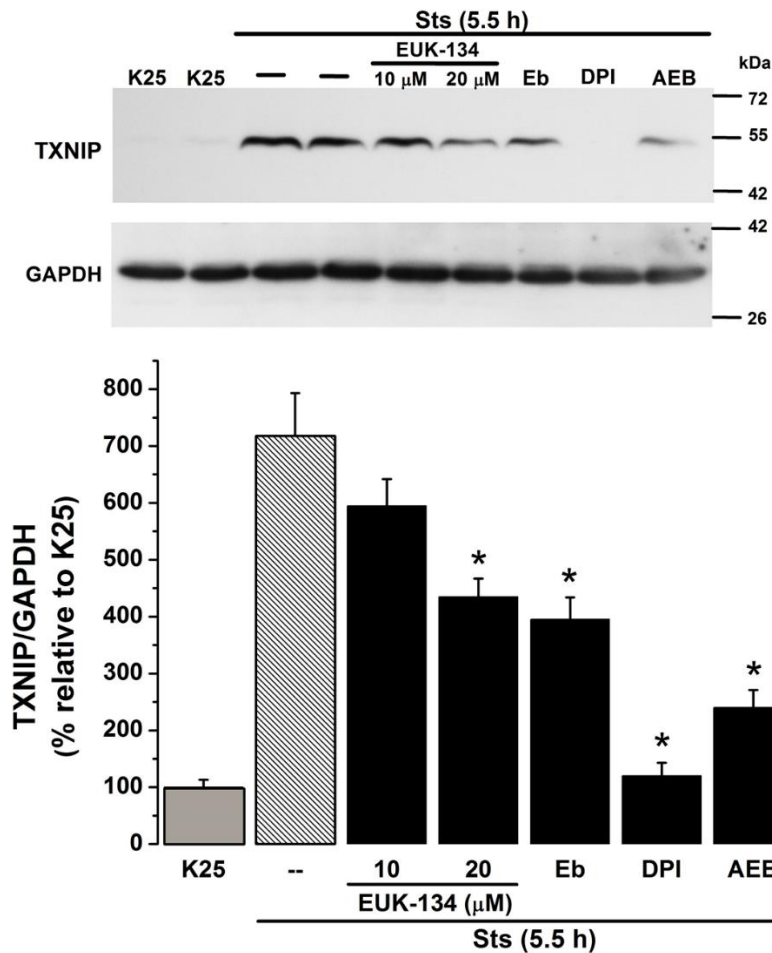


Figura 10. Inhibidores de ROS previenen la expresión de TXNIP inducida por Sts. Los cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo (NGC) de rata, se cultivaron en K25 como se describe en Materiales y Métodos. Después de 7 DIV, las neuronas se trataron con Sts (0.5 μM) durante 5.5 h y se evaluaron los niveles de TXNIP mediante Western Blot. En este experimento se usó a K25 como control negativo y a Sts (5.5 h), como control positivo. En Sts (5.5 h), las neuronas se preincubaron con los antioxidantes EUK-134 (10 μM y 20 μM) y Ebselen (10 μM), además se probaron los inhibidores de la enzima NOX, DPI (520 nM) y AEBSF (50 μM). El inmunoblot se realizó contra TXNIP y GAPDH, donde GAPDH es el control de carga. Las barras de la gráfica indican los valores densitométricos de la razón TXNIP/GAPDH. Los resultados se expresan como porcentaje de K25 (K25=100%). Los datos se expresan como el promedio ± error estándar de 3 experimentos independientes. * p<0.05, significativamente diferente de Sts (5.5 h). TXNIP: 50 kDa, GAPDH: 37 kDa. Eb: Ebselen; AEB: AEBSF. n=3.

6.5. Privación de potasio y estaurosporina reducen la activación de Akt en NGC

Se ha reportado que la regulación a la baja de la señalización PI3K/Akt produce un incremento en la expresión de TXNIP [120,136]. Con esta idea, se exploró la posibilidad de que la actividad de la cinasa

Akt estuviese regulada por las condiciones apoptóticas y el H₂O₂, usados en los experimentos previos. Para ello se realizó un curso temporal de la actividad de Akt en neuronas tratadas con K5 desde los 15 minutos hasta las 5.5 h. Los niveles de pAkt (Ser473), Akt y GAPDH se evaluaron mediante análisis por Western Blot. Bajo estas condiciones encontramos una significativa disminución en los niveles de Akt fosforilado desde la hora de tratamiento, alcanzando un máximo en la inactivación de Akt entre las 2 y 3 horas de tratamiento con respecto a K25. Se puede observar que a tiempos más largos se presenta una ligera recuperación en la activación de Akt (Figura 11). Es de resaltar que este resultado correlaciona fuertemente con el curso temporal de la expresión de TXNIP inducida por K5 (Figura 6), es decir, hay una relación entre la pérdida de la fosforilación de Akt y la aparición de la proteína TXNIP cuando a las NGC se les estimula con K5.

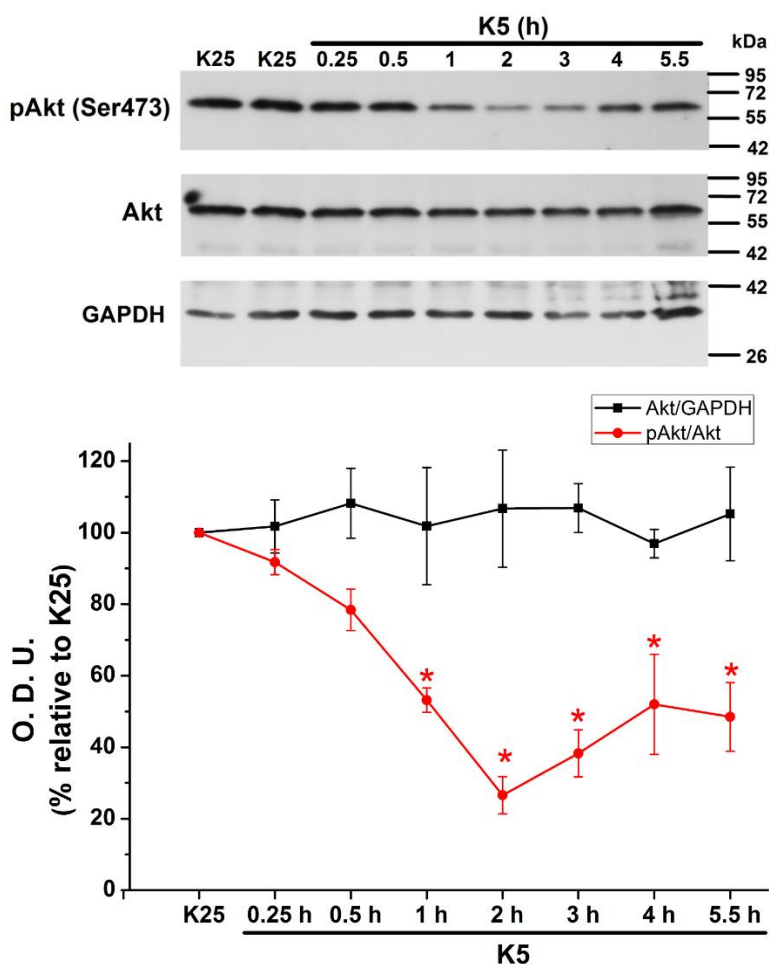


Figura 11. K5 disminuye la activación de Akt. Los cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo (NGC) de rata, se cultivaron en K25 como se describe en Materiales y Métodos. Después de 7 DIV, las neuronas se transfirieron a un medio con K5 durante los tiempos indicados y se evaluaron los niveles de Akt fosforilado en la serina 473 (fosfoserina que monitorea el estado de activación de Akt), Akt total y GAPDH. La gráfica indica los valores densitométricos de la razón Akt/GAPDH, así como de la razón pAkt/Akt. Los resultados se expresan como porcentaje de K25 (K25=100%). GAPDH es el control de carga. Akt: 60 kDa, GAPDH: 37 kDa. Los datos se

expresan como el promedio \pm error estándar de 3 experimentos independientes. O.D.U: Unidades de densidad óptica. * $p < 0.05$, significativamente diferente de K25.

Similarmente, se realizó la misma estrategia para analizar el efecto de la estaurosporina sobre el estado de activación de Akt, es decir, un curso temporal desde los 15 minutos hasta las 5.5 h del efecto de la Sts en las NGC. Bajo estas condiciones, se encontró que las Sts provocó la inactivación de Akt a partir de los 30 minutos, lo cual se mantuvo hasta las 5.5 h de tratamiento, comprobando la existencia de inactivación de Akt a tiempos cortos bajo el estímulo de Sts (Figura 12). En este caso se puede observar una “laguna” temporal entre la inactivación de Akt y la expresión de TXNIP (Figura 9). Esto probablemente se deba a diferencias temporales en los mecanismos río arriba que son activados por la estaurosporina. Los resultados hasta ahora sugieren que diferentes condiciones apoptóticas que inducen generación de ROS son capaces también de inactivar a Akt y por ende muy probablemente la vía de señalización PI3K/Akt.

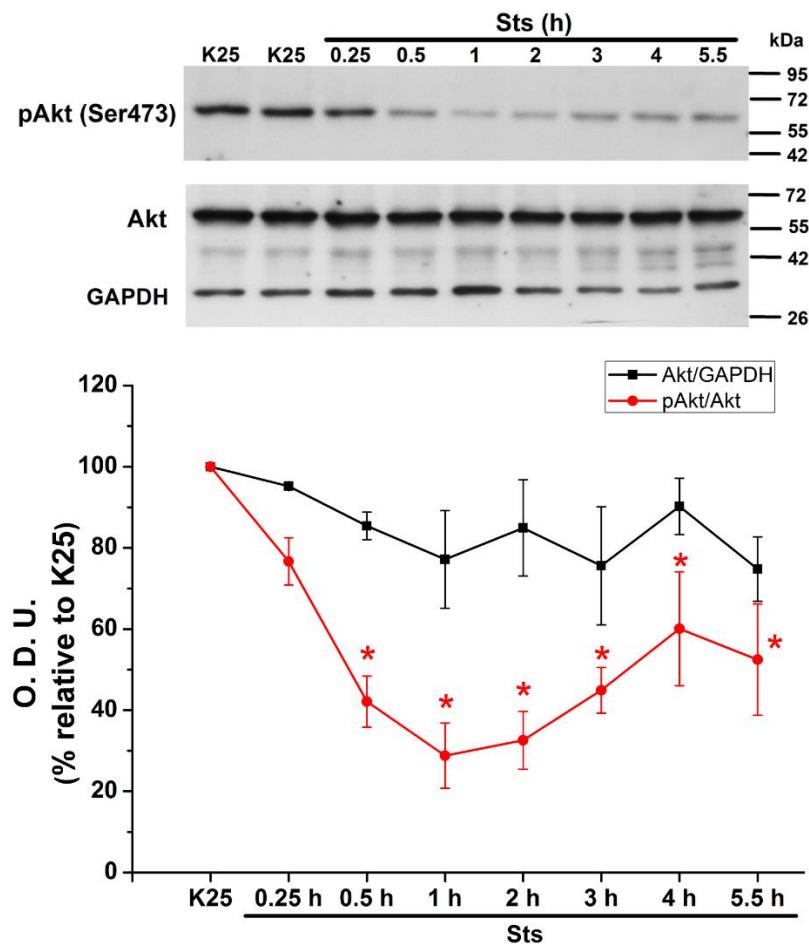


Figura 12. Sts disminuye la activación de Akt. Los cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo (NGC) de rata, se cultivaron en K25 como se describe en Materiales y Métodos. Después de 7 DIV, las neuronas se

trataron con estaurosporina (0.5 μM) durante los tiempos indicados y se evaluaron los niveles de Akt fosforilado en la serina 473 (fosfoserina que monitorea el estado de activación de Akt), Akt total y GAPDH. Las líneas indican los valores densitométricos de la razón Akt/GAPDH, así como de la razón pAkt/Akt. Los resultados se expresan como porcentaje de K25 (K25=100%). GAPDH es el control de carga. Akt: 60 kDa, GAPDH: 37 kDa. Los datos se expresan como el promedio \pm error estándar de 3 experimentos independientes. O.D.U: Unidades de densidad óptica. * $p < 0.05$, significativamente diferente de K25.

6.6. H_2O_2 disminuye la activación de Akt en NGC

Posteriormente, se analizó el efecto del H_2O_2 para investigar el posible papel de las ROS en la regulación de Akt. Para esto, en condiciones despolarizantes (K25) se utilizaron concentraciones crecientes de H_2O_2 , encontrándose que disminuye la fosforilación de Akt conforme aumenta el H_2O_2 . La inactivación de Akt se presenta a partir de los 100 μM , mostrando que la inactivación de esta cinasa depende de la concentración de ROS. Es importante notar que la inactivación de Akt inducida por H_2O_2 es muy similar a lo encontrado con K5 a las 3 h K5 (control positivo), sugiriendo que la inactivación de Akt inducida por K5 probablemente está mediada por H_2O_2 (Figura 13).

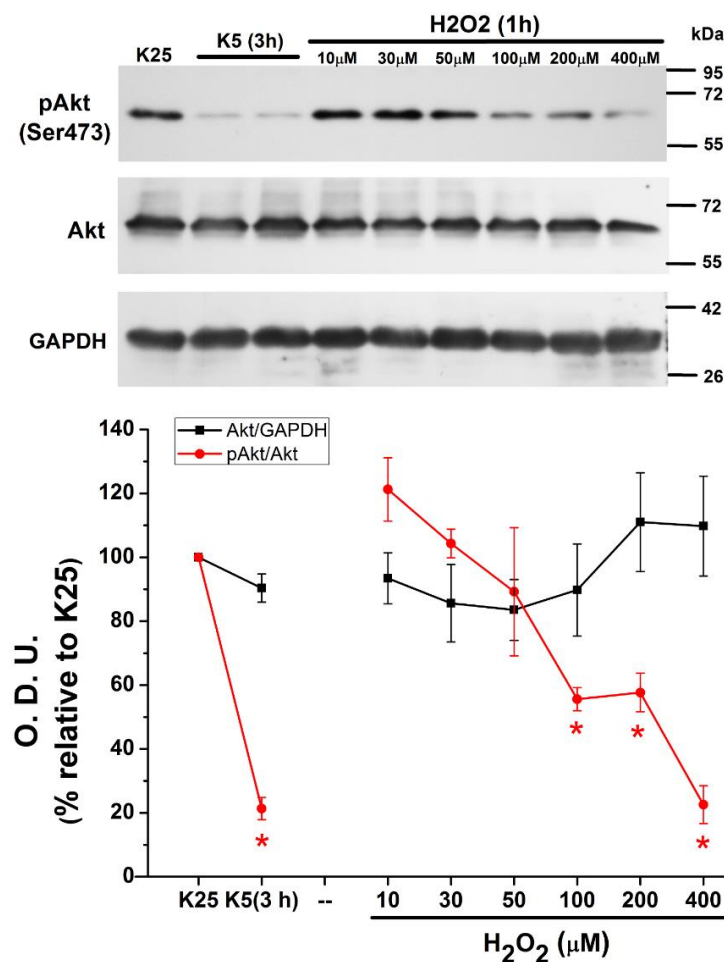


Figura 13. H₂O₂ disminuye la activación de Akt. Los cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo (NGC) de rata, se cultivaron en K25 como se describe en Materiales y Métodos. Después de 7 DIV, las neuronas se trataron con H₂O₂ a diferentes concentraciones y se evaluaron los niveles de Akt fosforilado en la Ser473, Akt total y GAPDH. Se usó a la condición K25 como control negativo y a K5 (3 h), como control positivo. Las líneas indican los valores densitométricos de la razón Akt/GAPDH, así como de la razón pAkt/Akt. Los resultados se expresan como porcentaje de K25 (K25=100%). GAPDH es el control de carga. Akt: 60 kDa, GAPDH: 37 kDa. Los datos se expresan como el promedio ± error estándar de 3 experimentos independientes. O.D.U: Unidades de densidad óptica. * p<0.05, significativamente diferente de K25.

Estos datos sugieren que la regulación de la actividad de Akt es sensible al estado redox en este modelo. Y además estos efectos del H₂O₂ se correlacionan con los observados en los experimentos acerca de la expresión de TXNIP (Figura 8).

6.7. La activación de Akt y la expresión de TXNIP son dos mecanismos acoplados en la muerte neuronal

Los datos anteriores sugieren fuertemente que tanto la activación de Akt como la expresión de TXNIP están regulados por ROS y que al parecer son dos fenómenos que están conectados en este modelo de muerte neuronal. Para confirmar o descartar esta idea, se midieron los niveles de TXNIP en neuronas tratadas con un inhibidor de la actividad de Akt. Para esto, se utilizó el compuesto LY 294002 que es un potente inhibidor de la vía de señalización PI3K/Akt [137] y que ha mostrado reducir la fosforilación de Akt en varios modelos [138-141]. Al respecto, lo primero que se midió fue el efecto del compuesto LY 294002 sobre la viabilidad de las NGC y se encontró que la inhibición de Akt por este compuesto indujo un significativo incremento en la muerte celular después de 24 horas de tratamiento. La viabilidad celular en este experimento se midió mediante la técnica de calceína-ioduro de propidio (Figura 14).

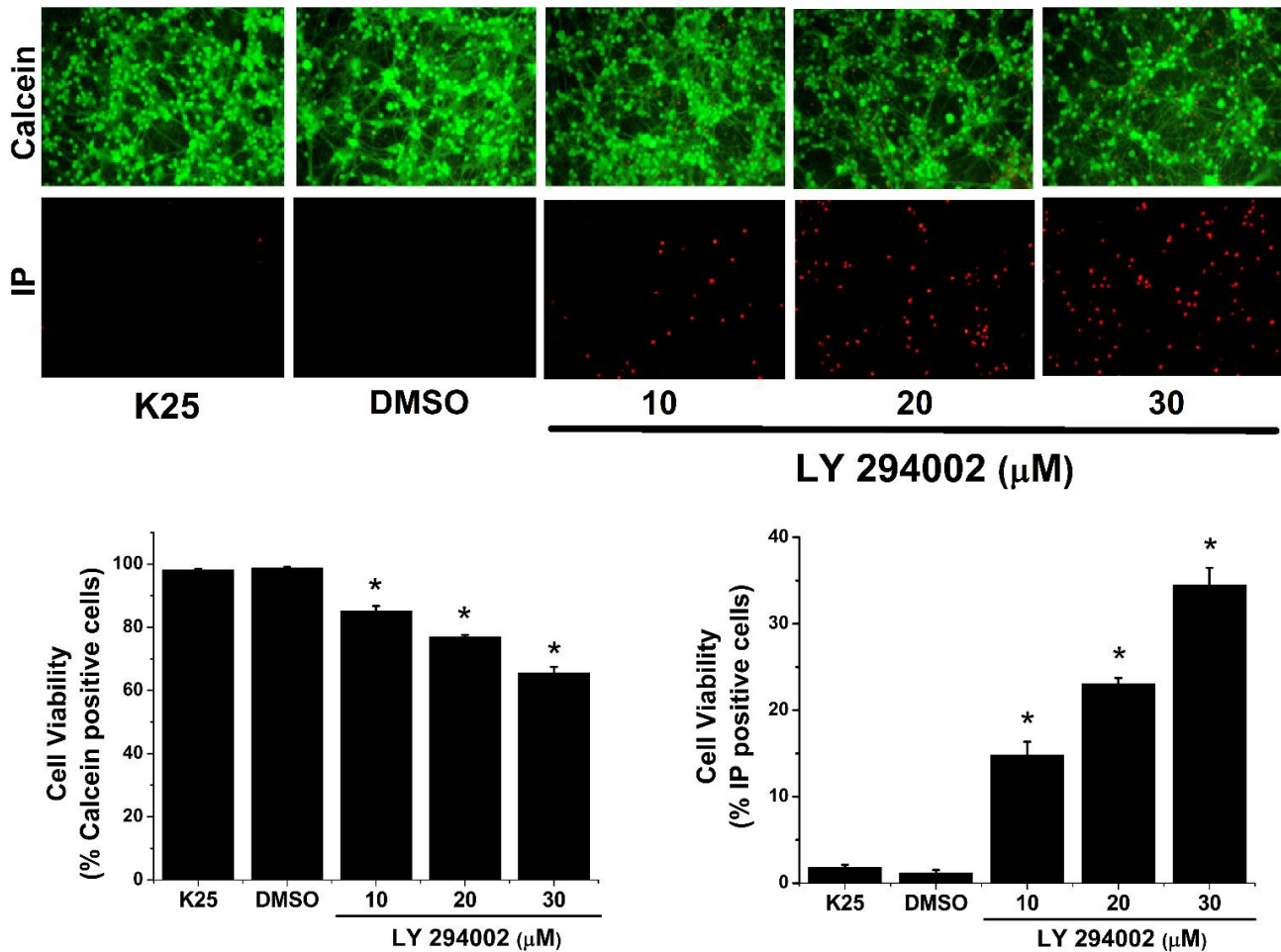


Figura 14. LY 294002 disminuye la viabilidad celular de las neuronas granulares de cerebelo. Los cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo (NGC) de rata, se cultivaron en K25 y la viabilidad celular se evaluó como se describe en Materiales y Métodos al medir el número de células positivas a calceína (células vivas) e yoduro de propidio (células muertas). Después de 7 DIV, las neuronas se trataron con 3 concentraciones de LY 294002 por 24 horas y se midió la viabilidad. Se muestran fotografías representativas de neuronas teñidas con calceína e IP (yoduro de propidio), además de la curva dosis-respuesta de las células positivas a calceína y aquellas positivas a IP después del tratamiento con LY 294002 por 24 h. Estos resultados se expresan como el porcentaje de células marcadas con respecto al total de células. Cada barra muestra el promedio \pm error estándar de seis pozos de cuatro cultivos independientes. * $p < 0.05$, significativamente diferente de K25.

Por tanto, se probó el efecto del compuesto LY 294002 (5-30 μM) tanto en los niveles de Akt fosforilado como en los niveles de la expresión de TXNIP, con el fin de investigar si existe alguna correlación entre la activación de Akt y la expresión de la proteína proapoptótica TXNIP. En la figura 15 se muestra un blot por duplicado del efecto del LY 294002 sobre la fosforilación de Akt y sobre la expresión de TXNIP. Podemos observar, por un lado, que el efecto del inhibidor de la vía de PI3K/Akt sobre la fosforilación de Akt es el esperado pues inhibe completamente la fosforilación en la serina 473 en una condición en donde se esperaba una gran activación de esta cinasa (Figura 15).

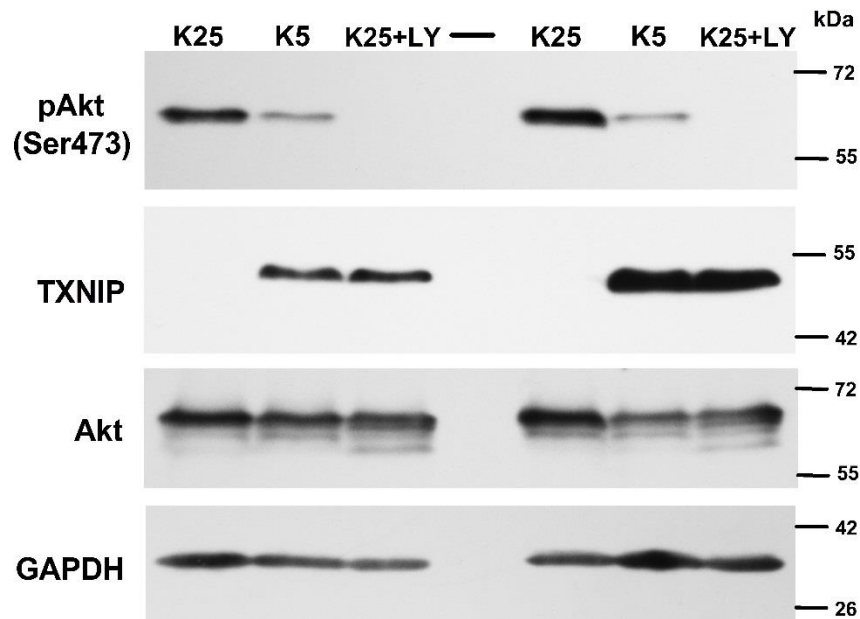


Figura 15. La inhibición de la vía PI3K/Akt induce la expresión de TXNIP. Los cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo (NGC) de rata, se cultivaron en K25 como se describe en Materiales y Métodos. Después de 7 DIV, algunas neuronas se trataron con K5 durante 3 horas (control negativo para la fosforilación de Akt en la serina 473 y control positivo para la expresión de TXNIP), mientras que otras células se trataron con 30 μ M de LY294002 (inhibidor de la vía PI3K/Akt). Los niveles de TXNIP y de pAkt se evaluaron mediante Western Blot. Se muestra un inmunoblot representativo por duplicado de 4 experimentos independientes. K25 se usó como control negativo de la expresión de TXNIP así como control positivo de la activación de Akt. GAPDH es el control de carga y también se muestran los niveles de Akt total los cuales no cambian. TXNIP: 50 kDa, Akt: 60 kDa, GAPDH: 37 kDa. n=4.

Por otro lado, el dato interesante es que al inhibir la vía de PI3K/Akt se induce la expresión de la proteína TXNIP, dato comparado con los respectivos controles que se ilustran en el blot. Al parecer existe una fuerte correlación entre la activación de Akt y la inhibición de la expresión de TXNIP, o viceversa, entre la inactivación de Akt y la expresión de la proteína proapoptótica TXNIP.

Puesto que el LY 294002 provocó la reducción de la fosforilación de Akt así como la expresión de TXNIP (Figura 15), se evaluó si existía una dependencia temporal y de dosis-respuesta del LY 294002 sobre estos fenómenos (Figura 16 y Figura 17). En la figura 16 se encontró que ambos fenómenos son dependientes de la concentración del compuesto LY 294002 pues a mayor concentración se observa claramente la reducción en la fosforilación de Akt y el incremento gradual en la expresión de la proteína TXNIP.

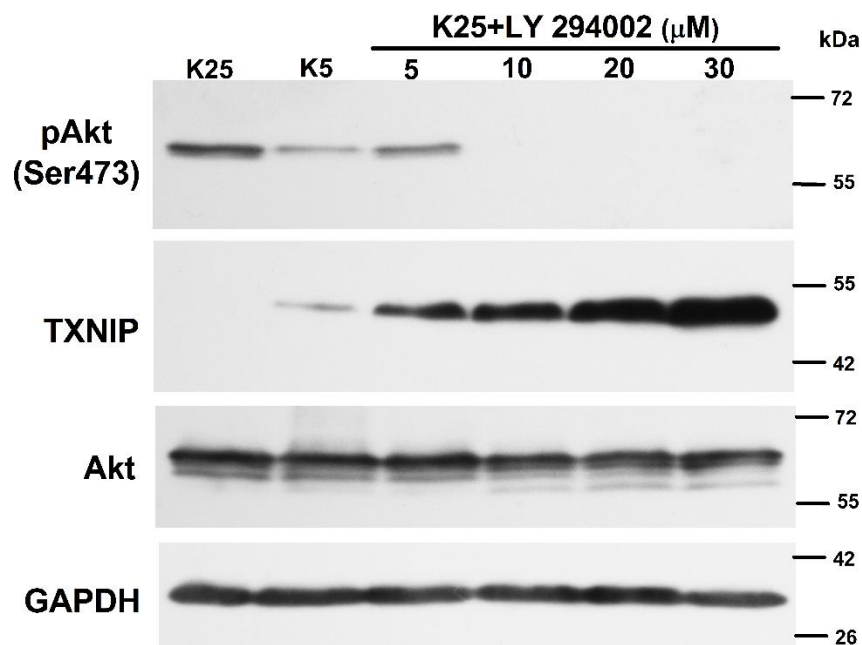


Figura 16. La expresión de TXNIP inducida por LY 294002 es dependiente de la concentración. Los cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo (NGC) de rata, se cultivaron en K25 como se describe en Materiales y Métodos. Después de 7 DIV, algunas neuronas se trataron con K5 durante 3 horas mientras que otras, se trataron con concentraciones crecientes de LY 294002 por 4 horas. Los niveles de TXNIP y de pAkt se evaluaron mediante Western Blot. K25 se usó como control negativo y K5 (3 h), como control positivo tanto de la expresión de TXNIP como de la inactivación de Akt. GAPDH es el control de carga. Se muestra un inmunoblot de dos experimentos independientes. TXNIP: 50 kDa, Akt: 60 kDa, GAPDH: 37 kDa. n=2.

Análogamente, también se encontró que ambos fenómenos son dependientes del tiempo en que las células están en contacto con el compuesto LY 294002 pues a mayor tiempo de incubación se observa la desfosforilación de Akt así como la aparición de TXNIP (Figura 17), en este caso se utilizaron 30 μM como concentración fija, debido al resultado anterior, y se puede notar que a partir de las 4 h se presenta la expresión de TXNIP, mientras que la desfosforilación de Akt es muy marcada desde los 15 minutos de incubación (Figura 17). Estos datos (Figura 16 y Figura 17) nos indican que inhibir la vía de PI3K/Akt impacta sobre la actividad de Akt así como en la expresión de la proteína proapoptótica TXNIP.

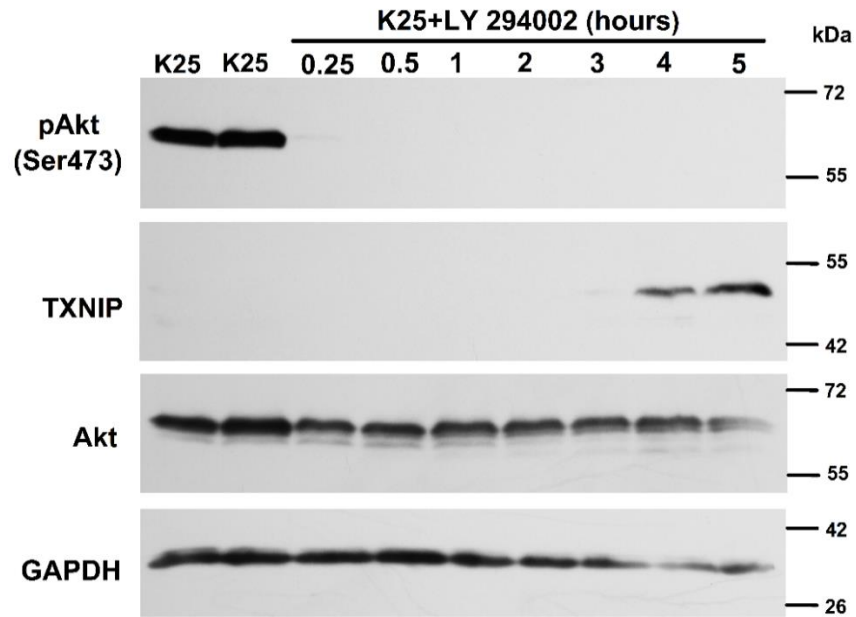


Figura 17. La expresión de TXNIP inducida por LY 294002 es dependiente del tiempo. Los cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo (NGC) de rata, se cultivaron en K25 como se describe en Materiales y Métodos. Después de 7 DIV, las neuronas se trataron con 30 μ M de LY294002 durante los tiempos indicados y los niveles de TXNIP y de pAkt se evaluaron mediante Western Blot. K25 se usó como control negativo tanto de la expresión de TXNIP como de la inactivación de Akt. GAPDH es el control de carga. Se muestra un inmunoblot de dos experimentos independientes. TXNIP: 50 kDa, Akt: 60 kDa, GAPDH: 37 kDa. n=2.

Estos resultados sugieren fuertemente que la señalización de Akt regula la expresión de TXNIP en este modelo de muerte neuronal, pues se presentan resultados similares a lo encontrado con los estímulos de K5 y Sts. Adicionalmente, estas observaciones también sugieren que PI3K regula la expresión de TXNIP a través de la regulación de la actividad de Akt.

En la figura 18 se muestra un esquema de la propuesta elaborada a partir de los resultados anteriores.

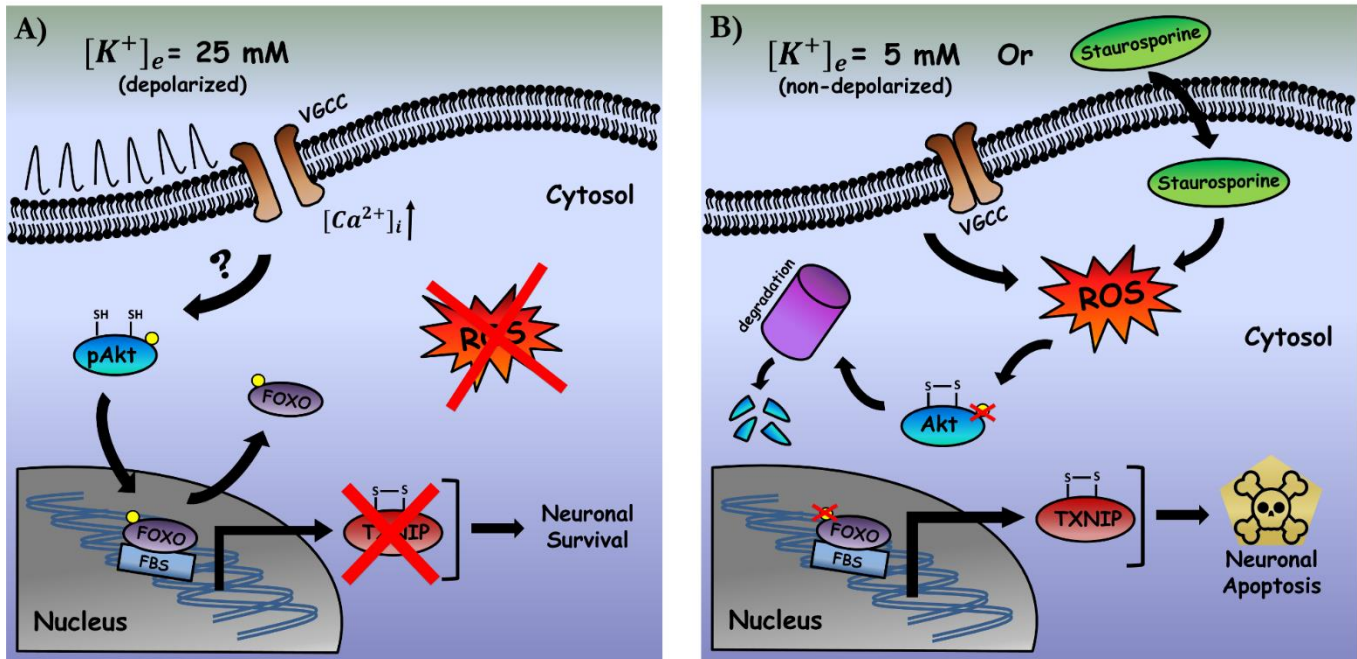


Figura 18. Representación esquemática del efecto de condiciones apoptóticas sobre la expresión de TXNIP en NGC. **A)** En el modelo de las neuronas granulares de cerebelo se ha mostrado que bajo condiciones despolarizantes *in vitro* (25 mM de KCl, K25) se activan los canales de calcio activados por voltaje tipo L, lo cual permite un incremento en el calcio intracelular. Bajo estas condiciones, nuestros datos indican que no se presenta generación de ROS y la cinasa Akt se mantiene activa, es decir, está fosforilada en la Ser473. Se sabe que Akt puede fosforilar a los factores de transcripción de la clase FOXO, inhibiendo su unión a los sitios FBS y promoviendo, de esta manera, su exportación nuclear. Esta condición despolarizante previene la expresión de la proteína proapoptótica TXNIP, permitiendo la supervivencia de la neurona. **B)** En contraste, bajo la privación de potasio (K5) o tratamiento con estaurosporina (Sts), nuestros datos indican generación de ROS, lo cual puede inducir la inactivación de Akt, y se sabe que esto lleva a la degradación proteosomal de esta cinasa. Esta situación podría llevar a la desfosforilación de los factores FOXO lo que a su vez provocaría su unión a los sitios FBS en el DNA y, por ende, inducir la expresión de TXNIP promoviendo la activación del proceso apoptótico. VGCC: Canales de calcio activados por voltaje; FBS: Sitios de unión a FOXO; pAkt: Akt fosforilada en la Ser473; NGC: Neuronas granulares de cerebelo; FOXO: Forkhead box protein O.

Una vez que TXNIP se expresa bajo condiciones de muerte apoptótica, ahora nos preguntamos cuál es su participación en el proceso de muerte, es decir, cuál es la vía de señalización que se activa al permitirse la expresión de TXNIP. Según la literatura existe una estrecha relación entre TXNIP, ASK1, Trx1 y Trx2 en células no neuronales, por ello nos interesó estudiar estas interacciones para entender mejor los mecanismos que se activan en conjunto con la vía Akt-TXNIP en un modelo de muerte neuronal por estrés oxidativo.

6.8. TXNIP se une a Trx2 en NGC bajo privación de potasio

Ahora se sabe que TXNIP, además de su bien conocida interacción con Trx1, también interactúa con Trx2 en células beta pancreáticas, por ello exploramos la posibilidad de que en nuestro modelo de muerte apoptótica en NGC exista la interacción entre TXNIP y Trx2. En la Figura 19 se observa que en condiciones control (K25) no existe unión entre TXNIP y Trx2, ni se presenta en tiempos muy cortos (hasta los 30 minutos), pero a partir de la hora de tratamiento comienza una ligera interacción entre estas dos proteínas, la cual es máxima a las 4 h y comienza a disminuir a las 5.5 h. Este resultado es muy interesante en el sentido en que correlaciona fuertemente con los niveles de expresión de TXNIP bajo privación de potasio, el comportamiento es el mismo. Esto sugiere que bajo privación de potasio se lleva a cabo la expresión de TXNIP y que una vez expresado se une “rápidamente” a Trx2 (proteína mitocondrial), mecanismo que podría jugar un papel muy importante en la activación del proceso de muerte neuronal.

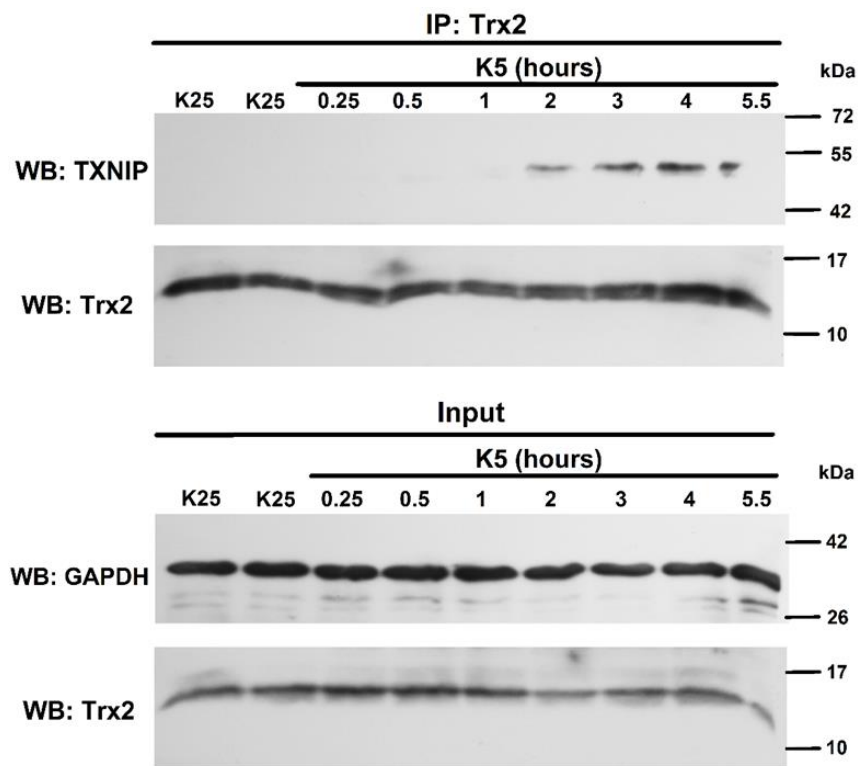


Figura 19. Interacción entre TXNIP y Trx2 bajo un curso temporal de privación de potasio. Las neuronas granulares de cerebelo (NGC) se trataron con K5 durante los tiempos indicados. Los lisados celulares se inmunoprecipitaron con anticuerpo contra Trx2. El inmunoblot se realizó contra TXNIP y Trx2. El nivel de expresión de TXNIP en el co-inmunoprecipitado refleja cuánto TXNIP está unido a Trx2 de acuerdo a las diferentes condiciones experimentales. GAPDH es el control de carga. Trx2: 12 kDa, TXNIP: 50 kDa, GAPDH: 37 kDa. n=2.

En este sentido, esta interacción TXNIP-Trx2 puede explicar la relación entre TXNIP y el mecanismo de muerte activado por estrés oxidativo, pues es bien conocido que una de las proteínas esenciales en el proceso de muerte apoptótica es ASK1, y recientemente se ha detectado que una de las proteínas que controlan su papel proapoptótico, a nivel mitocondrial, es Trx2 (además de Trx1 en el citoplasma celular).

6.9. La interacción entre ASK1 y Trx2 es sensible al estado redox

Debido a lo anterior, investigamos si bajo estrés oxidativo existía la interacción entre Trx2 y ASK1 en un proceso de muerte apoptótica. Para ello, se realizó el ensayo de co-IP mediante la inmunoprecipitación de ASK1 y revelando contra Trx2.

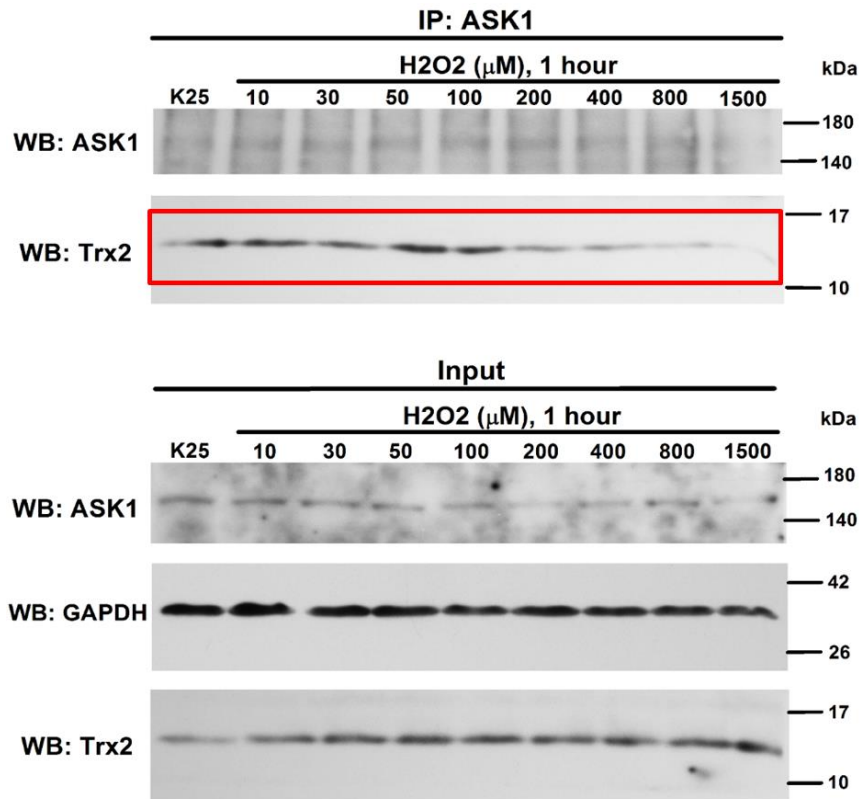


Figura 20. H₂O₂ disminuye la interacción entre ASK1 y Trx2 dependiendo de la concentración. Las neuronas granulares de cerebelo (NGC) se trataron con K25 y peróxido de hidrógeno a las concentraciones indicadas. Los lisados celulares se inmunoprecipitaron con anticuerpo contra ASK1. El inmunoblot se realizó contra Trx2. Se muestra la presencia de ASK1 y Trx2 tanto en la inmunoprecipitación como en el lisado celular (input). Los niveles de ASK1, Trx2 y GAPDH en el lisado celular total prácticamente no cambian. El nivel de expresión de Trx2 en el co-inmunoprecipitado refleja cuánto Trx2 está unido a ASK1 de acuerdo a las diferentes condiciones experimentales. K25 es el control negativo. GAPDH es el control de carga en el inmunoblot del lisado celular. n=2.

En la figura 20 se muestra un experimento representativo en donde se puede apreciar que se logró la estandarización de las condiciones de detección de ASK1 y Trx2, tanto para la inmunoprecipitación como para la detección por Western Blot en el proceso de inmunoprecipitación (en este caso analizando el efecto del peróxido de hidrógeno, una especie reactiva del oxígeno). Como se muestra en la figura 20 el H₂O₂ induce la separación entre ASK1 y Trx2 a partir de los 200 µM y tiene un efecto mayor conforme va aumentando la concentración hasta los 1.5 mM, es decir, el efecto del peróxido de hidrógeno sobre la unión entre Trx2 y ASK1 es dosis-dependiente. De igual forma se puede observar que los niveles de ASK1, Trx2 y GAPDH en el lisado celular total (input), no están cambiando de acuerdo a las distintas condiciones experimentales. Esto confirma que la interacción entre ASK1 y Trx2 es sensible al estado redox en este modelo de muerte apoptótica.

6.10. K5 y Sts inducen la separación entre Trx2 y ASK1 a tiempos cortos

Una vez confirmada la idea de que la unión entre ASK1 y Trx2 es sensible a especies reactivas del oxígeno (ROS), decidimos evaluar el efecto de los estímulos de muerte K5 y Sts sobre esta unión, debido a que estos estímulos inducen generación de ROS a tiempos cortos. En la figura 21 se muestra un experimento representativo de co-inmunoprecipitación (co-IP) entre ASK1 y Trx2 bajo el estímulo K5, como se puede apreciar, en la inmunoprecipitación no están cambiando los niveles de ASK1 bajo el tratamiento con K5, es decir, el procedimiento está funcionando correctamente y se está precipitando por igual a ASK1 en todas las condiciones probadas. En esta misma figura se muestra que los niveles de ASK1, Trx2 y GAPDH en el lisado celular total (input), no están cambiando de acuerdo a las distintas condiciones experimentales, lo cual permite confiar en que los cambios encontrados en el co-inmunoprecipitado se deben efectivamente a las condiciones experimentales. Debido a que estas inmunoprecipitaciones se realizaron con geles “híbridos” (geles con dos fases, en este caso la fase superior está al 7.5% y la inferior al 20%), al detectar a Trx2 (cuyo pesos es de 10 kDa) se observa una banda distorsionada en los extremos, esto se debe al cambio que sufren las proteínas al pasar de un medio poco denso a uno muy denso, implementar esta estrategia fue necesaria para poder visualizar en una misma membrana una proteína de 160 kDa y una de 10 kDa.

Dado que se ha demostrado que en la condición control (K25) no hay generación de ROS, en este ensayo se esperaría una señal elevada de Trx2 con respecto a las condiciones de muerte (K5) que como también se ha demostrado generan ROS durante las primeras horas del tratamiento. Se observa en la figura 21 que a partir de las 2 horas y hasta las 4 horas de tratamiento con K5 se presenta una

disminución notable en la unión entre ASK1 y Trx2 con respecto a K25, la cual se recupera a las 5.5 horas con este tratamiento. En estudios previos de nuestro laboratorio se ha reportado en este modelo de muerte un primer pico de generación de ROS a las 0.5 h en condiciones de K5 [51], lo cual sugeriría que esta primera generación de ROS podría ser la responsable de disociar la unión entre estas dos proteínas.

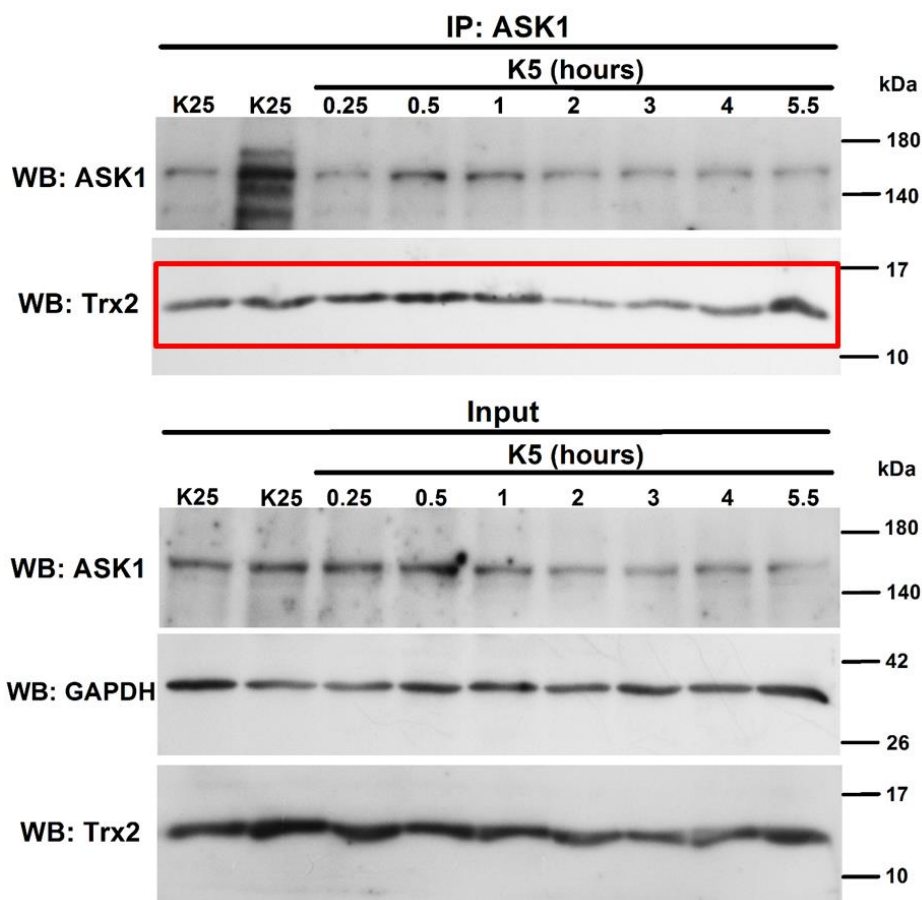


Figura 21. K5 disminuye la interacción entre ASK1 y Trx2 en NGC. Las neuronas granulares de cerebelo (NGC) se trataron con K25 y K5 en los tiempos indicados. Los lisados celulares se inmunoprecipitaron con anticuerpo contra ASK1. El inmunoblot se realizó contra Trx2. Se muestra la presencia de ASK1 y Trx2 tanto en la inmunoprecipitación como en el lisado celular (input). Los niveles de ASK1, Trx2 y GAPDH en el lisado celular total prácticamente no cambian. El nivel de expresión de Trx2 en el co-inmunoprecipitado refleja cuánto Trx2 está unido a ASK1 de acuerdo a las diferentes condiciones experimentales. K25 es el control negativo. GAPDH es el control de carga en el inmunoblot del lisado celular. n=2.

Análogamente se realizó co-IP mediante la inmunoprecipitación de ASK1 y revelando contra Trx2 bajo el tratamiento con estaurosporina (Sts). Se puede apreciar en la figura 22 que en la inmunoprecipitación prácticamente no están cambiando los niveles de ASK1 bajo el tratamiento con Sts. Los resultados

indican que los niveles totales de ASK1, Trx2 y GAPDH, bajo el estímulo de muerte Sts, prácticamente no cambian en el tiempo, lo cual es de esperarse. Sin embargo, a partir de las 4 h y hasta las 5.5 h se presenta una disminución en la unión entre ASK1 y Trx2 con respecto a K25. En estudios previos de nuestro laboratorio se ha reportado que en el caso de la estaurosporina se presenta un segundo pico de generación de ROS alrededor de las 4 h [51], lo cual sugeriría que este pico de generación de ROS podría ser la responsable de disociar la unión entre estas dos proteínas.

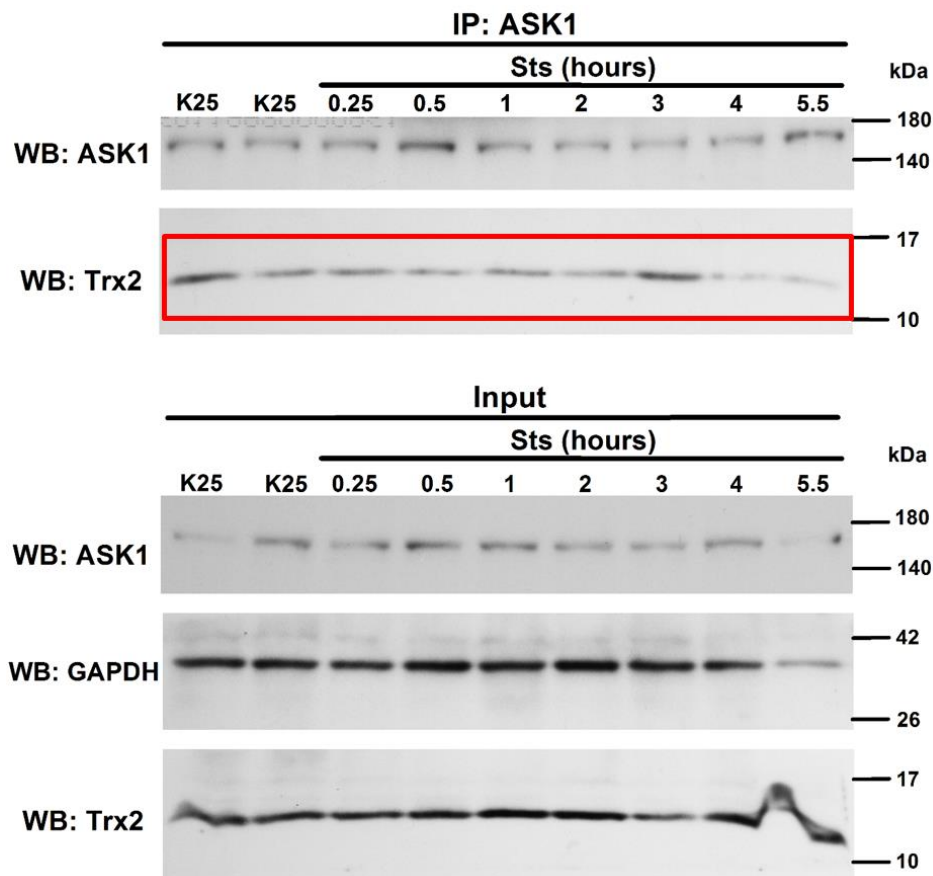


Figura 22. Sts disminuye la interacción entre ASK1 y Trx2 en NGC. Las neuronas granulares de cerebelo (NGC) se trataron con K25 y Sts en los tiempos indicados. Los lisados celulares se inmunoprecipitaron con anticuerpo contra ASK1. El inmunoblot se realizó contra Trx2. Se muestra la presencia de ASK1 y Trx2 tanto en la inmunoprecipitación como en el lisado celular (input). Los niveles de ASK1, Trx2 y GAPDH en el lisado celular total prácticamente no cambian. El nivel de expresión de Trx2 en el co-inmunoprecipitado refleja cuánto Trx2 está unido a ASK1 de acuerdo a las diferentes condiciones experimentales. K25 es el control negativo. GAPDH es el control de carga en el inmunoblot del lisado celular. n=2.

Interesantemente podríamos sugerir que en el caso de K5 el primer pico de generación de ROS estaría modulando la disociación entre ASK1 y Trx2, mientras que en el caso de Sts sería un segundo pico el

responsable de esta disociación. Idea basada en que se sabe que los mecanismos de muerte activados por K5 y Sts presentan algunas diferencias temporales entre sí.

6.11. K5 incrementa la activación de ASK1 a tiempos cortos (fosforilación de Thr845)

Una vez que se confirmó que las condiciones apoptóticas y de generación de ROS, K5 y Sts, inducen la disociación de Trx2 de ASK1, se esperaría que ASK1 quede a disposición para activarse, y de esta manera, desencadenar las vías de muerte apoptótica.

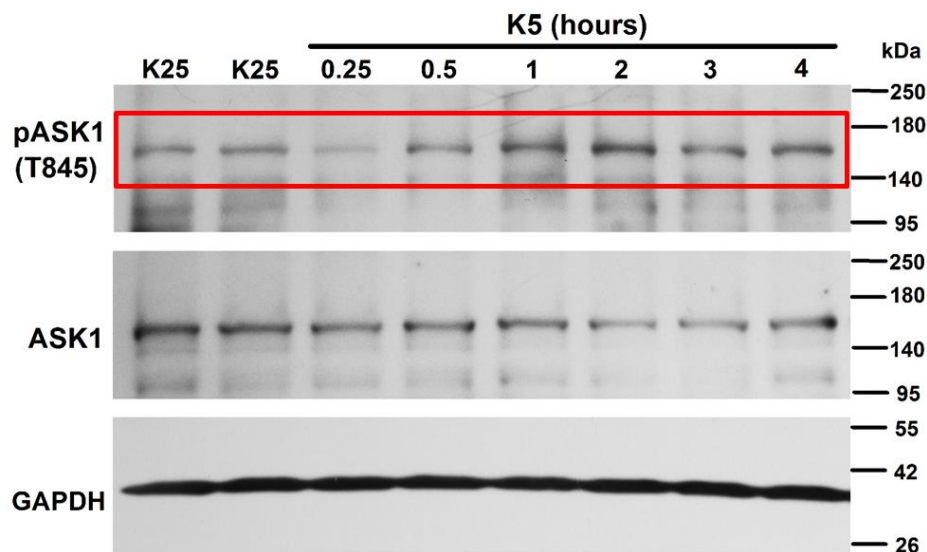


Figura 23. Curso temporal de la fosforilación de ASK1 bajo el estímulo de K5. Las neuronas granulares de cerebelo se trataron con K25 y K5 en los tiempos indicados. El inmunoblot se realizó contra ASK1 fosforilado en la treonina 845 (fosfotreonina que monitorea el estado de activación de ASK1), ASK1 total y GAPDH. K25 es el control negativo. GAPDH es el control de carga. ASK1: 160 kDa, GAPDH: 37 kDa. n=2.

En la figura 23 se muestra un experimento representativo de Western Blot donde se evaluó la fosforilación de ASK1 en la treonina 845 (Thr845, activación) bajo la estimulación de las NGC con K5 a lo largo del tiempo, K25 es el control negativo. Se observa que existe una tendencia en la que aumenta la fosforilación de ASK1 a partir de 1 h de privación de alto potasio y hasta las 4 h de tratamiento, es decir, ASK1 se está activando cuando se priva a las células de alto potasio (K25), dicha activación comienza a partir de la hora de tratamiento y se mantiene a lo largo del tiempo evaluado. Este resultado

es interesante, puesto que se ha reportado en varias líneas celulares que ASK1 induce apoptosis al activarse.

6.12. Sts incrementa la activación de ASK1 a tiempos cortos (desfosforilación de Ser967)

Posteriormente se analizó el estado de activación de ASK1 bajo la estimulación de las NGC con estaurosporina. Esto se abordó monitoreando la fosforilación de ASK1 en la serina 967 (Ser967) a lo largo del tiempo. Cuando ASK1 está inactivo se encuentra fosforilado en esta serina, y viceversa, en estado activo está desfosforilado en este residuo. En la figura 24 se muestra un experimento representativo de Western Blot donde se muestra la fosforilación de ASK1 en la Ser967 (fosforilación de inactivación) en neuronas granulares bajo el estímulo de Sts a lo largo del tiempo, K25 es el control negativo pues en esta condición no hay generación de ROS. Se observa una notable disminución en la fosforilación de ASK1 a partir de los 15 minutos y hasta las 4 horas del tratamiento con Sts, lo cual estaría reflejando que ASK1 se activa desde tiempos muy tempranos debido a la estaurosporina, con una inactivación a tiempos más largos. En la figura 25 se muestra la cuantificación tanto de la expresión de ASK1 así como de su estado de fosforilación en la condición de Sts. Aquí se puede observar que la expresión de ASK1 no cambia significativamente a lo largo del tiempo evaluado.

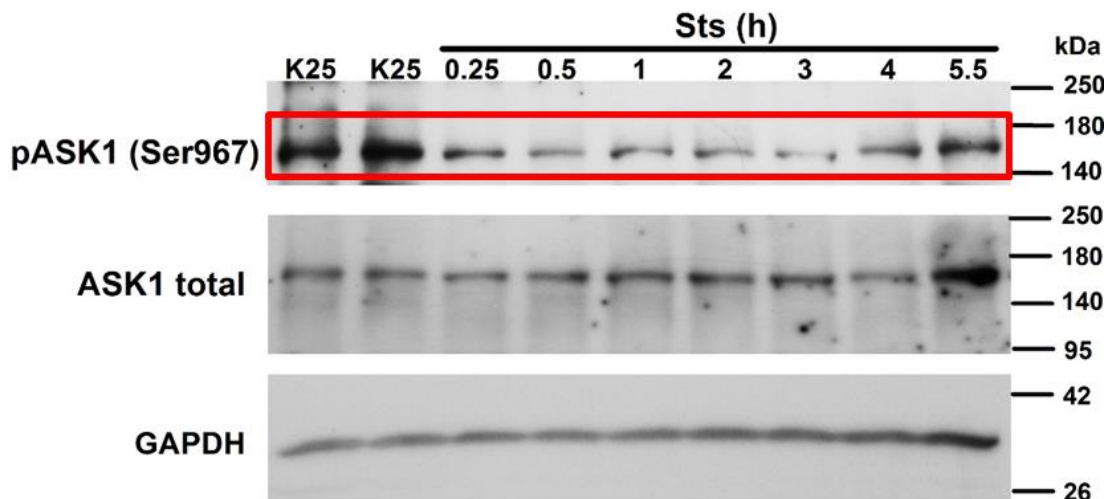


Figura 24. Efecto de Sts sobre la fosforilación en la Ser967 de ASK1 Las neuronas granulares de cerebelo se trataron con K25 y Sts (0.5 μ M) en los tiempos indicados. El inmunoblot se realizó contra ASK1 fosforilado en la serina 967 (fosfoserina que monitorea el estado de inactivación de ASK1), ASK1 total y GAPDH. K25 es el control positivo. GAPDH es el control de carga. ASK1: 160 kDa, GAPDH: 37 kDa. n=3.

Se puede observar que la fosforilación de ASK1 en esta serina disminuye significativamente desde los 30 min, llegando a una mayor desfosforilación a la hora y 2 h de tratamiento, y después ocurre un ligero aumento en la fosforilación. Es decir, ASK1 se activa desde los 30 min de tratamiento con Sts y de mantiene así hasta las 5.5 horas evaluadas con una ligera recuperación a tiempos largos. Nuevamente esto correlaciona con la generación de ROS producidas por Sts a los 30 min, y para verificar que esta activación de ASK1 se debe a las ROS es necesario verificarlo con el uso de antioxidantes. Además sería interesante evaluar si la privación de potasio (K5) produce un efecto similar en la fosforilación de la Ser967 de ASK1 a estos tiempos, pues con todos los resultados precedentes estamos observando que tanto Sts como K5 producen efectos similares en las vías de señalización activadas por estrés, lo cual reflejaría que comparten mecanismos, aunque temporalmente diferentes, para llevar a cabo un proceso de muerte apoptótica.

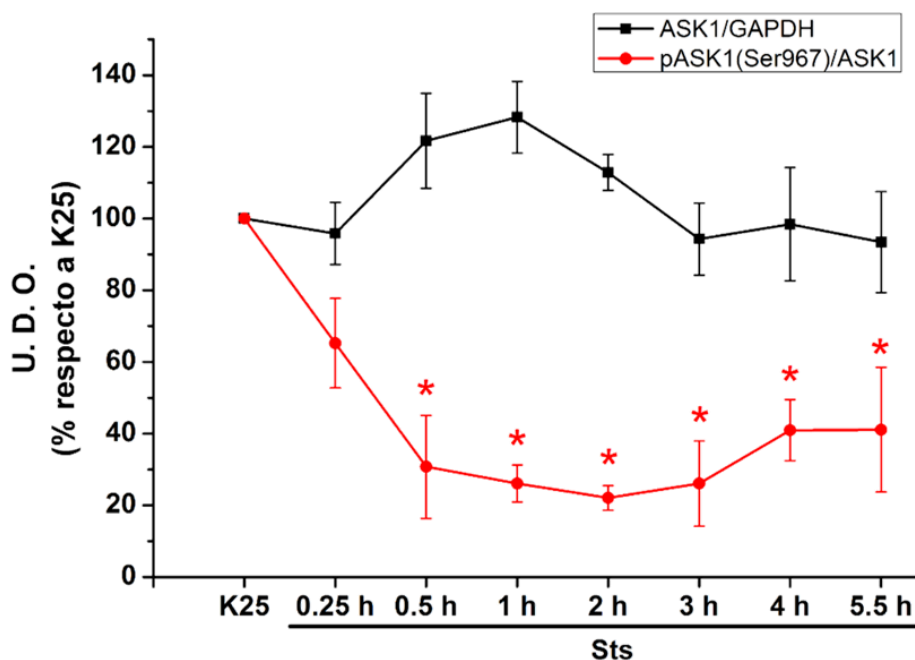


Figura 25. Curso temporal de la fosforilación en la Ser967 de ASK1 bajo el estímulo de Sts. Las neuronas granulares de cerebelo se trataron con K25 y Sts en los tiempos indicados. La densitometría se realizó para ASK1 fosforilado en la serina 967 (Ser967), ASK1 total y GAPDH, obteniendo las razones ASK1/GAPDH y pASK1/ASK1. K25 es el control positivo. GAPDH es el control de carga, n=3. U. D. O.: Unidades de densidad óptica. n=3.

7. Discusión

Encontramos que dos condiciones que inducen muerte apoptótica como la privación de potasio (K5) y la estaurosporina (Sts) generan ROS a tiempos cortos en neuronas granulares de cerebelo (NGC), aunque con diferente curso temporal. Particularmente, hay una generación significativa alrededor de las 4 h en el caso de K5, y alrededor de los 30 minutos en el caso de la Sts (Figura 5). Por otra parte, se ha observado previamente que la sobreexpresión de TXNIP conduce a la activación de la vía mitocondrial intrínseca de la apoptosis [115] y que su sobreexpresión induce apoptosis en cardiomiocitos [111]. En nuestro modelo de muerte neuronal, encontramos que bajo una condición de supervivencia (K25) se suprime la expresión de TXNIP, mientras que bajo una condición oxidante (H_2O_2) se induce su expresión, indicando que TXNIP es una proteína sensible al estado redox (Figura 8).

De igual manera las condiciones apoptóticas K5 y Sts indujeron la expresión de TXNIP en las neuronas granulares de cerebelo (Figura 6 y Figura 9). En el caso de K5, se presentó un pico de expresión de TXNIP en las primeras 5.5 h (Figura 6), el cual está temporalmente relacionado con el incremento en la generación de ROS inducida por K5 (Figura 5a). Por su parte, bajo la estimulación con Sts, la expresión de TXNIP comienza desde las 3 h y se mantiene incrementada hasta las 5.5 h (Figura 9), lo cual también corresponde con el incremento en la generación de ROS inducida por Sts (Figura 5b), sugiriendo una estrecha relación entre la expresión de TXNIP y las ROS producidas en condiciones de muerte, lo que podría estar relacionado con la activación e vías de señalización involucradas en la apoptosis neuronal.

Para corroborar que las ROS generadas por K5 y Sts están involucradas en la regulación de la expresión de TXNIP, usamos diferentes inhibidores de ROS (Figura 7 y Figura 10). En el primer caso, encontramos que los antioxidantes EUK-134 y Ebselen disminuyeron significativamente la expresión de TXNIP inducida por K5, y los inhibidores de la enzima NADPH Oxidasa (NOX), DPI y AEBSF, causaron una disminución aún más notable (Figura 7), sugiriendo que las ROS generadas por K5, provienen, al menos en parte, de una NOX. En este sentido, se reportó recientemente que las ROS producidas por NOX1 oxidan las cisteínas reactivas de Akt promoviendo su interacción con la fosfatasa PP2A, la cual inhibe la actividad de Akt y por tanto induce apoptosis en cardiomiocitos [96]. En el segundo caso, encontramos que Ebselen, AEBSF y una concentración alta de EUK-134 causaron una disminución significativa en la expresión de TXNIP inducida por Sts, mientras que DPI disminuyó la expresión de TXNIP al nivel de la condición despolarizante K25 (Figura 10), sugiriendo que las ROS generadas por Sts provienen no sólo de la NOX, sino también de otras fuentes.

Recientemente, se describió el mecanismo a través del cual la activación de la vía de señalización PI3K/Akt conduce a la inhibición tanto de la expresión del RNA mensajero como de la proteína de TXNIP, en un modelo de actividad sináptica [120]. Por ello, nos interesó evaluar si la vía Akt-TXNIP participa en un modelo neuronal de muerte apoptótica activada por ROS. Aquí proporcionamos evidencia de que la participación de la vía de señalización PI3K/Akt sobre la expresión de TXNIP está, al menos parcialmente, mediada a través de las ROS generadas por estímulos apoptóticos, en un curso temporal finamente regulado.

Por otra parte, los dos estímulos apoptóticos (K5 y Sts) suprimieron la activación de Akt de una manera tiempo-dependiente (Figura 11 y Figura 12). Es importante mencionar que en condiciones basales (condiciones despolarizantes, K25) Akt está activado en las neuronas granulares de cerebelo. Sin embargo, notamos diferencias temporales en la inhibición de esta cinasa. Mientras que en el caso de K5 (Figura 11) Akt se inactiva desde la hora de tratamiento, en el caso de Sts dicha inactivación ocurre 30 minutos antes (Figura 12). Esto puede deberse a diferencias temporales en los mecanismos que se activan una vez que se exponen las NGC ya sea con K5 o Sts y que de alguna forma afecta la señalización PI3K/Akt, o simplemente a las diferencias en la magnitud en el aumento de las ROS entre ambos estímulos. En este sentido, recientemente Wani *et al.* [95] reportó que las ROS inducidas por PDGF causan la oxidación de la Cys124 de Akt2 modulando su inactivación. Además, H₂O₂ indujo la formación de un puente disulfuro entre la Cys297 y Cys311 en Akt, además de la subsecuente desfosforilación mediada por PP2A. En este sentido, se sabe que la sobreexpresión de glutarredoxina (Grx) reduce a Akt, lo cual rompe su unión a PP2A, lo cual permite la fosforilación sostenida de Akt, inhibiendo la apoptosis en células cardiacas [94], indicando una acción antiapoptótica de Grx a través de la regulación redox de Akt. Otra posibilidad es que las ROS generadas por condiciones apoptóticas alteren el estado redox de PTEN, puesto que se sabe que el H₂O₂ oxida la Cys124 en el sitio activo de PTEN lo que forma un puente disulfuro intramolecular con la Cys71 [136].

También encontramos que tanto Akt como TXNIP son proteínas sensibles al estado redox, puesto que el peróxido de hidrógeno es capaz de inducir, por un lado, la inactivación de Akt y, por otro, la expresión de TXNIP (Figura 8 y Figura 13). Estos efectos parecen ser exclusivos del H₂O₂ puesto que el sistema de la xantina oxidasa (producción de anión superóxido) no alteró el estado de activación de Akt, ni el de la expresión de TXNIP (dato no mostrado). Además se pudo corroborar que tanto la inactivación de Akt como la expresión de TXNIP son dos fenómenos conectados en nuestro modelo neuronal de muerte apoptótica, pues al utilizar un inhibidor de la vía de PI3K/Akt bajo una condición de supervivencia (K25, condición despolarizante) se inhibe la fosforilación de Akt y se induce la expresión de TXNIP (Figura 15),

además de existir una fina regulación entre la actividad de Akt y la expresión de esta proteína proapoptótica (Figura 16 y Figura 17).

Estos datos refuerzan la idea de que muy probablemente la expresión de TXNIP está siendo regulada por la vía de PI3K/Akt con el fin de preservar la supervivencia de la neurona. Al respecto, Papadia *et al.* [120] reportaron que el gen de TXNIP contiene un sitio FOXO funcional que media la inactivación del promotor, dependiente de la actividad neuronal. Ellos proponen un modelo donde la actividad sináptica “apaga” la transcripción de TXNIP al inducir la vía de señalización PI3K/Akt y provocar la fosforilación de los factores de transcripción FOXO (en particular FOXO1 y FOXO3, las isoformas predominantemente neuronales), la subsecuente disociación del promotor de TXNIP y la exportación fuera del núcleo [120]. En esta línea de pensamiento, nosotros proponemos que las ROS generadas por K5 y Sts provocan la inactivación de Akt, lo cual permite que se active la maquinaria que lleva a cabo la expresión de TXNIP (Figura 18).

Una vez que TXNIP se ha expresado, éste podría participar en la muerte celular. Se sabe que TXNIP interactúa con la forma reducida de tiorredoxina, inhibe su actividad bioquímica y, por ende, causa una vulnerabilidad a la muerte celular [83, 137]. En este sentido se ha propuesto el concepto de “redoxisoma” para referirse al complejo Trx-TXNIP como el transductor de señalización relativo al estado redox bajo condiciones normales y patológicas [81]. Hay múltiples reportes del estudio de la interacción TXNIP-Trx1 [78, 79, 103-105], sobre todo en líneas celulares que puede jugar un papel en la muerte neuronal. Interesantemente, se sabe que ASK1 es la principal proteína que se mantiene en unión con Trx1 en condiciones basales [104, 105, 42]. TXNIP es el principal regulador de la interacción Trx1-ASK1. Específicamente dicha regulación se lleva a cabo por la unión de TXNIP a las cisteínas catalíticas de Trx1, lo cual inhibe tanto la actividad de Trx1 y su capacidad para unirse a ASK1 [79].

Mientras que una gran cantidad de estudios se han enfocado en Trx1 y ASK1 citosólico, datos más recientes muestran que Trx2 también interactúa con ASK1, pero a nivel mitocondrial, inhibe su actividad y previene de la apoptosis inducida por ASK1 [56, 112]. En células beta pancreáticas, bajo condiciones fisiológicas, TXNIP se localiza en el núcleo y bajo estrés oxidativo TXNIP transloca a la mitocondria. En la mitocondria, TXNIP se une a Trx2 y la oxida, lo cual provoca la pérdida de la unión entre Trx2 y ASK1 y de esta manera ASK1 se libera y puede activarse promoviendo la inducción de la vía mitocondrial de apoptosis con liberación de citocromo c y fragmentación de caspasa 3, dando inicio a la apoptosis de las células beta [77].

En relación a lo anterior, nosotros exploramos la posibilidad de que en nuestro modelo de muerte neuronal exista una interacción TXNIP-Trx2, y nuestros datos apoyan la idea de la existencia de estas moléculas en la mitocondria y que la condición apoptótica K5 induce la interacción entre estas dos proteínas a tiempos cortos (Figura 19). Sorprendentemente, dicha interacción se parece mucho al patrón observado con la expresión de TXNIP bajo el estímulo de K5 (Figura 8), sugiriendo que una vez que TXNIP se exprese, éste se uniría a Trx2 para favorecer la apoptosis neuronal, a nivel de la mitocondria, lo cual podría corroborarse realizando los experimentos correspondientes en fracción mitocondrial.

El siguiente paso en esta línea de pensamiento fue evaluar si existía la interacción entre Trx2 y ASK1, pues el papel proapoptótico de TXNIP está estrechamente vinculado con el papel de ASK1 en la muerte celular. Nosotros observamos que en nuestro modelo de muerte neuronal, bajo condiciones despolarizantes, existe el complejo Trx2-ASK1 y que bajo condiciones de estrés oxidativo (H_2O_2) se induce la separación de este complejo (Figura 20), entre más severo sea el estrés oxidativo se presenta una mayor separación entre estas dos proteínas, indicando mayor liberación de la cinasa proapoptótica ASK1 y, por ende, mayor repercusión del estrés oxidativo en la muerte neuronal. Al analizar nuestras condiciones apoptóticas K5 y Sts, observamos que estos dos estímulos inducen la disociación de Trx2 de ASK1 (Figura 21 y Figura 22) con un patrón temporal muy similar al encontrado en la expresión de TXNIP bajo K5 y Sts (Figura 6 y Figura 9). Es importante mencionar que el anticuerpo contra Trx2 resultó más eficiente para realizar los experimentos de inmunoprecipitación que el correspondiente contra ASK1, en varios experimentos se hizo la inmunoprecipitación inversa, pero la baja eficiencia del anticuerpo contra ASK1 no permitió concluir claramente.

Estos datos sugieren nuevamente, que una vez que TXNIP se expresa bajo condiciones apoptóticas y de generación de ROS, se une físicamente a Trx2, lo que al mismo tiempo disociaría la unión entre Trx2 y ASK1, pues en condiciones basales Trx2 está unido a ASK1 en la mitocondria. De esta manera, ASK1 se libera de la represión de Trx2 y podría activarse para desencadenar el proceso de muerte. En este sentido, lo siguiente que corroboramos fue analizar el estado de activación de la cinasa ASK1. Al respecto, observamos que estas dos condiciones apoptóticas, K5 y Sts, fueron capaces de inducir la activación de ASK1 a tiempos cortos (Figura 23, 24 y 25), sólo que esta vez el patrón no se parece al encontrado en la expresión de TXNIP por estos dos estímulos (Figura 6 y Figura 9), pues la activación de ASK1, debido a K5, parece comenzar a partir de la hora de tratamiento, mientras que con Sts comienza desde los 30 min de estimulación.

La activación temprana de ASK1, antes de lo esperado de acuerdo a los resultados previos, podría deberse a que una poza de ASK1 esté unida a Trx1, a nivel citosólico. En este sentido, en mis estudios de maestría detectamos la interacción entre ASK1 y Trx1 en condiciones despolarizantes y a tiempos cortos tanto K5 como Sts inducen la disociación de estas proteínas. En el caso de K5, reportes previos de nuestro laboratorio, han mostrado la existencia de un pequeño pico de generación de ROS alrededor de los 30 minutos de estimulación, además de que en mis estudios de maestría, observamos la disociación entre ASK1 y Trx1 desde los 30 min. Caso muy parecido con la estaurosporina, donde la separación entre ASK1 y Trx1 se presenta de forma discreta a partir de los 30 min y se vuelve muy significativa a las 4 h. La temprana activación de ASK1 con Sts puede deberse a esa discreta separación a los 30 min entre Trx1 y ASK1.

Estos datos nos permiten comprender el papel de TXNIP en la muerte neuronal al analizar su relación tanto con Trx1 (a nivel citosólico) como con Trx2 (nivel mitocondrial), y de esta manera, entender el estado de activación de ASK1. ASK1 se encuentra tanto en la mitocondria como en el citosol, por ende aún falta entender los mecanismos finos que promueve ASK1 cuando se activa antes de que estos mecanismos activen a las vías de JNK y p38, vías de señalización que se sabe muy bien, participan en la muerte apoptótica.

En su conjunto, estos datos sugieren que TXNIP podría participar en la muerte de las neuronas granulares de cerebelo a través de inhibir a Trx1 y/o Trx2, lo cual permitiría la activación de ASK1 y, por ende, la activación de las vías de señalización río abajo como las de JNK y p38, pues en las NGC se ha mostrado que K5 y Sts causan muerte apoptótica con activación de las vías de JNK y p38 [51, 52]. Por otra parte, se sabe que Akt, en su estado activo, fosforila directamente a ASK1 en la serina 83, lo cual reprime la apoptosis [94]. Por tanto, en este proyecto no se excluye la posibilidad de que un conjunto de las cinasas de Akt participen en la represión de la expresión de TXNIP, mientras que otro, en la fosforilación de ASK1 y, por tanto, su inhibición.

Hay un reporte que indica que en las neuronas granulares de cerebelo, el gen de TXNIP pertenece a los genes de respuesta temprana cuya expresión está directamente regulada por el flujo de calcio durante la apoptosis neuronal [82], lo cual sugiere que el calcio también juega un papel importante en la regulación de la expresión de TXNIP en este modelo de apoptosis neuronal. Sería muy interesante evaluar si en este modelo las ROS alteran los niveles de calcio intracelular o viceversa.

En resumen, nuestros hallazgos indican que la inhibición de la señalización de Akt a través de la generación de ROS conduce a la expresión de TXNIP (FIG 18). En este contexto, las ROS generadas por condiciones apoptóticas inducen la expresión de TXNIP, el cual se une a Trx2 y, como en condiciones basales existe el complejo Trx2-ASK1, esto permite la liberación de ASK1 para llevar a cabo su activación, todo esto en su conjunto contribuye a la muerte apoptótica de las NGC. Nuestro trabajo aporta nueva información acerca de los mecanismos involucrados en la muerte neuronal en respuesta a especies reactivas del oxígeno, sugiriendo en el contexto neurodegenerativo, que la inhibición de TXNIP puede representar una nueva aproximación para reducir o combatir la muerte neuronal inducida por estrés oxidativo.

En el siguiente esquema se muestra la propuesta a la que se llegó tomando en cuenta los resultados de este trabajo de doctorado junto con los resultados previos de maestría.

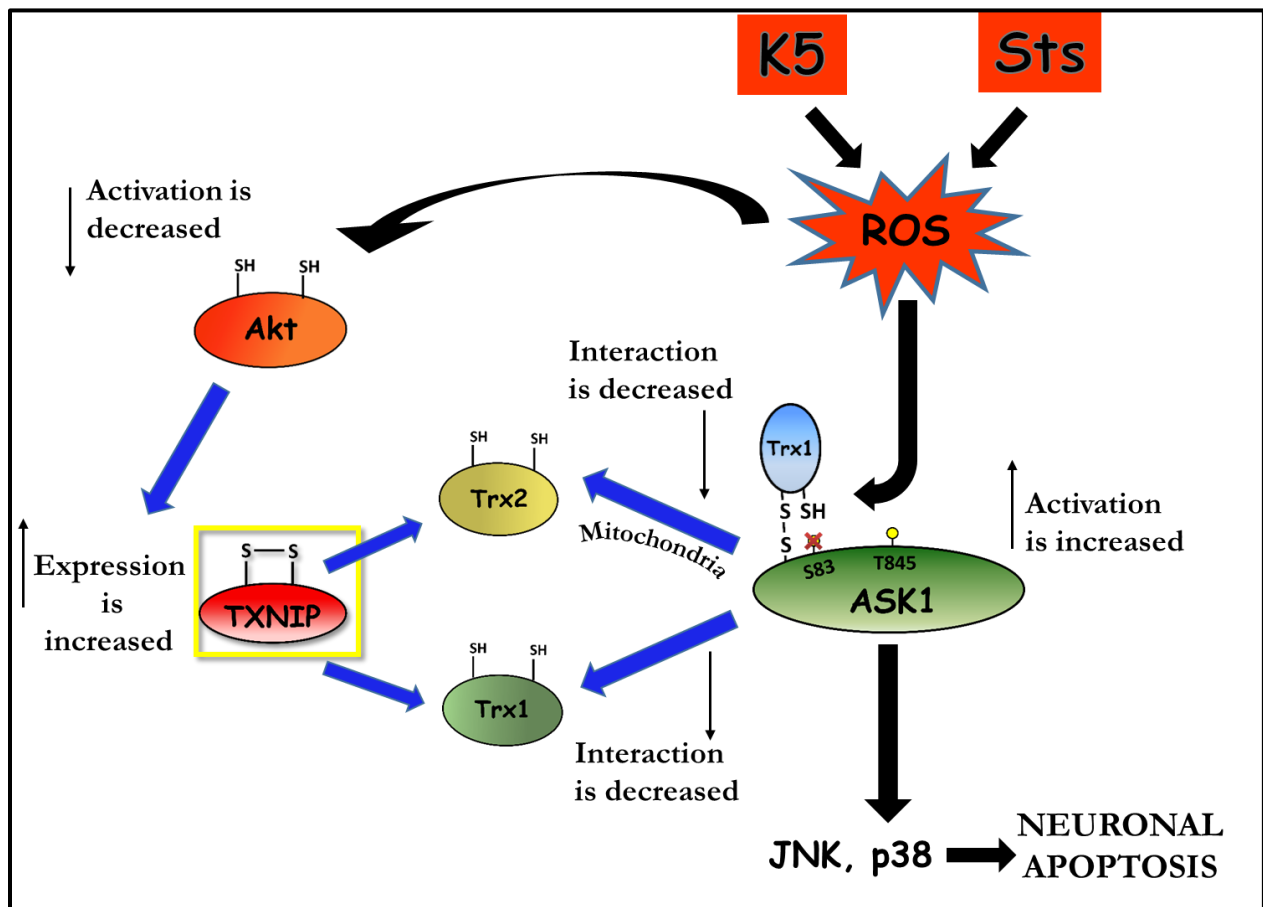


Figura 26. Mecanismos activados por las condiciones apoptóticas K5 y Sts en NGC. En el modelo de las neuronas granulares de cerebelo (NGC) se ha mostrado que bajo condiciones despolarizantes *in vitro* (25 mM de KCl, K25) la cinasa Akt está activa y por tanto, fomentando mecanismos de supervivencia. Pero, bajo condiciones

apoptóticas como K5 y Sts se induce la generación de ROS, las cuales, por un lado, median la inactivación de Akt y, por otro, la disociación de Trx1 de ASK1. En el primer caso, cuando las ROS inactivan a Akt, se permite la expresión de TXNIP, el cual se uniría a Trx1 en el citoplasma y a Trx2 en la mitocondria (Trx2 es una proteína mitocondrial), esta unión promovería al mismo tiempo la disociación de estas tiorredoxinas con ASK1, permitiendo que ASK1 pueda activarse y desencadenar las vías de señalización que llevan a la apoptosis neuronal. En el segundo caso, cuando las ROS inducen la disociación de Trx1 de ASK1 directamente, éste sería un mecanismo que ocurre de manera más temprana, provocando una activación de ASK1 a tiempos más cortos. En su conjunto, todos estos mecanismos convergen en la activación de ASK1, lo cual llevaría a la activación de las vías de muerte JNK y p38 y de esta manera, promover apoptosis neuronal activada por especies reactivas de oxígeno.

8. Conclusiones

- 1) K5 y Sts inducen generación de ROS a tiempos cortos: K5 a partir de las 3.5 h, mientras que Sts desde los 30 minutos y hasta las 5.5 h. En comparación, K5 produce una mayor cantidad de células con ROS que Sts.
- 2) K5 y Sts inducen la expresión de TXNIP a tiempos cortos. En el caso de K5, esta expresión se correlaciona con la generación de ROS encontrada bajo esta condición de muerte.
- 3) La expresión de TXNIP inducida por K5 y Sts está mediada por ROS, y una de las fuentes que parece estar aportando estas ROS es la NADPH Oxidasa.
- 4) El estrés oxidativo induce la expresión de TXNIP en NGC, indicando que TXNIP es una proteína sensible al estado redox.
- 5) K5 y Sts promueven la inactivación de la cinasa Akt. Este patrón de inactivación correlaciona con el de la generación de ROS tanto en K5 como en Sts.
- 6) El estrés oxidativo induce la inactivación de Akt en NGC, indicando que Akt o sus reguladores río arriba son sensibles al estado redox.
- 7) La actividad de Akt y la expresión de TXNIP son dos mecanismos acoplados puesto que al inactivarse Akt se permite la expresión de TXNIP y viceversa. Estos mecanismos pueden ser de gran relevancia en la muerte apoptótica neuronal.

- 8) K5 induce la interacción entre TXNIP y Trx2, interacción que correlaciona con el patrón de expresión de TXNIP inducida por K5.
- 9) El estrés oxidativo induce la disociación entre Trx2 y ASK1, permitiendo la liberación de ASK1 de la represión de Trx2.
- 10) K5 y Sts inducen la disociación de Trx2 de ASK1 a tiempos cortos. En ambos casos esta separación se correlaciona con el patrón de expresión de TXNIP inducida por K5 y Sts, sugiriendo que TXNIP se une rápidamente a Trx2, lo cual permitiría su separación de ASK1.
- 11) K5 y Sts inducen la activación de la cinasa proapoptótica ASK1 a tiempos cortos.

8.1 Conclusión general

Las ROS generadas por privación de potasio y estaurosporina inducen la inactivación de la vía PI3K/Akt, lo cual permite la expresión de TXNIP. Posteriormente TXNIP se une a Trx2, promoviendo la disociación de Trx2 de ASK1, lo cual estimula la activación de ASK1 y muerte neuronal.

9. Perspectivas

El presente trabajo aporta información acerca de una vía de señalización que parece ser relevante en el contexto de la muerte neuronal por estrés oxidativo, a saber, la vía Akt-TXNIP-Trx2-ASK1. En lo subsiguiente, se tendrán que hacer experimentos para conocer a detalle la localización subcelular en la que actúan estas proteínas, por ejemplo, Trx2 es una proteína que radica exclusivamente en la mitocondria, así que todo indicaría que la ASK1 que participa en esta vía también se encuentra en la mitocondria, y que una vez activa desencadena una vía de muerte a nivel de la mitocondria, lo cual es necesario aún demostrar.

Asimismo, hay que comprobar que una vez que ASK1 se activa actúa a través de la vía de las MAP cinasas para llevar a la activación de JNK y p38 (proteínas cinasas activadas por estrés) en este modelo de muerte neuronal apoptótica.

Otro de los puntos a considerar en un futuro próximo es dilucidar a qué nivel las ROS actúan sobre la vía de señalización Akt-TXNIP-Trx2-ASK1, al respecto, hay varias hipótesis. La primera de ellas, es que las ROS actúen sobre los reguladores río arriba de Akt como PTEN o PI3K, o incluso sobre Akt mismo pues hay varios reportes que indican la naturaleza redox de Akt. La segunda, es que hay una fuerte participación de las ROS sobre la unión ASK1-Trx2 (e incluso sobre la unión ASK1-Trx1, a nivel citoplasmático), las cuales oxidarían las cisteínas de Trx2 provocando su disociación de ASK1 y la posterior activación de ASK1. Por ello, resulta imprescindible investigar la localización dentro de la célula de estas proteínas, así como la fuente de ROS que estaría afectando a cada uno de los puntos probables de activación de la vía. La principal fuente que parece participar es la NADPH Oxidasa, aunque no se descarta la participación de la mitocondria, pues gran parte de la vía, se sugiere, participa a nivel de la mitocondria.

10. Figuras suplementarias

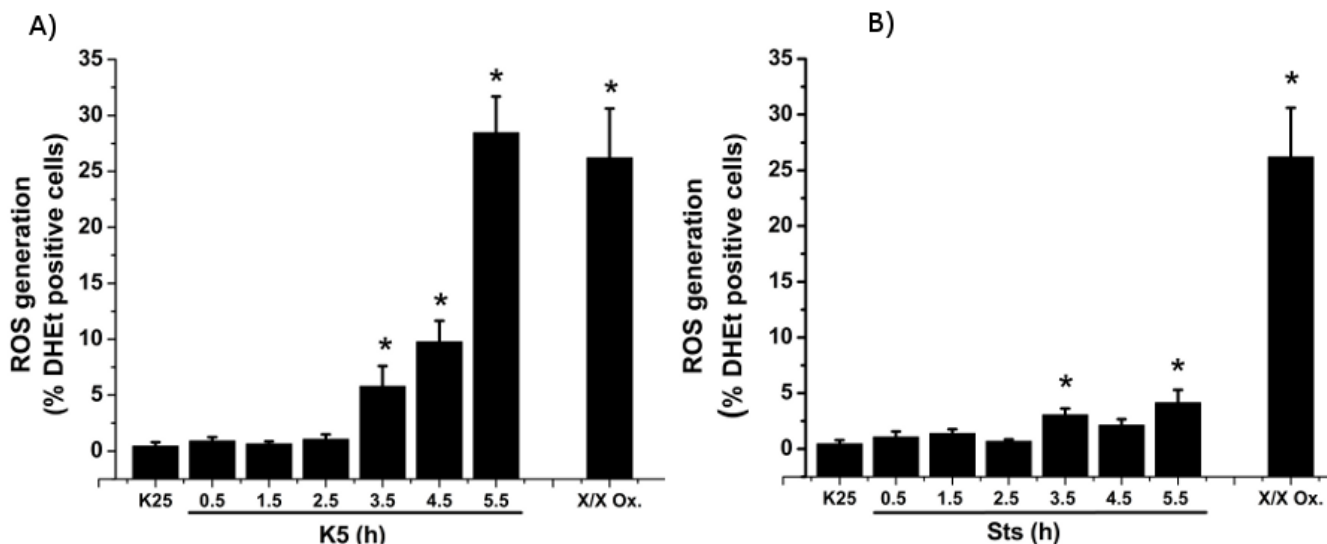


Figura suplementaria S1. La generación de ROS inducida por K5 y Sts evaluada como células positivas a DHEt. La generación de ROS en cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo (NGC) se evaluó como células positivas a DHEt. Las NGC se cultivaron en medio K25 como se describe en Materiales y Métodos. Después de 7 días *in vitro* (DIV) las neuronas se **A)** transfirieron a un medio K5 y las células positivas a DHEt se contaron a los tiempos indicados, **B)** o se trataron con Sts (0.5 μ M) desde las 0.5 h hasta las 5.5 h y se contaron las células positivas a DHEt. Los resultados se expresan como el porcentaje de células positivas a DHEt del total de células contadas por campo. El sistema de la Xantina/Xantina oxidasa se usó como control positivo. Los datos son el promedio \pm error estándar de 5 experimentos independientes. * $p < 0.05$ significativamente diferente de K25. X/X Ox: Xantina/Xantina oxidasa. n=5.

11. Bibliografía

1. Olgúin-Albuerne M, Z.C.M., J. M, *Role of Reactive Oxygen Species As Signaling Molecules in the Regulation of Physiological Processes of the Nervous System*. In: Reactive Oxygen Species, Lipid Peroxidation and Protein Oxidation (Angel C, ed), 2014: p. p. 169-202.
2. Barnham, K.J., C.L. Masters, and A.I. Bush, *Neurodegenerative diseases and oxidative stress*. Nat Rev Drug Discov, 2004. **3**(3): p. 205-14.
3. Blomgren, K., M. Leist, and L. Groc, *Pathological apoptosis in the developing brain*. Apoptosis, 2007. **12**(5): p. 993-1010.
4. Cozzolino, M., et al., *Apaf1 mediates apoptosis and mitochondrial damage induced by mutant human SOD1s typical of familial amyotrophic lateral sclerosis*. Neurobiol Dis, 2006. **21**(1): p. 69-79.
5. Gao, Y., 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. **25**(6): p. 694-712.
6. Cohen, G.M., *Caspases: the executioners of apoptosis*. Biochem J, 1997. **326** (Pt 1): p. 1-16.
7. Alavez, S., D. Pedroza, and J. Moran, *Mechanisms of cell death by deprivation of depolarizing conditions during cerebellar granule neurons maturation*. Neurochem Int, 2003. **43**(6): p. 581-90.
8. Martin, D.P., et al., *Inhibitors of protein synthesis and RNA synthesis prevent neuronal death caused by nerve growth factor deprivation*. J Cell Biol, 1988. **106**(3): p. 829-44.
9. Oppenheim, R.W., et al., *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. **138**(1): p. 104-13.
10. Gil, J., et al., *Cytosolic and mitochondrial ROS in staurosporine-induced retinal cell apoptosis*. Free Radic Biol Med, 2003. **35**(11): p. 1500-14.
11. Nardi, N., et al., *Biochemical and temporal analysis of events associated with apoptosis induced by lowering the extracellular potassium concentration in mouse cerebellar granule neurons*. J Neurochem, 1997. **68**(2): p. 750-9.
12. Leist, M. and M. Jaattela, *Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(8): p. 589-98.
13. Strasser, A., L. O'Connor, and V.M. Dixit, *Apoptosis signaling*. Annu Rev Biochem, 2000. **69**: p. 217-45.
14. Kumar, S., *Caspase function in programmed cell death*. Cell Death Differ, 2007. **14**(1): p. 32-43.
15. Kaufmann, S.H. and M.O. Hengartner, *Programmed cell death: alive and well in the new millennium*. Trends Cell Biol, 2001. **11**(12): p. 526-34.
16. Hengartner, M.O., *The biochemistry of apoptosis*. Nature, 2000. **407**(6805): p. 770-6.
17. Dickman, M.B., *Redox regulation of apoptosis*. In: Redox Biochemistry (edited by Ruma Banerjee), 2008: p. p. 158-162.
18. Valko, M., et al., *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. Int J Biochem Cell Biol, 2007. **39**(1): p. 44-84.
19. Pourova, J., et al., *Reactive oxygen and nitrogen species in normal physiological processes*. Acta Physiol (Oxf), 2010. **198**(1): p. 15-35.
20. Kamata, H. and H. Hirata, *Redox regulation of cellular signalling*. Cell Signal, 1999. **11**(1): p. 1-14.
21. Droge, W., *Free radicals in the physiological control of cell function*. Physiol Rev, 2002. **82**(1): p. 47-95.
22. Veal, E. and A. Day, *Hydrogen peroxide as a signaling molecule*. Antioxid Redox Signal, 2011. **15**(1): p. 147-51.

23. Holmgren, A., et al., *Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems*. Biochem Soc Trans, 2005. **33**(Pt 6): p. 1375-7.
24. Finkel, T., *Signal transduction by reactive oxygen species*. J Cell Biol, 2011. **194**(1): p. 7-15.
25. Go, Y.M., J.D. Chandler, and D.P. Jones, *The cysteine proteome*. Free Radic Biol Med, 2015. **84**: p. 227-245.
26. Jonsson, T.J. and W.T. Lowther, *The peroxiredoxin repair proteins*. Subcell Biochem, 2007. **44**: p. 115-41.
27. Rinna, A., M. Torres, and H.J. Forman, *Stimulation of the alveolar macrophage respiratory burst by ADP causes selective glutathionylation of protein tyrosine phosphatase 1B*. Free Radic Biol Med, 2006. **41**(1): p. 86-91.
28. Forman, H.J., J.M. Fukuto, and M. Torres, *Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers*. Am J Physiol Cell Physiol, 2004. **287**(2): p. C246-56.
29. Bao, L., et al., *Mitochondria are the source of hydrogen peroxide for dynamic brain-cell signaling*. J Neurosci, 2009. **29**(28): p. 9002-10.
30. Kannan, K. and S.K. Jain, *Oxidative stress and apoptosis*. Pathophysiology, 2000. **7**(3): p. 153-163.
31. Filomeni, G. and M.R. Ciriolo, *Redox control of apoptosis: an update*. Antioxid Redox Signal, 2006. **8**(11-12): p. 2187-92.
32. Ren, X., et al., *Redox Signaling Mediated by Thioredoxin and Glutathione Systems in the Central Nervous System*. Antioxid Redox Signal, 2017. **27**(13): p. 989-1010.
33. Cross, J.V. and D.J. Templeton, *Regulation of signal transduction through protein cysteine oxidation*. Antioxid Redox Signal, 2006. **8**(9-10): p. 1819-27.
34. Mieyal, J.J., et al., *Molecular mechanisms and clinical implications of reversible protein S-glutathionylation*. Antioxid Redox Signal, 2008. **10**(11): p. 1941-88.
35. Widmann, C., et al., *Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human*. Physiol Rev, 1999. **79**(1): p. 143-80.
36. Kyriakis, J.M. and J. Avruch, *Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation*. Physiol Rev, 2001. **81**(2): p. 807-69.
37. Winter-Vann, A.M. and G.L. Johnson, *Integrated activation of MAP3Ks balances cell fate in response to stress*. J Cell Biochem, 2007. **102**(4): p. 848-58.
38. Takeda, K., et al., *Apoptosis signaling kinases: from stress response to health outcomes*. Antioxid Redox Signal, 2011. **15**(3): p. 719-61.
39. Tibbles, L.A. and J.R. Woodgett, *The stress-activated protein kinase pathways*. Cell Mol Life Sci, 1999. **55**(10): p. 1230-54.
40. Ichijo, H., et al., *Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways*. Science, 1997. **275**(5296): p. 90-4.
41. Wang, X.S., et al., *Molecular cloning and characterization of a novel protein kinase with a catalytic domain homologous to mitogen-activated protein kinase kinase kinase*. J Biol Chem, 1996. **271**(49): p. 31607-11.
42. Saitoh, M., et al., *Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1*. EMBO J, 1998. **17**(9): p. 2596-606.
43. Nishitoh, H., et al., *ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats*. Genes Dev, 2002. **16**(11): p. 1345-55.
44. Takeda, K., et al., *Involvement of ASK1 in Ca²⁺-induced p38 MAP kinase activation*. EMBO Rep, 2004. **5**(2): p. 161-6.
45. Matsuzawa, A., et al., *ROS-dependent activation of the TRAF6-ASK1-p38 pathway is selectively required for TLR4-mediated innate immunity*. Nat Immunol, 2005. **6**(6): p. 587-92.
46. Kanamoto, T., et al., *Role of apoptosis signal-regulating kinase in regulation of the c-Jun N-terminal kinase pathway and apoptosis in sympathetic neurons*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(1): p. 196-204.
47. Hatai, T., et al., *Execution of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)-induced apoptosis by the mitochondria-dependent caspase activation*. J Biol Chem, 2000. **275**(34): p. 26576-81.

48. Tobiume, K., et al., *ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis*. EMBO Rep, 2001. **2**(3): p. 222-8.
49. Takeda, K., et al., *Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) induces neuronal differentiation and survival of PC12 cells*. J Biol Chem, 2000. **275**(13): p. 9805-13.
50. Sayama, K., et al., *Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) is an intracellular inducer of keratinocyte differentiation*. J Biol Chem, 2001. **276**(2): p. 999-1004.
51. Ramiro-Cortes, Y. and J. Moran, *Role of oxidative stress and JNK pathway in apoptotic death induced by potassium deprivation and staurosporine in cerebellar granule neurons*. Neurochem Int, 2009. **55**(7): p. 581-92.
52. Ramiro-Cortes, Y., A. Guemez-Gamboa, and J. Moran, *Reactive oxygen species participate in the p38-mediated apoptosis induced by potassium deprivation and staurosporine in cerebellar granule neurons*. Int J Biochem Cell Biol, 2011. **43**(9): p. 1373-82.
53. Valencia, A. and J. Moran, *Role of oxidative stress in the apoptotic cell death of cultured cerebellar granule neurons*. J Neurosci Res, 2001. **64**(3): p. 284-97.
54. Chang, H.Y., et al., *Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by the adapter protein Daxx*. Science, 1998. **281**(5384): p. 1860-3.
55. Charette, S.J., H. Lambert, and J. Landry, *A kinase-independent function of Ask1 in caspase-independent cell death*. J Biol Chem, 2001. **276**(39): p. 36071-4.
56. Zhang, R., et al., *Thioredoxin-2 inhibits mitochondria-located ASK1-mediated apoptosis in a JNK-independent manner*. Circ Res, 2004. **94**(11): p. 1483-91.
57. Tobiume, K., et al., *Molecular cloning and characterization of the mouse apoptosis signal-regulating kinase 1*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **239**(3): p. 905-10.
58. Tobiume, K., M. Saitoh, and H. Ichijo, *Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 by the stress-induced activating phosphorylation of pre-formed oligomer*. J Cell Physiol, 2002. **191**(1): p. 95-104.
59. Takeda, K., et al., *Apoptosis signal-regulating kinase 1 in stress and immune response*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2008. **48**: p. 199-225.
60. Noguchi, T., et al., *Recruitment of tumor necrosis factor receptor-associated factor family proteins to apoptosis signal-regulating kinase 1 signalosome is essential for oxidative stress-induced cell death*. J Biol Chem, 2005. **280**(44): p. 37033-40.
61. Liu, H., et al., *Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 requires prior dissociation of the ASK1 inhibitor thioredoxin*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(6): p. 2198-208.
62. Fujino, G., et al., *Thioredoxin and TRAF family proteins regulate reactive oxygen species-dependent activation of ASK1 through reciprocal modulation of the N-terminal homophilic interaction of ASK1*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(23): p. 8152-63.
63. Nishitoh, H., et al., *ASK1 is essential for JNK/SAPK activation by TRAF2*. Mol Cell, 1998. **2**(3): p. 389-95.
64. Goldman, E.H., L. Chen, and H. Fu, *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. **279**(11): p. 10442-9.
65. Zhang, L., J. Chen, and H. Fu, *Suppression of apoptosis signal-regulating kinase 1-induced cell death by 14-3-3 proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(15): p. 8511-5.
66. Nagai, H., et al., *Ubiquitin-like sequence in ASK1 plays critical roles in the recognition and stabilization by USP9X and oxidative stress-induced cell death*. Mol Cell, 2009. **36**(5): p. 805-18.
67. Shiizaki, S., I. Naguro, and H. Ichijo, *Activation mechanisms of ASK1 in response to various stresses and its significance in intracellular signaling*. Adv Biol Regul, 2013. **53**(1): p. 135-44.
68. Kim, A.H., et al., *Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(3): p. 893-901.

69. Ushio-Fukai, M., et al., *Reactive oxygen species mediate the activation of Akt/protein kinase B by angiotensin II in vascular smooth muscle cells*. J Biol Chem, 1999. **274**(32): p. 22699-704.
70. Wang, X., et al., *Epidermal growth factor receptor-dependent Akt activation by oxidative stress enhances cell survival*. J Biol Chem, 2000. **275**(19): p. 14624-31.
71. Zhang, R., et al., *Hsp90-Akt phosphorylates ASK1 and inhibits ASK1-mediated apoptosis*. Oncogene, 2005. **24**(24): p. 3954-63.
72. Lu, J. and A. Holmgren, *The thioredoxin antioxidant system*. Free Radic Biol Med, 2014. **66**: p. 75-87.
73. Lu, J. and A. Holmgren, *Thioredoxin system in cell death progression*. Antioxid Redox Signal, 2012. **17**(12): p. 1738-47.
74. Holmgren, A., *Thioredoxin structure and mechanism: conformational changes on oxidation of the active-site sulfhydryls to a disulfide*. Structure, 1995. **3**(3): p. 239-43.
75. Roos, G., et al., *The conserved active site proline determines the reducing power of Staphylococcus aureus thioredoxin*. J Mol Biol, 2007. **368**(3): p. 800-11.
76. Liu, Y. and W. Min, *Thioredoxin promotes ASK1 ubiquitination and degradation to inhibit ASK1-mediated apoptosis in a redox activity-independent manner*. Circ Res, 2002. **90**(12): p. 1259-66.
77. Saxena, G., J. Chen, and A. Shalev, *Intracellular shuttling and mitochondrial function of thioredoxin-interacting protein*. J Biol Chem, 2010. **285**(6): p. 3997-4005.
78. Patwari, P., et al., *The interaction of thioredoxin with Txnip. Evidence for formation of a mixed disulfide by disulfide exchange*. J Biol Chem, 2006. **281**(31): p. 21884-91.
79. Junn, E., et al., *Vitamin D3 up-regulated protein 1 mediates oxidative stress via suppressing the thioredoxin function*. J Immunol, 2000. **164**(12): p. 6287-95.
80. Hwang, J., et al., *The structural basis for the negative regulation of thioredoxin by thioredoxin-interacting protein*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 2958.
81. Yoshihara, E., et al., *Thioredoxin/Txnip: redoxosome, as a redox switch for the pathogenesis of diseases*. Front Immunol, 2014. **4**: p. 514.
82. Saitoh, T., S. Tanaka, and T. Koike, *Rapid induction and Ca(2+) influx-mediated suppression of vitamin D3 up-regulated protein 1 (VDUP1) mRNA in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis*. J Neurochem, 2001. **78**(6): p. 1267-76.
83. Schulze, P.C., et al., *Hyperglycemia promotes oxidative stress through inhibition of thioredoxin function by thioredoxin-interacting protein*. J Biol Chem, 2004. **279**(29): p. 30369-74.
84. Schulze, P.C., et al., *Vitamin D3-upregulated protein-1 (VDUP-1) regulates redox-dependent vascular smooth muscle cell proliferation through interaction with thioredoxin*. Circ Res, 2002. **91**(8): p. 689-95.
85. Dudek, H., et al., *Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt*. Science, 1997. **275**(5300): p. 661-5.
86. Franke, T.F., D.R. Kaplan, and L.C. Cantley, *PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis*. Cell, 1997. **88**(4): p. 435-7.
87. Cross, D.A., et al., *Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B*. Nature, 1995. **378**(6559): p. 785-9.
88. Datta, S.R., et al., *Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery*. Cell, 1997. **91**(2): p. 231-41.
89. Cardone, M.H., et al., *Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation*. Science, 1998. **282**(5392): p. 1318-21.
90. Kops, G.J., et al., *Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B*. Nature, 1999. **398**(6728): p. 630-4.
91. Vanhaesebroeck, B. and D.R. Alessi, *The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB*. Biochem J, 2000. **346 Pt 3**: p. 561-76.
92. Sato, S., N. Fujita, and T. Tsuruo, *Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(20): p. 10832-7.

93. Basso, A.D., et al., *Akt forms an intracellular complex with heat shock protein 90 (Hsp90) and Cdc37 and is destabilized by inhibitors of Hsp90 function*. J Biol Chem, 2002. **277**(42): p. 39858-66.
94. Murata, H., et al., *Glutaredoxin exerts an antiapoptotic effect by regulating the redox state of Akt*. J Biol Chem, 2003. **278**(50): p. 50226-33.
95. Wani, R., et al., *Isoform-specific regulation of Akt by PDGF-induced reactive oxygen species*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(26): p. 10550-5.
96. Matsuno, K., et al., *NOX1/NADPH oxidase is involved in endotoxin-induced cardiomyocyte apoptosis*. Free Radic Biol Med, 2012. **53**(9): p. 1718-28.
97. Durgados, L., et al., *Redox modification of Akt mediated by the dopaminergic neurotoxin MPTP, in mouse midbrain, leads to down-regulation of pAkt*. FASEB J, 2012. **26**(4): p. 1473-83.
98. Sundaresan, M., et al., *Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction*. Science, 1995. **270**(5234): p. 296-9.
99. Kwon, J., et al., *Reversible oxidation and inactivation of the tumor suppressor PTEN in cells stimulated with peptide growth factors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(47): p. 16419-24.
100. Leslie, N.R., et al., *Redox regulation of PI 3-kinase signalling via inactivation of PTEN*. EMBO J, 2003. **22**(20): p. 5501-10.
101. Meuillet, E.J., et al., *Thioredoxin-1 binds to the C2 domain of PTEN inhibiting PTEN's lipid phosphatase activity and membrane binding: a mechanism for the functional loss of PTEN's tumor suppressor activity*. Arch Biochem Biophys, 2004. **429**(2): p. 123-33.
102. Chen, K.S. and H.F. DeLuca, *Isolation and characterization of a novel cDNA from HL-60 cells treated with 1,25-dihydroxyvitamin D-3*. Biochim Biophys Acta, 1994. **1219**(1): p. 26-32.
103. Nishiyama, A., et al., *Identification of thioredoxin-binding protein-2/vitamin D(3) up-regulated protein 1 as a negative regulator of thioredoxin function and expression*. J Biol Chem, 1999. **274**(31): p. 21645-50.
104. Yamanaka, H., et al., *A possible interaction of thioredoxin with VDUP1 in HeLa cells detected in a yeast two-hybrid system*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **271**(3): p. 796-800.
105. Nishiyama, A., et al., *Redox regulation by thioredoxin and thioredoxin-binding proteins*. IUBMB Life, 2001. **52**(1-2): p. 29-33.
106. Yodoi, J., H. Nakamura, and H. Masutani, *Redox regulation of stress signals: possible roles of dendritic stellate TRX producer cells (DST cell types)*. Biol Chem, 2002. **383**(3-4): p. 585-90.
107. Kim, K.Y., et al., *Heat shock factor regulates VDUP1 gene expression*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **315**(2): p. 369-75.
108. Minn, A.H., C. Hafele, and A. Shalev, *Thioredoxin-interacting protein is stimulated by glucose through a carbohydrate response element and induces beta-cell apoptosis*. Endocrinology, 2005. **146**(5): p. 2397-405.
109. Cheng, D.W., et al., *An analysis of high glucose and glucosamine-induced gene expression and oxidative stress in renal mesangial cells*. Arch Physiol Biochem, 2006. **112**(4-5): p. 189-218.
110. Yoshioka, J., et al., *Thioredoxin-interacting protein controls cardiac hypertrophy through regulation of thioredoxin activity*. Circulation, 2004. **109**(21): p. 2581-6.
111. Wang, Y., G.W. De Keulenaer, and R.T. Lee, *Vitamin D(3)-up-regulated protein-1 is a stress-responsive gene that regulates cardiomyocyte viability through interaction with thioredoxin*. J Biol Chem, 2002. **277**(29): p. 26496-500.
112. Lim, P.L., et al., *The mitochondrial superoxide/thioredoxin-2/Ask1 signaling pathway is critically involved in troglitazone-induced cell injury to human hepatocytes*. Toxicol Sci, 2008. **101**(2): p. 341-9.
113. Tanaka, T., et al., *Thioredoxin-2 (TRX-2) is an essential gene regulating mitochondria-dependent apoptosis*. EMBO J, 2002. **21**(7): p. 1695-703.
114. Shalev, A., et al., *Oligonucleotide microarray analysis of intact human pancreatic islets: identification of glucose-responsive genes and a highly regulated TGFbeta signaling pathway*. Endocrinology, 2002. **143**(9): p. 3695-8.

115. Chen, J., et al., *Thioredoxin-interacting protein: a critical link between glucose toxicity and beta-cell apoptosis*. Diabetes, 2008. **57**(4): p. 938-44.
116. Chen, J., et al., *Thioredoxin-interacting protein deficiency induces Akt/Bcl-xL signaling and pancreatic beta-cell mass and protects against diabetes*. FASEB J, 2008. **22**(10): p. 3581-94.
117. World, C., O.N. Spindel, and B.C. Berk, *Thioredoxin-interacting protein mediates TRX1 translocation to the plasma membrane in response to tumor necrosis factor-alpha: a key mechanism for vascular endothelial growth factor receptor-2 transactivation by reactive oxygen species*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(8): p. 1890-7.
118. Spyrou, G., et al., *Cloning and expression of a novel mammalian thioredoxin*. J Biol Chem, 1997. **272**(5): p. 2936-41.
119. Lipton, S.A., *NMDA receptor activity regulates transcription of antioxidant pathways*. Nat Neurosci, 2008. **11**(4): p. 381-2.
120. Papadia, S., et al., *Synaptic NMDA receptor activity boosts intrinsic antioxidant defenses*. Nat Neurosci, 2008. **11**(4): p. 476-87.
121. Contestabile, A., *Cerebellar granule cells as a model to study mechanisms of neuronal apoptosis or survival in vivo and in vitro*. Cerebellum, 2002. **1**(1): p. 41-55.
122. Song, J.J. and Y.J. Lee, *Effect of glucose concentration on activation of the ASK1-SEK1-JNK1 signal transduction pathway*. J Cell Biochem, 2003. **89**(4): p. 653-62.
123. Gallo, V., et al., *The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture*. J Neurosci, 1987. **7**(7): p. 2203-13.
124. Moran, J., et al., *Caspase-3 expression by cerebellar granule neurons is regulated by calcium and cyclic AMP*. J Neurochem, 1999. **73**(2): p. 568-77.
125. Valencia, A. and J. Moran, *Reactive oxygen species induce different cell death mechanisms in cultured neurons*. Free Radic Biol Med, 2004. **36**(9): p. 1112-25.
126. Olguin-Albuerne, M., G. Dominguez, and J. Moran, *Effect of staurosporine in the morphology and viability of cerebellar astrocytes: role of reactive oxygen species and NADPH oxidase*. Oxid Med Cell Longev, 2014. **2014**: p. 678371.
127. Balazs, R., O.S. Jorgensen, and N. Hack, *N-methyl-D-aspartate promotes the survival of cerebellar granule cells in culture*. Neuroscience, 1988. **27**(2): p. 437-51.
128. Caballero-Benitez, A. and J. Moran, *Caspase activation pathways induced by staurosporine and low potassium: role of caspase-2*. J Neurosci Res, 2003. **71**(3): p. 383-96.
129. Lossi, L., et al., *Posttranslational regulation of BCL2 levels in cerebellar granule cells: A mechanism of neuronal survival*. Dev Neurobiol, 2009. **69**(13): p. 855-70.
130. Weil, M., et al., *Constitutive expression of the machinery for programmed cell death*. J Cell Biol, 1996. **133**(5): p. 1053-9.
131. Couldwell, W.T., et al., *Protein kinase C inhibitors induce apoptosis in human malignant glioma cell lines*. FEBS Lett, 1994. **345**(1): p. 43-6.
132. Yue, T.L., et al., *Staurosporine-induced apoptosis in cardiomyocytes: A potential role of caspase-3*. J Mol Cell Cardiol, 1998. **30**(3): p. 495-507.
133. Moran, J. and A.J. Patel, *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, 1989. **46**(1): p. 97-105.
134. Lacy, F., D.A. Gough, and G.W. Schmid-Schonbein, *Role of xanthine oxidase in hydrogen peroxide production*. Free Radic Biol Med, 1998. **25**(6): p. 720-7.
135. Englert, R.P. and E. Shacter, *Distinct modes of cell death induced by different reactive oxygen species: amino acyl chloramines mediate hypochlorous acid-induced apoptosis*. J Biol Chem, 2002. **277**(23): p. 20518-26.

136. Lee S. R., Yang K. S., Kwon J., Lee C., Jeong W., Rhee S. G. *Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H₂O₂*. The Journal of biological chemistry, 2002;277(23):20336-42.
137. Yoshida, T., Nakamura, H., Masutani, H. & Yodoi, J. *The involvement of thioredoxin and thioredoxin binding protein-2 on cellular proliferation and aging process*. Ann. NY Acad. Sci. 1055, 1–12 (2005).

12. Publicaciones

Research Article

Reactive Oxygen Species Evoked by Potassium Deprivation and Staurosporine Inactivate Akt and Induce the Expression of TXNIP in Cerebellar Granule Neurons

Marco Antonio Zaragoza-Campillo and Julio Morán

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

Correspondence should be addressed to Julio Morán; jmoran@ifc.unam.mx

Received 9 September 2016; Revised 8 January 2017; Accepted 22 January 2017; Published 6 March 2017

Academic Editor: Giuseppe Filomeni

Copyright © 2017 Marco Antonio Zaragoza-Campillo and Julio Morán. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The reactive oxygen species (ROS) play a critical role in neuronal apoptosis; however, the mechanisms are not well understood. It has been shown that thioredoxin-interacting protein (TXNIP) overexpression renders cells more susceptible to oxidative stress and promotes apoptosis and that the activation of PI3K/Akt pathway leads to a downregulation of TXNIP. Here, we evaluated the role of ROS in the regulation of Akt activity and the subsequent regulation of the TXNIP expression in a model of apoptotic death of cerebellar granule neurons (CGN). We observed that two apoptotic conditions that generate ROS at short times led to an increase in the expression of TXNIP in a time-dependent manner; antioxidants significantly reduced this expression. Also, H₂O₂ caused an increase in TXNIP expression. Moreover, apoptotic conditions induced inactivation of Akt in a time-dependent manner similar to TXNIP expression and H₂O₂ treatment led to Akt inactivation. Besides, the pharmacological inhibition of Akt increases TXNIP expression and induces CGN cell death. Together, these results suggest that ROS promote neuronal apoptosis through the Akt-TXNIP signaling pathway, supporting the idea that the PI3K/Akt pathway regulates the TXNIP expression. This study highlights the potential importance of this mechanism in neuronal death.

1. Introduction

Several studies have demonstrated that reactive oxygen species (ROS) regulate diverse physiological processes through a direct oxidation of specific proteins. This oxidative process leads to a modification in the functionality of the target proteins. Several proteins have been reported to be regulated by its redox state; these include channels, receptors, and structural and signaling proteins. ROS act mainly through the oxidation of specific amino acid residues, such as cysteines [1] to control protein function. For example, several studies have demonstrated that hydrogen peroxide (H₂O₂) regulates some physiological processes by modulating the activity of several protein kinases and protein phosphatases through the oxidation of cysteines [2–5].

In addition, some proteins regulate the redox state of other proteins that are involved in the control of the oxidative

levels in the cell, as well as the activation/inactivation of multiple signaling pathways. That is the case of the thioredoxin-interacting protein (TXNIP), also known as VDUP1 or TBP-2. This protein binds to and negatively regulates thioredoxin 1 (Trx1) that controls the cellular redox state [6–10] and protects cells against deleterious actions of ROS, including cell death [11]. Trx1 also modulates the activation of ASK1, a member of the mitogen-activated protein kinase pathway, which is involved in apoptotic death and responds to oxidative stress [12]. TXNIP expression is ubiquitous and is induced by a variety of stress conditions, including UV light, γ -rays, heat shock, and H₂O₂ [7, 13]. Cells overexpressing TXNIP are more susceptible to oxidative stress and apoptosis [14–17]. Recently, it was shown that TXNIP is essential for glucotoxicity-induced apoptosis of beta cell mediated by the intrinsic mitochondrial apoptotic pathway [18].

It has been reported that the PI3K/Akt signaling pathway regulates the expression of TXNIP [19, 20]. In cancer cells, it has been suggested that the activation of PI3K/Akt leads to a downregulation of TXNIP at the transcriptional level. Conversely, inhibition of the activated PI3K/Akt pathway in lung cancer cells increases TXNIP expression [19]. Similar results were observed in different cell lines, suggesting that the downregulation of TXNIP by growth factors is a ubiquitous phenomenon and that the constitutive activation of PI3K/Akt/mTOR leads to TXNIP downregulation [19]. These findings are consistent with a previous study showing serum-induced TXNIP downregulation in fibroblasts and T-lymphocytes [21].

Akt is a protein kinase involved in different physiological processes such as cell proliferation, migration, and apoptosis. Akt regulates some members of the Bcl-2 super family and indirectly controls apoptosis through the transcriptional factors that mediate apoptotic events [22]. Several studies have shown that Akt activity can be directly modified by ROS. It has been reported that the exposure of cardiac cells to H_2O_2 induces the formation of an intramolecular disulfide bond between Cys297 and Cys311 of the Akt kinase domain, which leads to its dephosphorylation and proteasomal degradation [23]. Conversely, under cytotoxic stress, the prevention of oxidation of these cysteine residues reduces both its dephosphorylation and proteasomal degradation, which translates into an enhanced cell survival [24]. In addition, it has been found that MPTP, a neurotoxin that selectively damages dopaminergic neurons, induces an oxidation of specific Akt cysteines, which increases its association with PP2A, reducing its level of phosphorylation. The presence of antioxidants fully reverses these effects and reduces MPTP toxicity [25]. These studies strongly suggest that Akt is a redox-sensitive protein, a condition that may modulate its involvement in the cell survival.

Neurons are susceptible to oxidative damage because of their high levels of ROS production and relatively low levels of antioxidant enzymes [26]. Since TXNIP plays a significant role in the cellular redox state, we investigated the possibility that the apoptotic conditions that induce ROS generation could regulate the expression of TXNIP, as well as the activity of Akt in neurons. We evaluated this possibility by using a model of apoptotic death of cultured cerebellar granule neurons (CGN) induced by potassium deprivation (K5) and staurosporine (Sts). Under these conditions, we provide evidence that ROS generated by proapoptotic stimuli led to an upregulation of TXNIP, as well as an inactivation of Akt kinase. The inactivation of Akt induced TXNIP expression. These results support the idea that both TXNIP and Akt are proteins sensitive to the redox state depending on apoptotic conditions in cerebellar granule neurons and raise the possibility that Akt is involved in the regulation of TXNIP expression under these conditions.

2. Materials and Methods

2.1. Materials. Fetal calf serum, penicillin/streptomycin, and basal Eagle's medium were purchased from GIBCO, Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Dihydroethidium (DHEt) was

purchased from Molecular Probes, Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Poly-L-lysine (mol. wt. > 300,000), trypsin, trypsin inhibitor, DNase, cytosine arabinoside, DMSO, staurosporine, 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (AEBSF), LY 294002, and reagents for polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) were acquired from Sigma (St. Louis, MO, USA). Protease inhibitor cocktail tablets (Complete) were purchased from Roche (Mannheim, Germany) and phosphatase inhibitor mini tablets were obtained from Thermo Scientific (Rockford, USA). ProSieve Quadcolor Protein Marker was purchased from Lonza (Rockland, Maine, USA). Polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes and Immobilon Western HRP substrate were acquired from Millipore (Concord Road, Billerica, MA, USA). CDP-Star Reagent for alkaline phosphatase-based chemiluminescent detection assays was purchased from New England Biolabs and BioMax Light Film was purchased from Kodak (Rochester, NY, USA). Ebselen and EUK-134 were from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA). Antibodies against Akt and p-Akt (Ser473) were from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). Antibody against TXNIP was purchased from Novus Biologicals. Antibody against glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was from Millipore (Bedford, MA, USA). Peroxidase-conjugated anti-mouse was purchased from Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, USA), and alkaline phosphatase-conjugated anti-mouse and anti-rabbit were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA).

2.2. Experimental Model. Cultured isolated cerebellar granule neurons (CGN) are widely employed as a model of apoptosis. Notably, rat CGN die when maintained in vitro for more than 5 DIV with physiological $[K^+]$ (3.5–5 mM) under no depolarizing conditions (K5). To avoid this condition, CGN are chronically cultivated in high $[K^+]$ (25 mM); under sustained depolarization (K25) and by switching to K5 or vice versa it is possible to alter cell survival and evaluate gene expression, neurochemical maturation, and physiological properties of these cells [27].

On the other hand, staurosporine (Sts) has been shown to induce apoptosis in wide variety of cell types. It has been believed that the proteins required to execute staurosporine-induced programmed cell death are constitutively present in all nucleated mammalian cells [28]. Staurosporine induces apoptotic cell death at 0.2–1 μM [29–32] and has been recognized as a useful model to investigate the mechanism of apoptosis in mammalian cells [31–33]. Based on this, in the present study we employed both conditions (potassium deprivation and staurosporine) as inducers of apoptotic death.

2.3. 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) cultures were prepared as previously described [34]. Briefly, 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. Cytosine arabinoside (10 μ M) was added 24 h after seeding to prevent the proliferation of nonneuronal cells. The cultures were kept at 37°C in an atmosphere of CO₂ (5%) and saturated air with water vapor (95%). This medium is referred to as K25. At the end of the preparation, CGN cultures contained approximately 95% neurons. Cultures were maintained 7 days in the depolarizing medium (K25) and subsequently apoptotic death of CGN was induced by two different stimuli: (a) the neurons were transferred to a serum-free medium containing 5 mM KCl (referred as K5) or (b) by the administration of 0.5 μ M staurosporine (Sts) for varying times (0.25–5.5 h).

2.4. Determination of ROS. It is known that dihydroethidium (DHEt) diffuses into cells and is oxidized by reactive oxygen species in the cytosol producing ethidium and 2-hydroxyethidium that binds to the DNA and emits bright red fluorescence. Thus, fluorescence intensity is an indirect parameter of ROS levels. CGN were maintained in a K25 medium during 7 days in vitro (DIV) and after this time the CGN were transferred to a medium with K5 or treated with Sts and maintained in these conditions from 0.5 h to 5.5 h. After treatment, the cells were incubated with 3.2 μ M DHEt for 20 minutes at 37°C. Then, cells were washed with PBS and observed in a fluorescence microscope with a rhodamine filter with a wavelength of 488–515 nm. Cells were photographed and fluorescence intensity was measured with the Image J Program. ROS production by xanthine/xanthine oxidase was used as positive control. For that, 7–8 DIV cultures were incubated with 10 μ M xanthine (X) for 1 h and then xanthine oxidase (XO) (45 mU/mL) was added to the medium and ROS generation was evaluated after 2 h [35].

2.5. Cell Viability. Cell viability was determined by the accumulation of calcein-AM and exclusion of propidium iodide (IP) to stain live and dead cells, respectively. The viable cells contain endogenous esterases and are identified by their ability to convert calcein-AM to calcein, a green fluorescent product. The IP crosses the plasma membrane of damaged cells; it binds to DNA and double-stranded RNA by intercalation and emits intense red fluorescence signal. This dye shows weak fluorescence when it is not bound and in aqueous solution. Cells were incubated with calcein-AM (1 μ M) and IP (40 μ M) for 15 min at 37°C and were observed in a fluorescence microscope and stained cells were counted.

We additionally evaluated cell viability by the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) reduction technique, which is based on the ability of mitochondrial succinate dehydrogenase to transform MTT to formazan blue. Since only living cells carry out this reaction, the

amount of formazan produced is directly proportional to the number of viable cells present in the culture. The cells were incubated with MTT (100 μ M) during 15 min at 37°C, cultures were washed with saline solution and formazan blue was extracted with DMSO (dimethyl sulphoxide, 100%), and the amount was calculated by reading in the spectrophotometer at 570 nm.

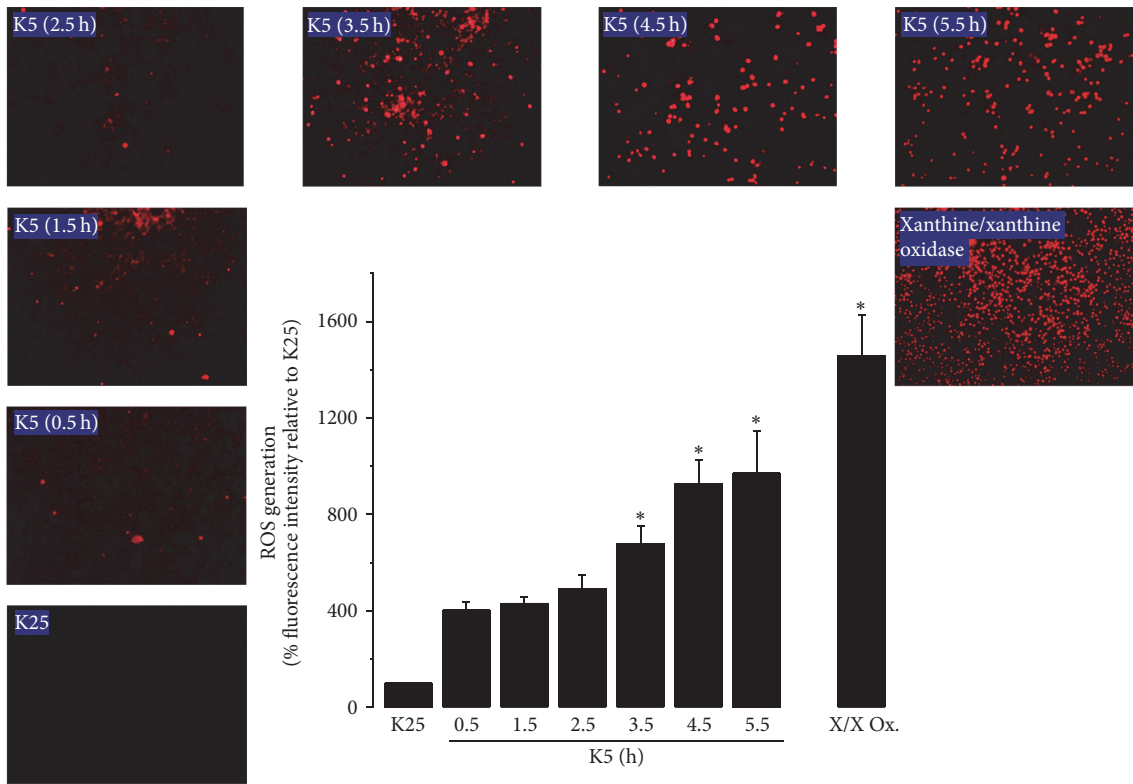
2.6. Immunoblotting. CGN were cultured in a K25 medium for 7 DIV and then switched to a K5 medium or treated with staurosporine from 15 min to 5.5 h. Some cultures were treated with hydrogen peroxide, antioxidants, or NADPH-oxidase inhibitors. Cells were washed twice in ice-cold PBS and homogenized in lysis buffer (25 mM Trizma, 50 mM NaCl, 2% Igepal, 0.2% SDS, and complete protease inhibitors, pH 7.4). Homogenates were sonicated and centrifuged at 4,500 rpm for 5 min and the supernatants were recovered. The protein concentration of cellular homogenates was determined by the Bradford method. Homogenates (60 μ g protein per lane) were subjected to 15% SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes at 100 V for 1.5 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 7.4) containing 5% or 2.5% nonfat dry milk at 4°C overnight and incubated overnight at 4°C with the primary antibodies. After further washing, the blots were incubated with peroxidase-conjugated anti-mouse (1:10,000) or alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit (1:20,000) and anti-mouse (1:30,000) for 1 h at room temperature. Bands were visualized using chemiluminescence according to the manufacturer's recommendations and exposed to Kodak BioMax-Light Film.

2.7. Antibodies. The following antibodies were used: anti-GAPDH (#MAB374), anti-pAkt S473 (D9E) (#4060S), anti-Akt pan (C67E7) (#4691L), and anti-TXNIP (JY2) (#NBPI-S4578). Antibodies used were as follows: 1:1000 rabbit anti-pAkt, 1:1000 rabbit anti-Akt, 1:500 mouse anti-TXNIP, and 1:3000 mouse anti-GAPDH.

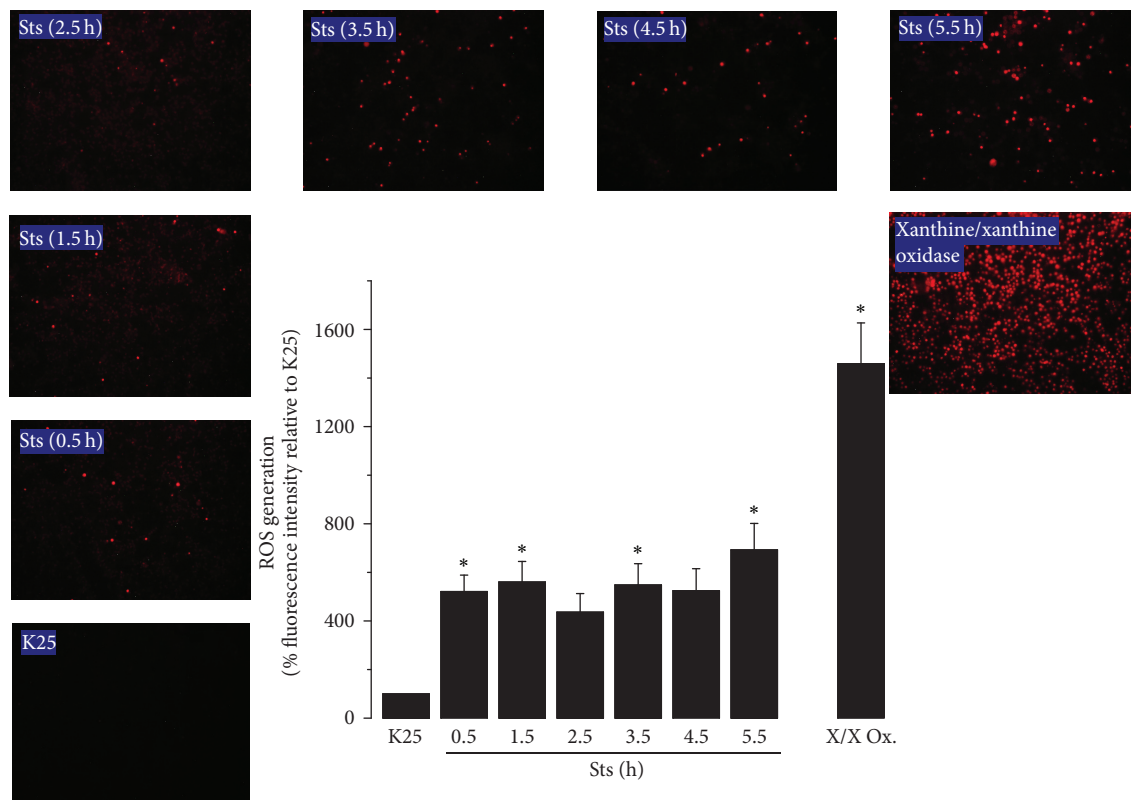
2.8. Statistical Analysis. Statistical analysis was done by using SigmaPlot 11.0 software. Data are presented as mean \pm SE and statistical significance of the results was determined by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's test. *p* values less than 0.05 were considered statistically significant, indicating the number of experiments. Statistical significance of data from Figure 1 was determined by a nonparametric analysis followed by Dunnett's post hoc test.

3. Results

3.1. Apoptotic Conditions Induce the Generation of ROS in CGN. In order to elucidate the effect of apoptotic conditions in ROS production in CGN, neuronal cultures maintained in K25 medium for 7 DIV were switched to K5 medium or treated with Sts for 0.5, 1.5, 2.5, 3.5, 4.5, or 5.5 h and ROS levels were measured as detailed in Material and Methods. In accordance with previous results [36], CGN treated with K5 showed an increase in ROS levels from 0.5 h and reached



(a)



(b)

FIGURE 1: K5 and Sts induce the generation of reactive oxygen species. Primary cultures of rat cerebellar granule neurons (CGN) were cultured with K25 as described in Materials and Methods. After 7 days in vitro (DIV), cells were transferred to K5 medium or were treated with Sts ($0.5 \mu\text{M}$) from 0.5 h to 5.5 h. ROS levels are expressed as the percentage of mean fluorescence intensity of ethidium cation (product of the dihydroethidium oxidation) with respect to K25. The xanthine/xanthine oxidase treatment was used as a positive control. Data are means \pm SE of 5 independent experiments. * $p < 0.05$, significantly different from K25. X/X Ox: xanthine/xanthine oxidase system.

a maximum at 5.5 h (Figure 1(a), Suppl. Fig. 1(A)). Similarly, we found that the maximum level of ROS generation induced by Sts was reached also at 5.5 h after initial treatment; however, the intensity of DHEt positive cells was relatively lower than that observed in K5 condition (Figure 1(b), Suppl. Fig. 1(B)).

Furthermore, we measured the ROS generation in cells treated with xanthine/xanthine oxidase as positive control and we found an increase of $26.20\% \pm 4.39$ of DHEt positive cells (Figure 1, Suppl. Fig. 1, in Supplementary Material available online at <https://doi.org/10.1155/2017/8930406>). This approach has been reported to generate superoxide anion; however, it has been shown that exogenously generated superoxide is spontaneously dismutated into hydrogen peroxide in a very short time [37, 38]. Hydrogen peroxide can freely diffuse into the cells and exert its effects, including cell death.

As previously shown [31], K5 induced a decrease in cell viability of 20–25% approximately after 8 h and by 60–70% after 24 h (Supplementary Fig. 2). In the case of staurosporine [31], 50–60% cell death was observed after 24 h (Supplementary Fig. 3). These data indicate that the apoptotic conditions induced by K5 and Sts induce an early ROS production in CGN.

3.2. K5 Induces TXNIP Expression in CGN. The expression pattern of TXNIP was analyzed in cells treated with K5 from 0.25 to 5.5 h. Under these conditions, we observed that the expression of TXNIP started after 2 h of treatment. The TXNIP expression was further increased at 3 h and 4 h, and it decreased after 5.5 h (Figure 2). It is interesting to note that in depolarizing conditions (K25) there was practically no expression of TXNIP (Figure 2).

3.3. ROS Inhibitors Prevent TXNIP Expression Induced by K5. To elucidate the possible role of ROS in the TXNIP expression induced by K5, we evaluated the effect of the antioxidants EUK-134 and Ebselen, as well as two inhibitors of NOX, DPI, and AEBSE, on TXNIP expression induced by K5. Under these conditions, we observed that 10 and 20 μM EUK-134 and 10 μM Ebselen significantly reduced TXNIP expression induced by K5 at 4 h. Moreover, both NOX inhibitors are more efficient than antioxidants in reducing the TXNIP expression induced by K5, particularly DPI that completely reduced the TXNIP expression (Figure 3). Together, these results suggest that ROS could be mediators in the TXNIP expression induced by potassium deprivation in CGN.

3.4. H_2O_2 Induces TXNIP Expression in CGN. To evaluate the role of ROS in the TXNIP expression, we analyzed the effect of H_2O_2 . Figure 4 shows that TXNIP expression was induced upon H_2O_2 treatment under K25 conditions. The effect of H_2O_2 depended on the concentration. TXNIP expression increased at 100 μM and reached a maximal expression at the highest concentration tested (400 μM).

3.5. TXNIP Expression Induced by Sts Is Mediated by ROS. In order to evaluate the effect of a different apoptotic condition on TXNIP expression, we analyzed the effect of staurosporine

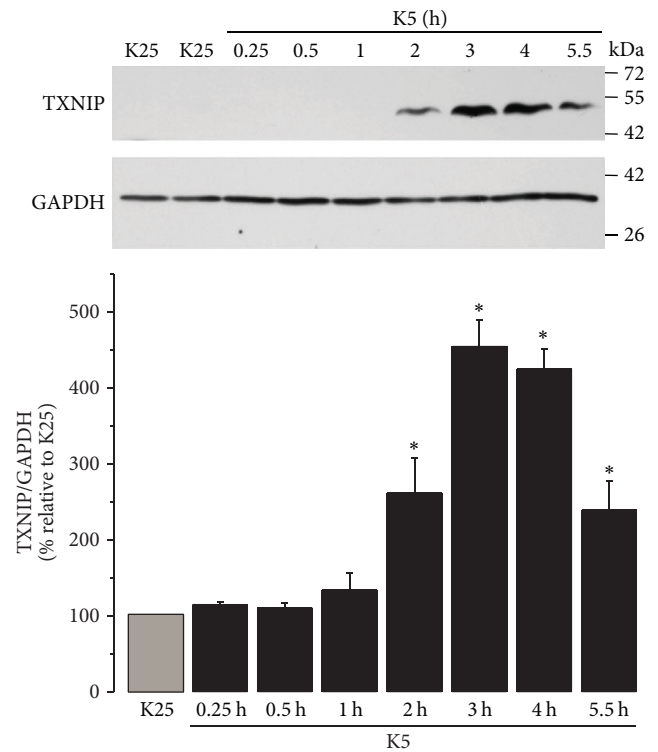


FIGURE 2: K5 increases the expression of TXNIP. Primary cultures of rat cerebellar granule neurons (CGN) were cultured with K25 as described in Materials and Methods. After 7 DIV cells were treated with K5 during the indicated times and the levels of TXNIP were evaluated as described. Bars indicate the densitometric values of the TXNIP/GAPDH ratio. Results are expressed as the percentage of K25. GAPDH is the load control. TXNIP: 50 kDa, GAPDH: 37 kDa. Data are means \pm SE of 4 independent experiments. * $p < 0.05$, significantly different from K25.

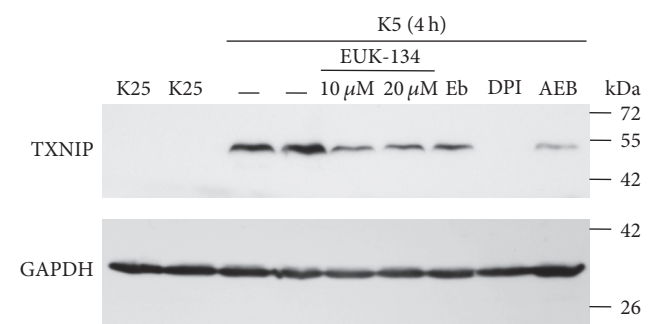


FIGURE 3: Antioxidants inhibit the expression of TXNIP induced by K5. Primary cultures of rat cerebellar granule neurons (CGN) were cultured with K25 as described in Materials and Methods. After 7 DIV cells were treated with K5 during 4 hours and the levels of TXNIP were evaluated as described. K25 was used as negative control and K5 (4 h) was used as positive control. In K5 (4 h), cells were preincubated with antioxidants EUK-134 (10 and 20 μM) and Ebselen (10 μM), as well as with the NOX inhibitors DPI (520 nm) and AEBSE (50 μM). The immunoblot was performed against TXNIP and GAPDH. GAPDH is the load control. TXNIP: 50 kDa, GAPDH: 37 kDa. Representative blot from 3 independent assays. Eb, Ebselen; AEB, AEBSE.

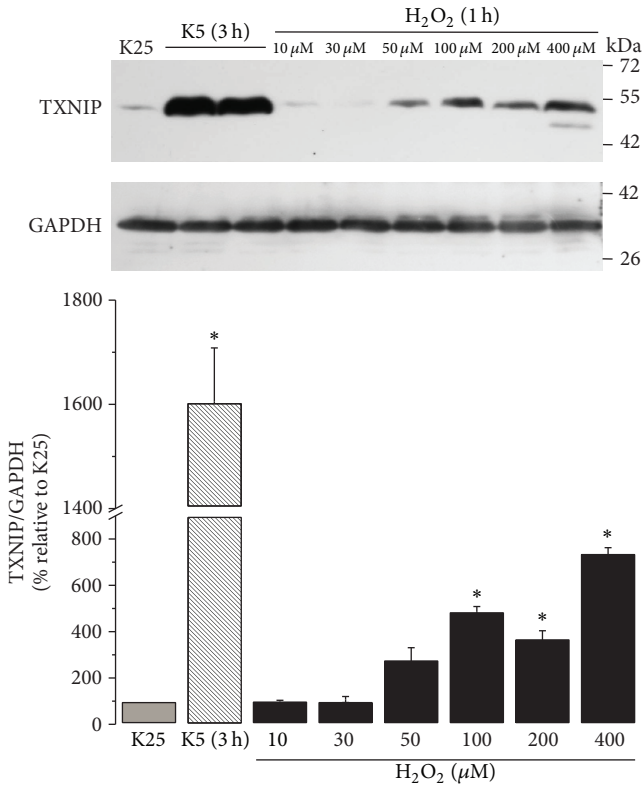


FIGURE 4: H₂O₂ induces the expression of TXNIP. Primary cultures of rat cerebellar granule neurons (CGN) were cultured with K25 as described in Materials and Methods. After 7 DIV, cells were treated with H₂O₂ at different concentrations and the levels of TXNIP were evaluated as described. K25 was used as negative control and K5 (3 h) was used as positive control. Bars indicate the densitometric values of the TXNIP/GAPDH ratio. Results are expressed as the percentage of K25. GAPDH is the load control. TXNIP: 50 kDa, GAPDH: 37 kDa. Data are means \pm SE of 3 independent experiments. * $p < 0.05$, significantly different from K25.

(0.5 μ M). Under these conditions, we observed that Sts treatment induced an increase in the expression of TXNIP at around 3 h, which continued increasing until 5.5 h (Figure 5). The initial effect of Sts on TXNIP expression is observed later than that observed for the action of K5 (Figure 2).

To elucidate the possible role of ROS in the TXNIP expression induced by Sts, we evaluated the effect of the antioxidants EUK-134 and Ebselen, as well as DPI and AEBSF on TXNIP expression induced by Sts. We observed that TXNIP expression induced by Sts at 5.5 h was reduced by EUK-134 (10 and 20 μ M), Ebselen (10 μ M), and AEBSF (50 μ M). Similarly to K5, the expression induced by Sts was also completely inhibited by DPI (520 nM) (Figure 6), suggesting a relevant role of a NADPH-oxidase in the TXNIP transcription induced by Sts.

3.6. K5 and Sts Reduce Akt Activation in CGN. It has been reported that a downregulation of PI3K/Akt signaling leads to an increase in the expression of TXNIP [19, 20]. Therefore, in order to explore whether Akt activity is regulated by apoptotic conditions and H₂O₂ as it is observed for TXNIP

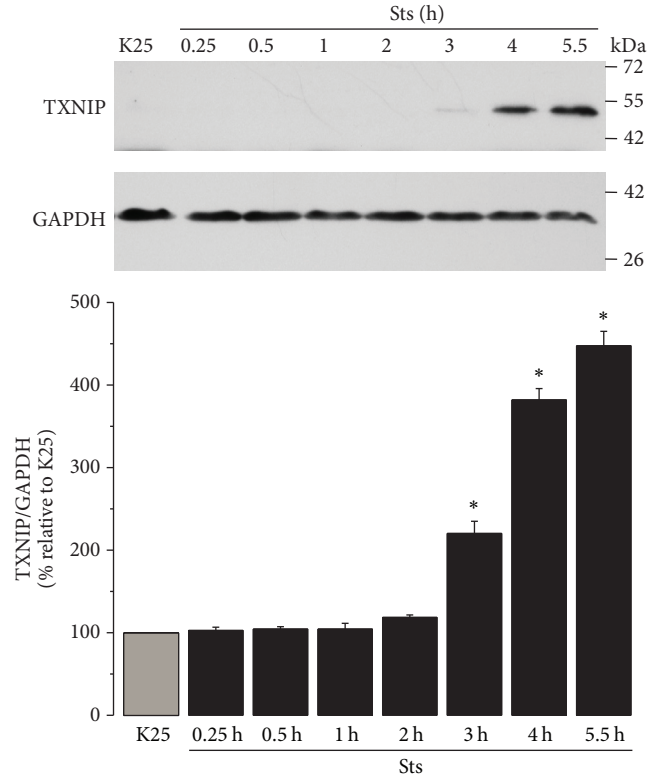


FIGURE 5: Sts increases the expression of TXNIP. Primary cultures of rat cerebellar granule neurons (CGN) were cultured with K25 as described in Materials and Methods. After 7 DIV cells were treated with Sts (0.5 μ M) during the indicated times and the levels of TXNIP were evaluated as described. Bars indicate the densitometric values of the TXNIP/GAPDH ratio. Results are expressed as the percentage of K25. GAPDH is the load control. TXNIP: 50 kDa, GAPDH: 37 kDa. Data are means \pm SE of 3 independent experiments. * $p < 0.05$, significantly different from K25.

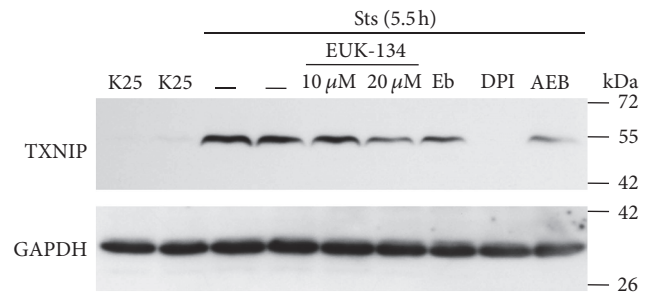


FIGURE 6: Antioxidants inhibit the expression of TXNIP induced by Sts. Primary cultures of rat cerebellar granule neurons (CGN) were cultured with K25 as described in Materials and Methods. After 7 DIV cells were treated with staurosporine (0.5 μ M) during 5.5 hours and the levels of TXNIP were evaluated as described. K25 was used as negative control and Sts (5.5 h) was used as positive control. In Sts (5.5 h), cells were preincubated with antioxidants EUK-134 (10 and 20 μ M) and Ebselen (10 μ M), as well as with the NOX inhibitors DPI (520 nM) and AEBSF (50 μ M). The immunoblot was performed against TXNIP and GAPDH. GAPDH is the load control. TXNIP: 50 kDa, GAPDH: 37 kDa. Representative blot from 3 independent assays. Eb, Ebselen; AEB, AEBSF.

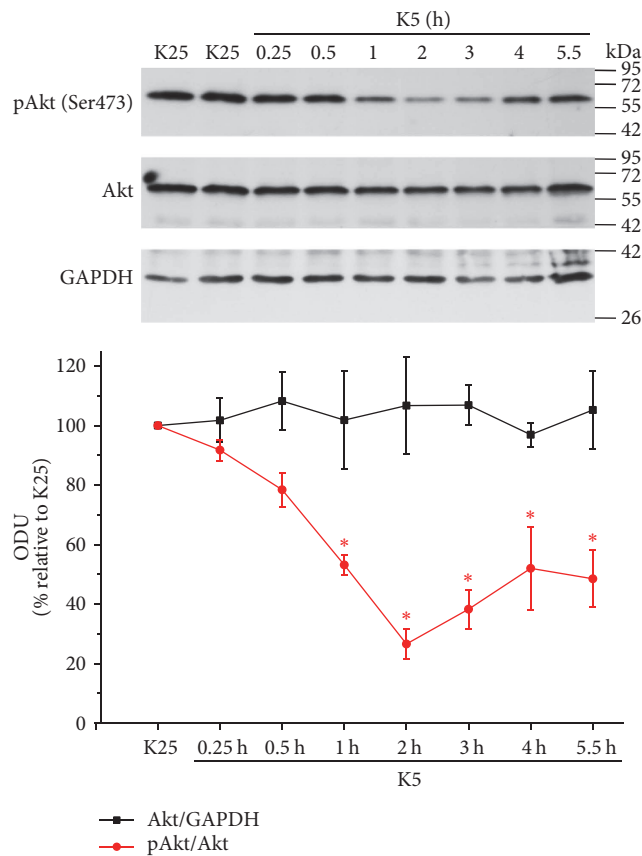


FIGURE 7: K5 decreases the activation of Akt. Primary cultures of rat cerebellar granule neurons (CGN) were cultured with K25 as described in Materials and Methods. After 7 DIV, cells were treated with K5 during the indicated times and the levels of Akt phosphorylated at the Serine 473 (phosphoserine that monitors the activation status of Akt), total Akt, and GAPDH were evaluated as described. Graph indicates the densitometric values of the Akt/GAPDH ratio and pAkt/Akt ratio. Results are expressed as the percentage of K25. GAPDH is the load control. Akt: 60 kDa, GAPDH: 37 kDa. ODU: Optical Density Units. Values are means \pm SE of 3 independent experiments. * $p < 0.05$, significantly different from K25.

expression, we performed a time course activation of Akt in neurons treated with K5 for 15 min to 5.5 h. The levels of pAkt (Ser473), Akt, and GAPDH were evaluated by Western blot analysis. Under these conditions, we found a significant decrease in phosphorylated Akt (pAkt) levels from one hour of treatment, reaching a maximum of Akt inactivation at 2 and 3 h with respect to K25. Subsequently, a slight recovery in the Akt activation occurred at longest times (Figure 7). Interestingly, these results closely correlate with the temporal pattern of expression of TXNIP induced by K5 (Figure 2).

Similarly, we performed a time course of neurons treated with Sts for 15 min to 5.5 h. Under these conditions, we found that Sts inactivated Akt after 30 min and this effect remained for at least 5.5 h after treatment, showing Akt inactivation at short times in CGN (Figure 8). In addition, we observed a time gap between the Akt inactivation and TXNIP expression (Figure 5); this may be due to temporary differences in the

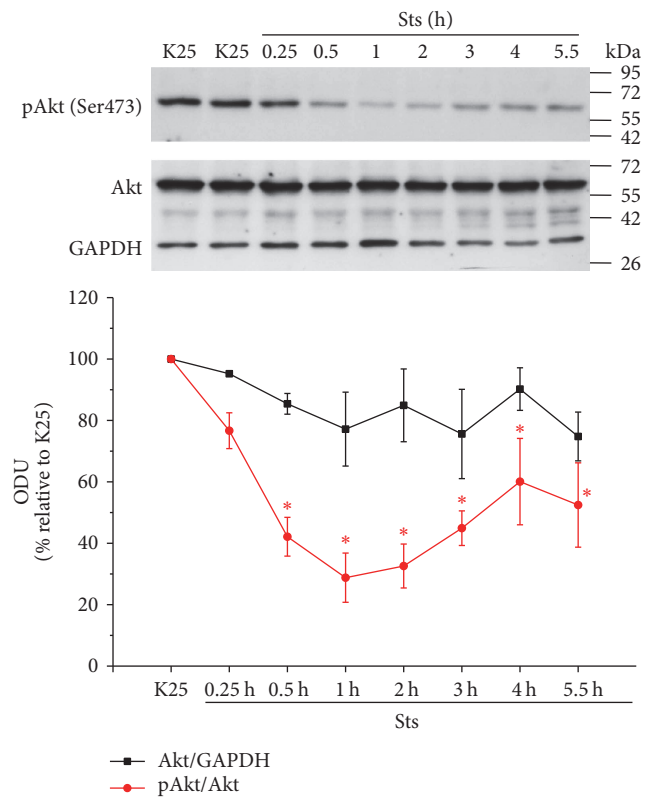


FIGURE 8: Sts decreases the activation of Akt. Primary cultures of rat cerebellar granule neurons (CGN) were cultured with K25 as described in Materials and Methods. After 7 DIV cells were treated with Sts (0.5 μ M) during the indicated times and the levels of Akt phosphorylated at the Serine 473 (Ser473), total Akt, and GAPDH were evaluated as described. Lines indicate the densitometric values of the Akt/GAPDH ratio and pAkt/Akt ratio. Results are expressed as the percentage of K25. GAPDH is the load control. Akt: 60 kDa, GAPDH: 37 kDa. ODU: Optical Density Units. Values are means \pm SE of 3 independent experiments. * $p < 0.05$, significantly different from K25.

upstream mechanisms that are activated by Sts. The results so far suggest that different apoptotic conditions that induce ROS generation are able to downregulate Akt activation.

3.7. H_2O_2 Abolishes Akt Activation in CGN. We analyzed the effect H_2O_2 to elucidate the possible role of ROS in the Akt regulation. Under K25 conditions, we detected that Akt phosphorylation at Ser473 decreased upon H_2O_2 treatment. Akt inactivation occurs from 100 μ M, showing that inactivation of this kinase is dependent on the concentration of H_2O_2 . We observed that the Akt inactivation induced by H_2O_2 was similar to that observed with K5 (3 h), suggesting that the Akt inactivation induced by K5 is probably mediated by H_2O_2 (Figure 9). These data suggest that the regulation of Akt activity is redox sensitive in this model. These results were also similar to the observed effects of H_2O_2 on TXNIP expression (Figure 4).

All together, these data strongly suggest that both the Akt activation and the TXNIP expression are regulated by ROS in this model of neuronal death. In order to evaluate

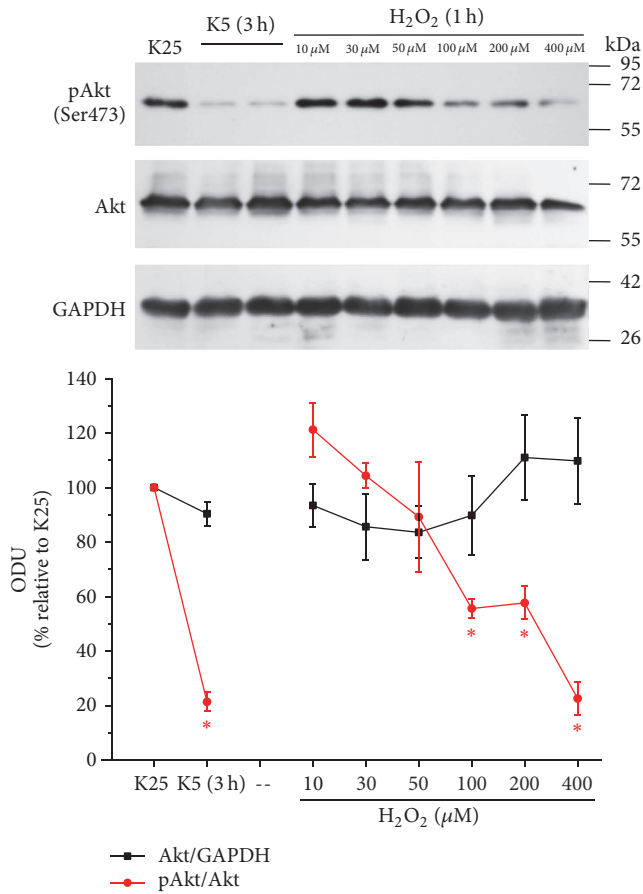


FIGURE 9: H₂O₂ decreases the activity of Akt. Primary cultures of rat cerebellar granule neurons (CGN) were cultured with K25 as described in Materials and Methods. After 7 DIV, cells were treated with H₂O₂ at different concentrations and the levels of Akt phosphorylated at the Serine 473 (Ser473), total Akt, and GAPDH were evaluated as described above. K25 was used as negative control and K5 (3 h) was used as positive control. Lines indicate the densitometric values of the Akt/GAPDH ratio and pAkt/Akt ratio. Results are expressed as the percentage of K25. GAPDH is the load control. Akt: 60 kDa, GAPDH: 37 kDa. ODU: Optical Density Units. Values are means ± SE of 3 independent experiments. **p* < 0.05, significantly different from K25.

this possibility, we measured the levels of TXNIP in cells treated with an inhibitor of Akt activity. To that we used the compound LY 294002, which is a strong inhibitor of PI3K-Akt signaling pathway [39] that has been shown to reduce Akt phosphorylation in several models [40–44]. We first measured the effect of LY 294002 on cell viability in CGN and we found that the inhibition of Akt by LY 294002 induced a significant increase in cell death after 24 h of treatment. Cell viability was measured by the calcein-propidium iodide technique (Supplementary Fig. 4).

Thus, we tested the effect of LY 294002 (5–30 μM) on both pAkt levels and the expression of TXNIP. We found that LY 294002 (5–30 μM) exerted a time and a concentration-dependent reduction in pAkt that closely correlated with a significant increase in TXNIP expression (Figure 10; Supplementary Figs. 5 and 6). These results strongly suggest that

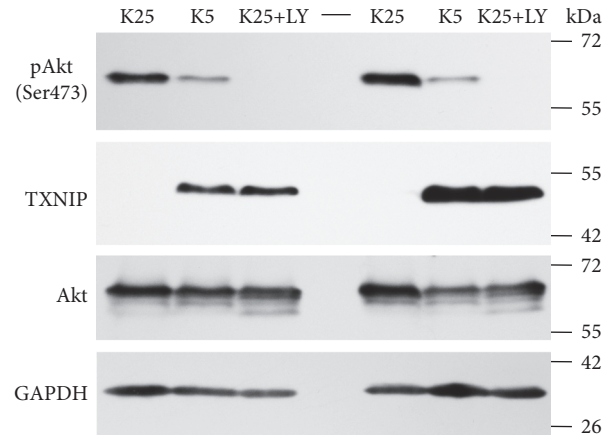


FIGURE 10: PI3K/Akt inhibition induces expression of TXNIP. Primary cultures of rat cerebellar granule neurons (CGN) were incubated with K25 as described in Materials and Methods. After 7 DIV some cells were treated with K5 during 3 h (negative control for Akt phosphorylation in Ser473 and a positive control for TXNIP expression), while other cells were treated with 30 μM LY 294002 (inhibitor of PI3K/Akt pathway). Figure shows representative immunoblots from four independent experiments. GAPDH is the load control and Akt levels do not change. TXNIP: 50 kDa, Akt: 60 kDa, and GAPDH: 37 kDa.

Akt regulates TXNIP expression similar to what is observed under K5 and Sts conditions. Additionally, these observations also suggest that PI3K regulates TXNIP expression through the regulation of Akt activity.

4. Discussion

It has been previously shown that ROS play a critical role in the apoptotic death of neurons. This has been extensively studied in cerebellar granule neurons [31, 32, 35, 36, 45, 46]; however, the mechanisms by which ROS modulate this process are still not clear. There are some evidences showing an involvement of ROS in the regulation of signaling pathways in apoptotic death, particularly the mitogen-activated protein kinases (MAPK) pathway. According to previous studies, ROS seem to mediate the activation of JNK and p38 pathways under apoptotic conditions in CGN [31, 32]. In addition, in nonneuronal cells, ROS induce the dissociation of thioredoxin 1 (Trx1) from ASK1, leading to its activation and the activation of JNK and p38 [47, 48]. Besides, the activation of Akt that inactivates ASK1 through the phosphorylation in Serine 83 is also redox sensitive [49]. Recent studies have also indicated a close relationship of TXNIP with several signaling proteins including Trx1, Trx2, and Akt [50–52]. It has been previously observed that TXNIP overexpression leads to apoptosis in cardiomyocytes [17] and the activation of the intrinsic mitochondrial pathway of apoptosis in INS-1 beta-cells [18].

Thus, it is interesting to understand the role of TXNIP in cell death of CGN and its relationship with ROS modulating signaling molecules such as Akt. In the present study, we found that two different apoptotic stimuli induce the

expression of TXNIP in cultured cerebellar granule neurons (Figures 2 and 5). In the case of potassium deprivation (K5), a peak of TXNIP expression is observed after 2-3 h (Figure 2), which corresponds to the time of ROS generation by potassium deprivation (Figure 1(a)). Similar results were observed for staurosporine treatment that increased TXNIP expression by 3-4 h (Figure 5), which also correlates with the increase in the generation of ROS induced by staurosporine (Figure 1(b)).

It is interesting that the observed effect of both K5 and staurosporine was mediated by ROS as antioxidants markedly reduced the TXNIP expression induced by both K5 and Sts (Figures 3 and 6). Moreover, this effect was also abolished by NOX inhibitors, suggesting that ROS involved in this action are produced, at least partially, by a NOX (Figures 3 and 6). This is in accordance with previous observations showing that these two apoptotic conditions induce both the activation of NOX and ROS produced by a NOX in CGN [32, 53]. The involvement of ROS in the TXNIP expression induced by K5 and Sts was further supported by the observation that hydrogen peroxide was also able to induce markedly the expression of TXNIP (Figure 4).

It is interesting to mention that the TXNIP expression induced by K5 is higher than that observed by directly treating with hydrogen peroxide (Figure 4). This suggests that other conditions apart from ROS could be involved in the upregulation of TXNIP induced by K5. In that regard, it has been shown that the expression of TXNIP gene is modulated by the flow of calcium in CGN [54]. In that study a decrease in calcium levels, by blocking L-type voltage-gated calcium channels, led to an increase in the TXNIP mRNA expression. Conversely, a calcium ionophore evoked a reduction in TXNIP mRNA levels. Besides, the expression of TXNIP mRNA was not affected by pro- or antioxidant conditions. On the other hand, it is known that in CGN cultured in K25 calcium concentration is about 250 nM, while under 5 mM KCl (K5) calcium levels are by 50 nM [55]. We can therefore suggest that K5 condition is regulating TXNIP at both mRNA and protein levels by altering calcium and ROS levels, respectively, while hydrogen peroxide is upregulating TXNIP only at the protein levels. Therefore, these two conditions are probably contributing to inducing of different TXNIP levels under both K5 and H₂O₂ conditions.

TXNIP can participate in the cell death process through its interaction with the reduced form of thioredoxin by inhibiting its biochemical activity [11, 56]. In this regard, it has been proposed the concept of "Redoxisome" to refer to the complex Trx1-TXNIP as a signaling transducer relative to the redox state under normal and pathological conditions [51]. The TXNIP-Trx1 interaction has been extensively studied [6-10], including the possibility that the TXNIP-Trx1 interaction could play a critical role in neuronal death. Interestingly, Trx1 has been found to be a major binding partner of ASK1 [8, 9, 47]. Thus, TXNIP could regulate the Trx1-ASK1 interaction by binding to the catalytic cysteines of Trx1 and, therefore, inhibiting both Trx1 activity and its ability to bind to ASK1 [7, 48]. This condition would lead to the activation of the JNK/p38 pathway.

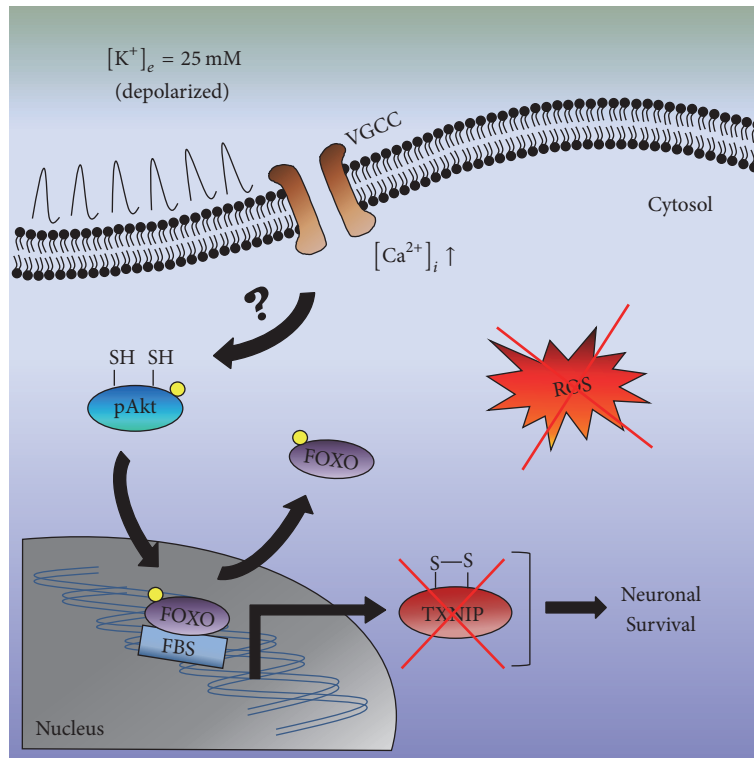
TXNIP could also induce cell death of CGN by Trx2 interaction. It has been reported in pancreatic beta-cells that TXNIP is localized primarily in the nucleus, but under oxidative stress it translocates to the mitochondria. In mitochondria, TXNIP binds to Trx2, thereby releasing ASK1 and resulting in ASK1 phosphorylation/activation and the initiation of the mitochondrial mediated apoptosis [50].

Recently, it was described the mechanism through which activation of PI3K/Akt signaling leads to inhibition of TXNIP protein and mRNA expression, in a model of synaptic activity [20, 57]. Papadia et al. [20] reported that TXNIP contains a functional FOXO site that mediates synaptic activity-dependent inactivation of the promoter. They propose that synaptic activity turns off TXNIP transcription by activating the PI3K/Akt pathway, which maintains FOXO phosphorylated and dissociated from the TXNIP promoter [20]. Thus, we propose here that the ROS generated by the apoptotic conditions, potassium deprivation and staurosporine, decrease Akt activation and therefore an increase in the expression of TXNIP.

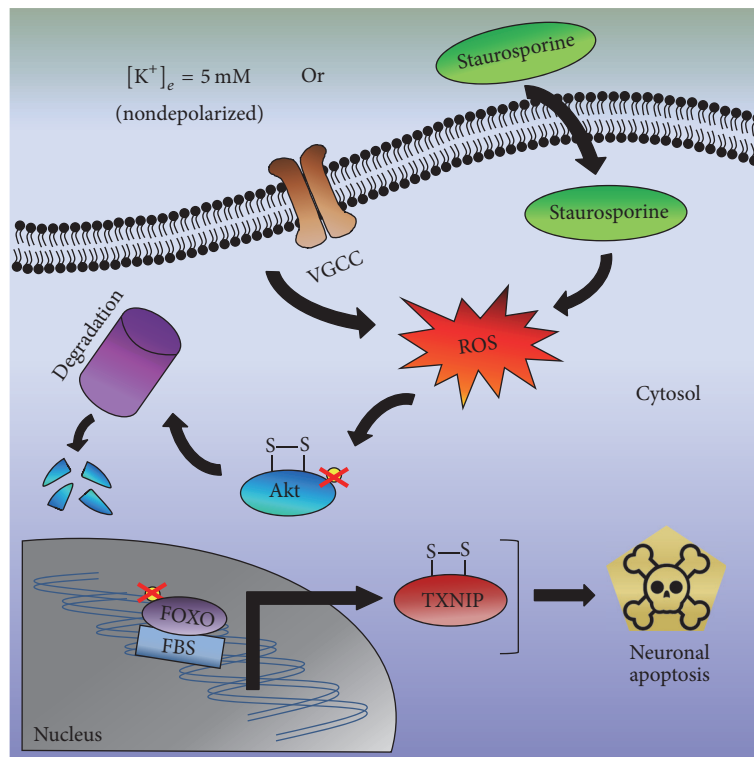
To support this idea, we evaluated the activity of Akt and we found that in basal conditions (depolarizing conditions) Akt is fully activated in these neurons and both apoptotic conditions markedly suppressed the activation of Akt in a time-dependent manner (Figures 7 and 8). We noted temporal differences in the inhibition of this kinase; in the case of potassium deprivation (Figure 7), Akt was inhibited after one hour of treatment, while in the case of staurosporine this occurred after 30 min (Figure 8). This may be due to temporal differences related to the mechanisms involving both conditions. Furthermore, we found that Akt was sensitive to the redox state, since hydrogen peroxide was able to inactivate Akt (Figure 9).

In this regard, it was recently reported by Wani et al. [58] that ROS induced by PDGF cause the oxidation of the Cys124 of Akt2, modulating its inactivation. In addition, H₂O₂ induces the formation of disulfide bridges between Cys297 and Cys311 in Akt, as well as the subsequent dephosphorylation mediated by PP2A. Overexpression of Grx reduces Akt, which abolishes its binding to PP2A, then allowing a sustained Akt phosphorylation, inducing inhibition of apoptosis in cardiac cells [23], indicating an antiapoptotic action of Grx through a redox regulation of Akt. Another possibility is that the ROS generated by apoptotic conditions alter the redox state of PTEN, since it is known that H₂O₂ oxidizes Cys124 in the active site of PTEN that forms an intramolecular disulfide bond with Cys71 [59]. In addition, it was recently reported that ROS produced by NOX1 oxidize the Akt reactive cysteines promoting its interaction with PP2A, which inhibits Akt and therefore induces apoptosis in cardiomyocytes [60].

A possible Akt regulation on TXNIP expression in CGN was further evidenced by the observed increase in TXNIP expression by Akt inhibition (Figure 10; Supplementary Figs. 5 and 6). These results suggest that Akt regulates TXNIP expression similar to what is observed under K5 and Sts conditions. Additionally, our observations suggest that the Akt regulation on TXNIP expression involves the participation of PI3K.



(a)



(b)

FIGURE 11: Schematic representation of the effect of apoptotic conditions on the expression of TXNIP in CGN. (a) In the model of cerebellar granule neurons, it has been shown that under depolarizing conditions in vitro (25 mM KCl, K25) the L-type voltage-gated Ca^{2+} channels are activated, allowing an increase of intracellular calcium. Under these conditions, our data indicate that there is no ROS generation and Akt is not active (phosphorylated in the Ser473). It is known that Akt can phosphorylate FOXO class of transcription factors, inhibiting its connection to FBS and promoting nuclear export of FOXO. This condition prevents the expression of the proapoptotic protein TXNIP, allowing the survival of the neuron. (b) In contrast, under potassium deprivation (K5) or staurosporine treatment, we observe a ROS generation, which may induce the inactivation of Akt and its subsequent proteasomal degradation. This situation could lead to the dephosphorylation of FOXO that, through its interaction with FBS, will induce the expression of TXNIP and the apoptotic process will proceed. VGCC, voltage-gated Ca^{2+} channels; FBS, FOXO binding site; pAkt, phosphorylated Akt; CGN: cerebellar granule neurons; FOXO, Forkhead box protein O.

Taken together, these results suggest that TXNIP could participate in the death of cerebellar granule neurons, probably through its interaction with Trx1 and/or Trx2, which would allow the activation of ASK1 and hence the activation of the signaling pathways downstream as JNK and p38. In these neurons, it has been shown that staurosporine and potassium deprivation cause apoptotic death by the activation of JNK and p38 pathways [31, 32]. On the other hand, Akt, besides the already known inhibition of ASK1, could also participate in the regulation of the expression of TXNIP. It is known that the inhibition of Akt induces an activation of p38 and JNK, whereas active Akt directly phosphorylates ASK1 Ser83, which leads to apoptosis inhibition [49]. Therefore, Akt could be acting at two different levels in the activation of apoptotic death.

We cannot discard the possibility that part of the mechanisms involved in CGN apoptotic death includes the Unfolded Protein Response (UPR) signaling. TXNIP regulates the Unfolded Protein Response (UPR) signaling and is considered a critical node in terminal UPR [61]. It is known that a reduction of TXNIP increases protein ubiquitination and splicing of the UPR regulated transcription factor Xbp1s [62]. TXNIP can also be induced by ER stress through the PERK and IRE1 pathways and represents a critical signal linking between ER stress and inflammation [63].

In conclusion, our findings show that the inhibition of Akt induced by apoptotic conditions that generate ROS correlates with a TXNIP upregulation. In this context, the ROS generated by apoptotic conditions would allow the expression of TXNIP and likely contributes to the apoptotic death of cerebellar granule neurons. This study has shed new light on the mechanism involved in the death of the neurons in response to reactive oxygen species. This suggests that inhibition of TXNIP may represent a novel approach to reduce neuronal death induced by reactive oxygen species. A proposed scheme of the effects of apoptotic conditions (K5 and Sts) on Akt activation and TXNIP expression in CGN is presented in Figure 11.

Abbreviations

CGN:	Cerebellar granule neurons
K25:	25 mM potassium chloride
K5:	5 mM potassium chloride
Sts:	Staurosporine
TXNIP:	Thioredoxin-interacting protein
ROS:	Reactive oxygen species.

Disclosure

Marco Antonio Zaragoza-Campillo is recipient of a scholarship from Conacyt and this work is part of his Ph.D. thesis in Biochemical Sciences, Universidad Nacional Autónoma de México. Part of this work was presented as an abstract in the 1st Neurobiology Meeting of the Mexican Society for Biochemistry according to the following link: http://smb.org.mx/wp-content/uploads/2015/12/Oral_Presentations.pdf.

Competing Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

The authors are grateful to Guadalupe Dominguez for the excellent technical assistance. This work was supported by CONACYT (179234), DGAPA-PAPIIT, UNAM (IN206213), and (IN210716).

References

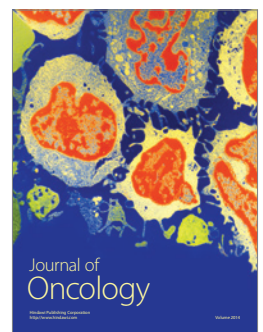
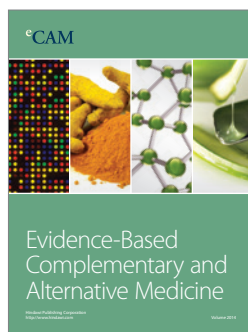
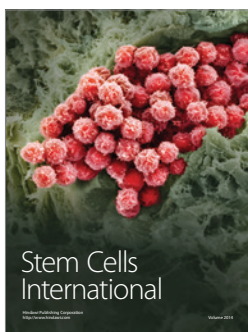
- [1] W. Dröge, "Free radicals in the physiological control of cell function," *Physiological Reviews*, vol. 82, no. 1, pp. 47–95, 2002.
- [2] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. D. Cronin, M. Mazur, and J. Telser, "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease," *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, vol. 39, no. 1, pp. 44–84, 2007.
- [3] N. K. Tonks, "Redox redux: revisiting PTPs and the control of cell signaling," *Cell*, vol. 121, no. 5, pp. 667–670, 2005.
- [4] J. Pourouva, M. Kottova, M. Voprsalova, and M. Pour, "Reactive oxygen and nitrogen species in normal physiological processes," *Acta Physiologica*, vol. 198, no. 1, pp. 15–35, 2010.
- [5] H. Kamata and H. Hirata, "Redox regulation of cellular signalling," *Cellular Signalling*, vol. 11, no. 1, pp. 1–14, 1999.
- [6] A. Nishiyama, M. Matsui, S. Iwata et al., "Identification of thioredoxin-binding protein-2/vitamin D₃ up-regulated protein 1 as a negative regulator of thioredoxin function and expression," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 31, pp. 21645–21650, 1999.
- [7] E. Junn, S. H. Han, J. Y. Im et al., "Vitamin D3 up-regulated protein 1 mediates oxidative stress via suppressing the thioredoxin function," *Journal of Immunology*, vol. 164, no. 12, pp. 6287–6295, 2000.
- [8] H. Yamanaka, F. Maehira, M. Oshiro et al., "A possible interaction of thioredoxin with VDUP1 in HeLa cells detected in a yeast two-hybrid system," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 271, no. 3, pp. 796–800, 2000.
- [9] A. Nishiyama, H. Masutani, H. Nakamura, Y. Nishinaka, and J. Yodoi, "Redox regulation by thioredoxin and thioredoxin-binding proteins," *IUBMB Life*, vol. 52, no. 1-2, pp. 29–33, 2001.
- [10] P. Patwari, L. J. Higgins, W. A. Chutkow, J. Yoshioka, and R. T. Lee, "The interaction of thioredoxin with Txnip: evidence for formation of a mixed disulfide by disulfide exchange," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, no. 31, pp. 21884–21891, 2006.
- [11] T. Yoshida, H. Nakamura, H. Masutani, and J. Yodoi, "The involvement of thioredoxin and thioredoxin binding protein-2 on cellular proliferation and aging process," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1055, pp. 1–12, 2005.
- [12] K. Takeda, T. Noguchi, I. Naguro, and H. Ichijo, "Apoptosis signal-regulating kinase 1 in stress and immune response," *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, vol. 48, pp. 199–225, 2008.
- [13] K.-Y. Kim, S. M. Shin, J. K. Kim, S. G. Paik, Y. Yang, and I. Choi, "Heat shock factor regulates VDUP1 gene expression," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 315, no. 2, pp. 369–375, 2004.
- [14] A. H. Minn, C. Hafele, and A. Shalev, "Thioredoxin-interacting protein is stimulated by glucose through a carbohydrate

- response element and induces β -cell apoptosis," *Endocrinology*, vol. 146, no. 5, pp. 2397–2405, 2005.
- [15] P. C. Schulze, G. W. De Keulenaer, J. Yoshioka, K. A. Kassik, and R. T. Lee, "Vitamin D3-upregulated protein-1 (VDUP-1) regulates redox-dependent vascular smooth muscle cell proliferation through interaction with thioredoxin," *Circulation Research*, vol. 91, no. 8, pp. 689–695, 2002.
- [16] J. Yoshioka, P. C. Schulze, M. Cupesi et al., "Thioredoxin-interacting protein controls cardiac hypertrophy through regulation of thioredoxin activity," *Circulation*, vol. 109, no. 21, pp. 2581–2586, 2004.
- [17] Y. Wang, G. W. De Keulenaer, and R. T. Lee, "Vitamin D3-up-regulated protein-1 is a stress-responsive gene that regulates cardiomyocyte viability through interaction with thioredoxin," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 29, pp. 26496–26500, 2002.
- [18] J. Chen, G. Saxena, I. N. Mungrue, A. J. Lusis, and A. Shalev, "Thioredoxin-interacting protein: a critical link between glucose toxicity and β -cell apoptosis," *Diabetes*, vol. 57, no. 4, pp. 938–944, 2008.
- [19] S. Y. Hong, F.-X. Yu, Y. Luo, and T. Hagen, "Oncogenic activation of the PI3K/Akt pathway promotes cellular glucose uptake by downregulating the expression of thioredoxin-interacting protein," *Cellular Signalling*, vol. 28, no. 5, pp. 377–383, 2016.
- [20] S. Papadia, F. X. Soriano, F. Léveillé et al., "Synaptic NMDA receptor activity boosts intrinsic antioxidant defenses," *Nature Neuroscience*, vol. 11, no. 4, pp. 476–487, 2008.
- [21] M. G. Elgort, J. M. O'Shea, Y. Jiang, and D. E. Ayer, "Transcriptional and translational downregulation of thioredoxin interacting protein is required for metabolic reprogramming during G1," *Genes and Cancer*, vol. 1, no. 9, pp. 893–907, 2010.
- [22] B. L. Stiles, "PI-3-K and AKT: onto the mitochondria," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 61, no. 14, pp. 1276–1282, 2009.
- [23] H. Murata, Y. Ihara, H. Nakamura, J. Yodoi, K. Sumikawa, and T. Kondo, "Glutaredoxin exerts an antiapoptotic effect by regulating the redox state of akt," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 50, pp. 50226–50233, 2003.
- [24] F. Ahmad, P. Nidadavolu, L. Durgadoss, and V. Ravindranath, "Critical cysteines in Akt1 regulate its activity and proteasomal degradation: implications for neurodegenerative diseases," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 74, pp. 118–128, 2014.
- [25] L. Durgadoss, P. Nidadavolu, R. K. Valli et al., "Redox modification of Akt mediated by the dopaminergic neurotoxin MPTP, in mouse midbrain, leads to down-regulation of pAkt," *FASEB Journal*, vol. 26, no. 4, pp. 1473–1483, 2012.
- [26] E. Mariani, M. C. Polidori, A. Cherubini, and P. Mecocci, "Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview," *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, vol. 827, no. 1, pp. 65–75, 2005.
- [27] L. Lossi, G. Gambino, F. Ferrini, S. Alasia, and A. Merighi, "Post-translational regulation of BCL2 levels in cerebellar granule cells: a mechanism of neuronal survival," *Developmental Neurobiology*, vol. 69, no. 13, pp. 855–870, 2009.
- [28] M. Weil, M. D. Jacobson, H. S. R. Coles et al., "Constitutive expression of the machinery for programmed cell death," *Journal of Cell Biology*, vol. 133, no. 5, pp. 1053–1059, 1996.
- [29] W. T. Couldwell, D. R. Hinton, S. He et al., "Protein kinase C inhibitors induce apoptosis in human malignant glioma cell lines," *FEBS Letters*, vol. 345, no. 1, pp. 43–46, 1994.
- [30] T.-L. Yue, C. Wang, A. M. Romanic et al., "Staurosporine-induced apoptosis in cardiomyocytes: a potential role of caspase-3," *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 30, no. 3, pp. 495–507, 1998.
- [31] Y. Ramiro-Cortés and J. Morán, "Role of oxidative stress and JNK pathway in apoptotic death induced by potassium deprivation and staurosporine in cerebellar granule neurons," *Neurochemistry International*, vol. 55, no. 7, pp. 581–592, 2009.
- [32] Y. Ramiro-Cortés, A. Guemez-Gamboa, and J. Morán, "Reactive oxygen species participate in the p38-mediated apoptosis induced by potassium deprivation and staurosporine in cerebellar granule neurons," *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, vol. 43, no. 9, pp. 1373–1382, 2011.
- [33] M. D. Jacobson, M. Weil, and M. C. Raff, "Role of Ced-3/ICE-family proteases in staurosporine-induced programmed cell death," *Journal of Cell Biology*, vol. 133, no. 5, pp. 1041–1051, 1996.
- [34] J. Moran and A. J. Patel, "Effect of potassium depolarization on phosphate-activated glutaminase activity in primary cultures of cerebellar granule neurons and astroglial cells during development," *Developmental Brain Research*, vol. 46, no. 1, pp. 97–105, 1989.
- [35] A. Valencia and J. Morán, "Reactive oxygen species induce different cell death mechanisms in cultured neurons," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 36, no. 9, pp. 1112–1125, 2004.
- [36] A. Valencia and J. Morán, "Role of oxidative stress in the apoptotic cell death of cultured cerebellar granule neurons," *Journal of Neuroscience Research*, vol. 64, no. 3, pp. 284–297, 2001.
- [37] F. Lacy, D. A. Gough, and G. W. Schmid-Schönbein, "Role of xanthine oxidase in hydrogen peroxide production," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 25, no. 6, pp. 720–727, 1998.
- [38] R. P. Englert and E. Shacter, "Distinct modes of cell death induced by different reactive oxygen species: amino acyl chloramines mediate hypochlorous acid-induced apoptosis," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 23, pp. 20518–20526, 2002.
- [39] C. J. Vlahos, W. F. Matter, K. Y. Hui, and R. F. Brown, "A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002)," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 269, no. 7, pp. 5241–5248, 1994.
- [40] E. Domènech-Estévez, H. Baloui, X. Meng et al., "Akt regulates axon wrapping and myelin sheath thickness in the PNS," *Journal of Neuroscience*, vol. 36, no. 16, pp. 4506–4521, 2016.
- [41] B. Hu, L. Emdad, M. D. Bacolod et al., "Astrocyte elevated gene-1 interacts with Akt isoform 2 to control glioma growth, survival, and pathogenesis," *Cancer Research*, vol. 74, no. 24, pp. 7321–7332, 2014.
- [42] P. V. Usatyuk, P. Fu, V. Mohan et al., "Role of c-Met/phosphatidylinositol 3-kinase (PI3k)/Akt signaling in Hepatocyte growth factor (HGF)-mediated lamellipodia formation, reactive oxygen species (ROS) generation, and motility of lung endothelial cells," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 289, no. 19, pp. 13476–13491, 2014.
- [43] M. W. Khan, A. Keshavarzian, E. Gounaris et al., "PI3K/AKT signaling is essential for communication between tissue-infiltrating mast cells, macrophages, and epithelial cells in colitis-induced cancer," *Clinical Cancer Research*, vol. 19, no. 9, pp. 2342–2354, 2013.
- [44] A. Veillette, K. Grenier, K. Brasseur et al., "Regulation of the PI3-K/Akt survival pathway in the rat endometrium," *Biology of Reproduction*, vol. 88, no. 3, article 79, 2013.
- [45] J. B. Schulz, M. Weller, and T. Klockgether, "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," *Journal of Neuroscience*, vol. 16, no. 15, pp. 4696–4706, 1996.
- [46] M. Olguín-Albuerne, J. M. Ramos-Pittol, A. Coyoy, C. P. Martínez-Briseño, G. Domínguez, and J. Morán, "Peroxynitrite is involved in the apoptotic death of cultured cerebellar granule neurons induced by staurosporine, but not by potassium deprivation," *Neurochemical Research*, vol. 41, no. 1-2, pp. 316–327, 2016.
- [47] M. Saitoh, H. Nishitoh, M. Fujii et al., "Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1," *EMBO Journal*, vol. 17, no. 9, pp. 2596–2606, 1998.
- [48] H. Ichijo, E. Nishida, K. Irie et al., "Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways," *Science*, vol. 275, no. 5296, pp. 90–94, 1997.
- [49] R. Zhang, D. Luo, R. Miao et al., "Hsp90-Akt phosphorylates ASK1 and inhibits ASK1-mediated apoptosis," *Oncogene*, vol. 24, no. 24, pp. 3954–3963, 2005.
- [50] G. Saxena, J. Chen, and A. Shalev, "Intracellular shuttling and mitochondrial function of thioredoxin-interacting protein," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, no. 6, pp. 3997–4005, 2010.
- [51] E. Yoshihara, S. Masaki, Y. Matsuo, Z. Chen, H. Tian, and J. Yodoi, "Thioredoxin/Txnip: redoxisome, as a redox switch for the pathogenesis of diseases," *Frontiers in Immunology*, vol. 4, article 514, 2013.
- [52] J. Chen, S. T. Hui, F. M. Couto et al., "Thioredoxin-interacting protein deficiency induces Akt/Bcl-xL signaling and pancreatic beta-cell mass and protects against diabetes," *The FASEB Journal*, vol. 22, no. 10, pp. 3581–3594, 2008.
- [53] A. Guemez-Gamboa and J. Morán, "NOX2 mediates apoptotic death induced by staurosporine but not by potassium deprivation in cerebellar granule neurons," *Journal of Neuroscience Research*, vol. 87, no. 11, pp. 2531–2540, 2009.
- [54] T. Saitoh, S. Tanaka, and T. Koike, "Rapid induction and Ca²⁺ influx-mediated suppression of vitamin D3 up-regulated protein 1 (VDUP1) mRNA in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis," *Journal of Neurochemistry*, vol. 78, no. 6, pp. 1267–1276, 2001.
- [55] J. Moran, T. Itoh, U. R. Reddy, M. Chen, E. S. Alnemri, and D. Pleasure, "Caspase-3 expression by cerebellar granule neurons is regulated by calcium and cyclic AMP," *Journal of Neurochemistry*, vol. 73, no. 2, pp. 568–577, 1999.
- [56] S. S. Sheth, L. W. Castellani, S. Chari et al., "Thioredoxin-interacting protein deficiency disrupts the fasting-feeding metabolic transition," *Journal of Lipid Research*, vol. 46, no. 1, pp. 123–134, 2005.
- [57] G. E. Hardingham and H. Bading, "Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders," *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 11, no. 10, pp. 682–696, 2010.
- [58] R. Wani, J. Qian, L. Yin et al., "Isoform-specific regulation of Akt by PDGF-induced reactive oxygen species," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 108, no. 26, pp. 10550–10555, 2011.
- [59] S.-R. Lee, K.-S. Yang, J. Kwon, C. Lee, W. Jeong, and S. G. Rhee, "Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H₂O₂," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 23, pp. 20336–20342, 2002.
- [60] K. Matsuno, K. Iwata, M. Matsumoto et al., "NOX1/NADPH oxidase is involved in endotoxin-induced cardiomyocyte apoptosis," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 53, no. 9, pp. 1718–1728, 2012.
- [61] A. G. Lerner, J.-P. Upton, P. V. K. Praveen et al., "IRE1 α induces thioredoxin-interacting protein to activate the NLRP3 inflammasome and promote programmed cell death under irremediable ER stress," *Cell Metabolism*, vol. 16, no. 2, pp. 250–264, 2012.
- [62] S. Lee, S. Min Kim, J. Dotimas et al., "Thioredoxin-interacting protein regulates protein disulfide isomerases and endoplasmic reticulum stress," *EMBO Molecular Medicine*, vol. 6, no. 6, pp. 732–743, 2014.
- [63] C. M. Osowski, T. Hara, B. O'Sullivan-Murphy et al., "Thioredoxin-interacting protein mediates ER stress-induced β cell death through initiation of the inflammasome," *Cell Metabolism*, vol. 16, no. 2, pp. 265–273, 2012.



Hindawi
Submit your manuscripts at
<https://www.hindawi.com>



Chapter 8

**ROLE OF REACTIVE OXYGEN SPECIES AS
SIGNALING MOLECULES IN THE REGULATION OF
PHYSIOLOGICAL PROCESSES OF
THE NERVOUS SYSTEM**

***Mauricio Olguín-Albuerne^{1,*}, Marco Antonio Zaragoza-Campillo^{1,†}
and Julio Morán^{1,‡}***

¹División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular,
Universidad Nacional Autónoma de México,
México City, México

ABSTRACT

In the nervous system, reactive oxygen species (ROS) have been implicated in several physiological and pathological events. It has been suggested that the members of the family of the NADPH-oxidases (NOX) could be a source of ROS involved in many of these processes. In hippocampus, ROS produced by NOX are required for the NMDA receptor-dependent long-term potentiation (LTP), thereby regulating hippocampal synaptic plasticity and memory formation. In developing neurons, ROS regulate the dynamics of the axonal growth cone during the establishment of neuronal networks and, in neurons from *Aplysia*, ROS produced by NOX promote axonal growth. In addition, ROS produced by NOX critically influence the neuronal proliferation and neurogenesis and they have been implicated in the progression of the programmed cell death of neurons during cerebellar development.

Most of the physiological and pathological actions of ROS are mediated by modification of the redox state of several proteins. The oxidation of these proteins occurs in specific amino acid residues such as cysteine, tyrosine and tryptophan. In particular, the oxidation of cysteine residues is a major mechanism for the control of several

* E-mail: albuerne@email.ifc.unam.mx.

† E-mail: zaragoza@email.ifc.unam.mx.

‡ Tel.: (5255) 56 22 56 16, Fax: (5255) 56 22 56 07, E-mail: jmoran@ifc.unam.mx. Both (I and II) authors contributed equally to this work.

proteins. These molecules include channels, enzymes and proteins from the cytoskeleton. For example, in the striatum, the hydrogen peroxide modulates dopamine release by the oxidation of the ATP-sensitive K^+ channels and, in dorsal root ganglion neurons, ROS induce the growth cone collapse by the oxidation of CRMP2.

It has been proposed that ROS also alter the redox state of the proteins of the signaling pathways. For example, ROS produced in response to growth factors control the proliferation and neurogenesis of neural precursor cells through the redox regulation of PI3K/Akt pathway. On the other hand, the oxidation of thioredoxins (Trx) and glutaredoxins (Grx1) leads to their dissociation from ASK1 that dephosphorylates and promotes its activation and the consequent stimulation of JNK and p38, which are involved in several physiological processes such as apoptosis. Other proteins such as thioredoxin-interacting protein (TXNIP) negatively regulates Trx1 and controls the cellular redox state. Finally, Akt has also been reported to be inactivated by direct oxidation, but it can also be activated by the oxidation of PTEN.

In this chapter, we review the experimental evidences supporting a role for ROS in cell signaling in the nervous system and we discuss the interactions of ROS with several proteins as part of the mechanisms that regulates neuronal physiology.

ABBREVIATIONS

AMPA: α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid

AP5: 2-amino-5-phosphonopentanoic acid

apCAM: *Aplysia* cell adhesion molecule

ASK1: Apoptosis signal-regulating kinase 1

Bcl- X_L : B-cell lymphoma-extra large

CNS: Central Nervous System

CRMP2: Collapsin response mediator protein 2

DPI: Diphenyleneiodonium chloride

EGF: Epidermal growth factor

ERK1/2: Extracellular signal-regulated kinases-1/2

FGFR: Fibroblast growth factor receptor

GAP-43: Growth-associated protein-43

Grx: Glutaredoxin

GST: Glutathione S-Transferase

H₂O₂: Hydrogen peroxide

JNK: Jun N-terminal kinase

MAPK: Mitogen-activated protein kinase

MAPKK: Mitogen-activated protein kinase kinase

MAPKKK: Mitogen-activated protein kinase kinase kinase

MSN: Medium spiny neurons

NADPH: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NGF: Nerve Growth Factor

NMDA: N-methyl-D-aspartate

NOX: NADPH oxidase

OPA1: Optic atrophy 1

PDGF: Platelet-derived growth factor

PKC: Phosphoinositide dependent kinase 1

PI3K: Phosphatidylinositol 3-kinase
PIP₂: Phosphatidylinositol (4, 5)-bisphosphate
PIP₃: Phosphatidylinositol (3, 4, 5)-triphosphate
PKC ϵ : Protein kinase C ϵ
PTEN: Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten
ROMO1: Reactive oxygen species modulator 1
ROS: Reactive oxygen species
RTK: Receptor tyrosine kinase
SCG10: Superior cervical ganglion-10
TNF- α : Tumor necrosis factor- α
Trk: Tropomyosin-related receptor kinase
Trx: Thioredoxin
TrxR1: Thioredoxin reductase 1
TXNIP: Thioredoxin-interacting protein
USP9X: Ubiquitin-specific peptidase 9, X-linked
VEGFR: Vascular endothelial growth factor receptor

INTRODUCTION

It is well known that reactive oxygen species (ROS) are important regulators of numerous cellular functions. Many advances in the field have been achieved in recent years due in part to the advances in the methodologies employed for the study of the actions of ROS. This has allowed to increase our knowledge about the role of ROS as mediators of different physiological events. In the nervous system, the majority of these studies have focused on elucidating the role of ROS in the neuropathologies and neurodegenerative diseases, which have contributed to the understanding of the mechanisms by which the ROS are produced and regulate these processes. Although there have been important advances in the field, there are still many gaps in our knowledge about the role of ROS in the physiology of the nervous system. In this chapter we will detail some studies on the nervous system in which the ROS play a role as regulators of cellular function in the physiology, as well as the generation and progress of certain pathological conditions of the nervous system.

GENERAL MECHANISMS OF ROS ACTIONS

Several studies have described different physiological processes in which ROS act as cellular regulators through the oxidation of specific proteins, leading to a modification of their state of activation and influencing specific signaling pathways and cell function. This occurs mainly through the oxidation of proteins in specific amino acid residues such as cysteine, tyrosine and tryptophan [1]. Particularly, the oxidation of cysteines is a major target to control protein functions. For example, it is well known that ROS, particularly H₂O₂, induce the activation of several protein kinases, as well as the activation or inactivation of several protein phosphatases mediated by the oxidation of cysteines [2-5]. Hydrogen peroxide exerts different modifications depending on the type of reaction. In this chapter we review different

examples in which H_2O_2 alters the function of the proteins through the modification of cysteine residues of different proteins, as well as the protein-glutathione and protein-thioredoxin complexes.

CYSTEINE MODIFICATIONS

The functionality of a wide variety of proteins depends on a series of reversible reactions that are controlled by the redox state of the cell. In this regard, the oxidation of cysteines by hydrogen peroxide is a main mechanism. Once the thiolate group of reactive cysteines interacts with H_2O_2 , it is converted to sulfenic acid (R-SOH). At this point, different reactions may occur in the absence of glutathione, thioredoxin and glutaredoxin. The highly reactive sulfenic acid can reduce an adjacent thiol group, and a disulfide bond will be formed. Alternatively, sulfenic acid can further be oxidized by hydrogen peroxide, forming sulfinic acid (R-SO₂H). This group is important in the redox regulation of some proteins such as peroxiredoxins. Despite its stability, sulfinic acid can be reduced by sulfiredoxins and sestrins to sulfenic acid [6, 7], or it can be oxidized by hydrogen peroxide forming sulfonic acid (R-SO₃H); so far it is not known any enzymatic reaction to reduce the sulfonic acid [8, 9]. On the other hand, sulfenic acid can also form a disulfide link between reduced glutathione and the cysteine residue of another protein, forming a glutathionylated protein; however, if glutathione is in an oxidized form, it can be established a bond with the thiolate group of a cysteine residue. In addition, the disulfide bonds formed between cysteines can be reduced by thioredoxin or glutaredoxin, forming a disulfide bond between the protein and any of these proteins. Both processes may be important for the regulation of the activity of several proteins, as it is the case for ASK1 and CRMP2. The bond formed between protein-thioredoxin and protein-glutaredoxin can be broken by hydrogen peroxide (Figure 1) [10-12].

OXIDATIVE MODIFICATIONS OF SIGNALING PROTEINS

It is known that the oxidation of proteins involved in cellular signaling represents a critical posttranslational regulatory mechanism [13]. The redox regulation of intracellular signals involved in physiological processes requires efficient cellular sources of ROS (NADPH-oxidase, electron chain transport, etc.), as well as proteins sensitive to the redox state. There are several examples that fulfill these features and that involve not only signaling proteins, but also other type of proteins such as receptors.

Most of these studies have been focused on the regulation of signaling molecules through the oxidation of cysteine residues. In this chapter, we describe some examples.

a) Trx /Grx and ASK1

The reductive activity of Trx1 thiols depends on the cysteine 32 (Cys32) and 35 (Cys35), while that from the mitochondrial isoform (Trx2) depends on Cys90 and Cys93 [14], which constitute a redox catalytic CGPC motif [15, 16].

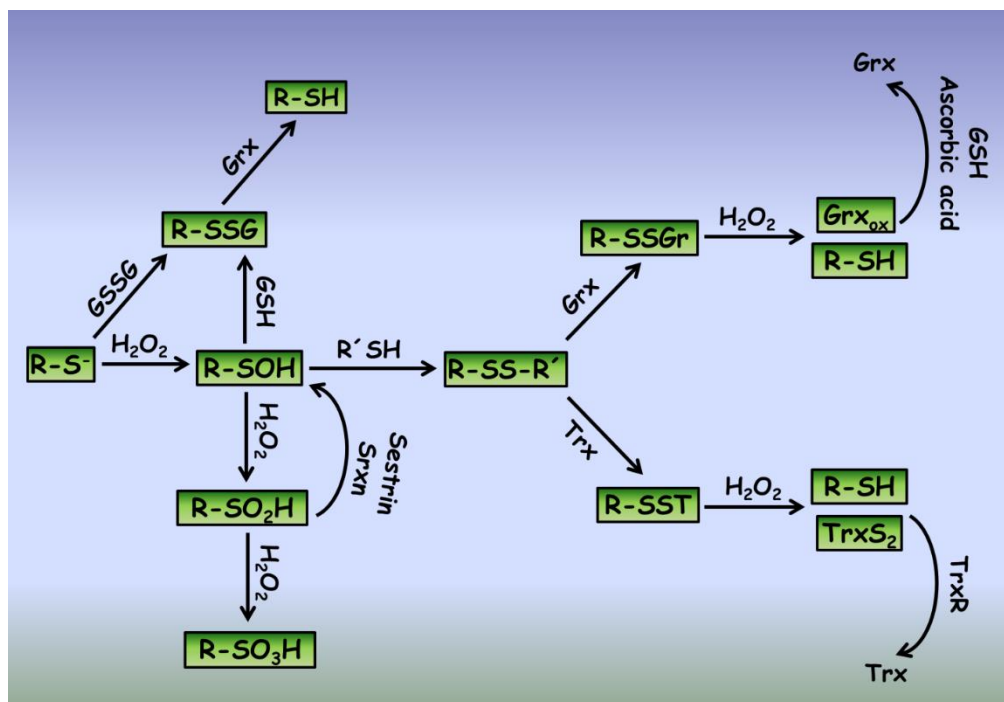


Figure 1. *Mechanisms of cysteine oxidation involved in redox signaling.* The reaction between hydrogen peroxide and the reactive cysteine thiolate group (R-S⁻) produces sulfenic acid (R-SOH), which increases the probability to generate a disulfide bridge (R-SS-R') with an adjacent thiol group (R'SH). If R-SOH is oxidized by H₂O₂ then sulfinic acid (R-SO₂H) is formed, which is a reaction that can be reduced by sestrin and sulfiredoxin (Srxn). When H₂O₂ oxidizes R-SO₂H then sulfonic acid (R-SO₃H) is formed. The presence of reduced glutathione (GSH) and proteins containing an R-SOH group generates glutathionylated proteins (R-SSG), but if glutathione is in the oxidized form (GSSG), it binds to the thiolate group of cysteine residues, forming R-SSG. Thioredoxins and glutaredoxins can reduce the disulfide bonds between oxidized proteins through the formation of intermolecular disulfide bonds, which can be dissociated by H₂O₂.

Proline is the key amino acid for the reductive action of the CGPC motif. In Trx1, when proline is replaced by serine or threonine, the protein experiences marked changes in its redox properties, as well as in the stability between the oxidized and reduced forms [17]. Similarly, the active catalytic site CPYC of Grx contains two cysteine residues (Cys22 y Cys25) susceptible to be oxidized [18]. In contrast to Trx that forms an intramolecular disulfide bond between the cysteines of its catalytic site Trx-[S-S], Grx specifically form disulfide bonds with glutathione. During its catalytic cycle a covalent intermediary is formed between the Cys22 of Grx and glutathione (Grx-S-S-glutathione) [19]. During oxidative stress, Grx-S-S-glutathione seems to be the predominant form, instead of Grx-[S-S] [20, 21].

It is suggested that the Cys250 of ASK1 binds to the Cys32 or Cys35 of Trx1 via an intermolecular disulfide bridge, which can be broken by ROS [14, 22]. This interaction can also be eliminated by TXNIP, which binds to the Cys 32 of Trx1 therefore reducing the ability of Trx1 to bind ASK1 [23]. It has been shown that the Cys30 of ASK1 forms an intermolecular disulfide bridge with the Cys90 of Trx2 [14]. On the other hand, the cysteines of the active site of Grx (Cys22 and Cys25) are responsible for the interaction between Grx and ASK1, probably through the formation of an intramolecular disulfide bond in Grx [24].

b) Trx and PTEN

PTEN is a tumor suppressor protein that can be reduced by intracellular agents, supporting the idea that the reversible oxidation and reduction of cysteines in the active site represents a key mechanism for PTEN regulation [25]. It is known that H₂O₂ oxidizes Cys124 in the active site of PTEN that forms an intramolecular disulfide bond with Cys71, leading to PTEN inactivation [25].

The binding of Trx1 to PTEN is mediated by the formation of a disulfide bridge between the Cys32 of the Trx1 active site and the Cys212 from the C2 domain of PTEN, which induces a steric effect in the catalytic site of PTEN and the C2 domain that binds to membrane lipids. This condition obstructs the access of the substrate to the catalytic site of the PTEN phosphatase domain as well as the binding of the C2 domain to the inner side of the plasmatic membrane [26]. Due to the fact that Trx directly interacts with PTEN, it has been suggested that the reduction of PTEN is carried out by the binding of oxidized PTEN to Trx1 in a reduced state. It is unknown whether the reductase TrxR1 reverts the interaction between Trx1 and PTEN and cannot be excluded that glutathione and Grx break this union.

c) Trx and TXNIP

It has been shown that during oxidative conditions, TXNIP contains an intramolecular disulfide bond formed by Cys63 and Cys247, which is able to interact with the reduced form of Trx by forming an intermolecular disulfide bond between Cys247 from TXNIP and Cys32 from Trx [27]. Hwang et al. [28] recently showed that ROS can oxidize the intermolecular disulfide bond between TXNIP and Trx leading to their dissociation. After restoration of the redox potential by antioxidant conditions, the Trx reactive cysteines interact with the bond formed between Cys63 and Cys247 from two TXNIP molecules. After that, these two TXNIP molecules undergo a structural rearrangement that involves the exchange of the former disulfide bond to a new one between the Cys63 and Cys190 from two TXNIP molecules and then the *novo* formation of the intermolecular disulfide bond between the Trx Cys32 and the Cys247 from TXNIP [28].

d) Akt

Murata *et al.* [29] reported that the exposure of cardiac cells to H₂O₂ induces the formation of an intramolecular disulfide bond between Cys297 and Cys311 of the Akt kinase domain, which leads to its dephosphorylation. These cysteines are conserved in the three Akt isoforms. By using site-directed mutagenesis, they also showed that the formation of this bond leads to Akt proteasomal degradation [29]. It has been shown that the PDGF induces ROS generation in smooth muscle cells [30] and that the Akt2 redox-regulation participates in the glucose consumption induced by PDGF. In this regard, it was recently reported by Wani *et al.* [31] that ROS induced by PDGF cause the oxidation of the Cys124 of Akt2, modulating its inactivation... Cys124 is not conserved in Akt1 and Akt3. These results point to the Cys124-Cys297 or Cys124-Cys311 intramolecular bonds as responsible for the Akt2 inhibition by oxidation [31]. Interestingly, the exogenous H₂O₂ administration activated Akt1

y Akt2, but intracellular accumulation of H₂O₂ resulted in the inactivation of Akt2 only, suggesting a differential action of the ROS source on Akt isoforms activation. It is proposed that the activation of Akt2 by phosphorylation is inhibited by oxidation. This highlights that Akt signaling can be modulated by physiological levels of ROS with functional consequences on the cellular and molecular processes induced by PDGF [31].

e) MAPKs (JNK, p38 and ERK)

JNK activity can be modulated by ROS by an indirect way. For example, it has been shown that GST π is inactivated *in vitro* by H₂O₂ by forming both an intramolecular disulfide bond between the Cys47 and the Cys101 and an intermolecular bond between the Cys47 of two monomers of GST [32]. On the other hand, it is known that the binding of the monomeric GST π to JNK inhibits the activation of JNK. Therefore, ROS allow the JNK activation by favoring the formation of GST π oligomers that are unable to bind JNK. This has been shown in cultured mouse fibroblasts exposed to pro-oxidant conditions. Under these conditions it is observed the formation of dimers and larger aggregates of GST π , JNK activation and the consequent phosphorylation of c-Jun and apoptosis [33].

It was recently reported that p38 is oxidized upon exposure to exogenous H₂O₂ or prostaglandin J₂ (an inflammatory mediator), resulting in the inactivation of its kinase activity despite of being phosphorylated. Both, the Cys119 and the Cys162 of p38 were identified as sites of oxidation, with no formation of disulfide bridges. As p38 can be oxidized under micromolar concentrations of the prostaglandin J₂, this could represent a signaling event physiologically relevant during inflammation [34].

ROS may exert different actions on the signaling molecules depending on their concentration. In a previous study [35], it was reported that low concentrations of H₂O₂ (0.1 μ M) oxidize the Cys38 and Cys214 of ERK2, which does not occur with higher concentrations (10 μ M). It was also found that the Cys162 of p38 was also oxidized, but only at a concentration of 20 μ M of H₂O₂. In the case of JNK2, several cysteines are directly oxidized with 1 μ M of H₂O₂: Cys41, Cys116, Cys137, Cys177 and Cys222, but none of these are oxidized at a concentration of 0.1 μ M of H₂O₂. These variable actions of ROS in the oxidation of MAPKs could contribute to the differential control of events such as proliferation and disruption of the cell cycle in some cells [35]. This is an example that low and high concentrations of ROS may produce opposite effects depending on the cysteines oxidized.

f) Receptor Tyrosine Kinase

It is known that one of the consequences of an increase in ROS levels is the inhibition of protein phosphatases, which regulate the activity of several intracellular signaling pathways, including the PI3K/Akt, PLC γ , MAPK and JAK/STAT pathways. For example, some of the physiological and pathological effects of the inhibition of protein tyrosine phosphatases induced by ROS is the activation of cell signals mediated by the receptor tyrosine kinase (RTKs) [36, 37]. Recently, several studies have implicated ROS in the transactivation of RTKs, i.e., in the activation of the receptor independent of its ligand [38-40].

Among the three types of Trk receptors, the BDNF receptor, TrkB, is the most studied RTK in the CNS of mammals. This receptor is widely expressed in both mature and developing neurons and participates in various biological processes such as survival and neuronal differentiation, as well as the physiology, structure and plasticity of synapses [41]. Recently, it was reported in cortical neurons that endogenous and exogenous ROS directly activate TrkB receptor by a mechanism that requires the Src family kinases, i.e., TrkB is activated by a transactivation mechanism mediated by physiological levels of ROS without the participation of BDNF. One of the functional consequences of this ROS-mediated TrkB transactivation is an increase of the survival of cultured neurons [40]. In addition, both the H₂O₂ and BDNF induced the activation of ERK1/2, a signaling protein downstream of TrkB receptors [40].

Furthermore, a recent study in mouse cortical neurons showed that ROS and the NADPH-oxidase (NOX) activity are required for the transactivation of TrkB and PDGF β by serotonin (5-HT) [42]. This study suggests that serotonin activates their G α i coupled receptors, leading to PLC activation, which induces calcium release from the endoplasmic reticulum and the activation of PKC. It is suggested that PKC activates NOX, resulting in ROS production. This condition or the exogenous application of H₂O₂ can induce the phosphorylation/activation of the TrkB receptors and PDGF β . [42]. In the case of the NGF receptor, TrkA, it has also been reported that the redox state regulates its activity through tyrosine phosphatases [43]. There is no much evidence to explain the mechanism by which ROS promote the phosphorylation of TrkA, TrkB and PDGF β receptors. In the case of the PDGF β receptor, it has been identified two conserved cysteine residues, which are critical for the RTK kinase activity: Cys822 and Cys940. In this regard, it has been observed that the kinase activity of the receptor is not due to the formation of a disulfide bond between these cysteines, and that the Cys940 mutation only induces a conformational change in the protein [44].

It is known that ROS can also transactivate the EGF receptor [45] and that the activation of this receptor induces an increase in the endogenous levels of H₂O₂ [46], suggesting that the EGF receptor is sensitive to the redox state, and that it induces the generation of ROS. In this context, it was recently demonstrated in cells stimulated with EGF that the Cys797 of the catalytic site of the EGF receptor is directly oxidized by endogenous H₂O₂ that further increases its kinase activity. ROS are apparently produced through the association of EGF receptor with NOX2, one of the 7 homologues of NOX. This highlights the importance of endogenous H₂O₂ in the signaling of the EGF receptor as a result of the activation of NOX [47].

The VEGF receptor (VEGFR) is another example of an RTK that is regulated by direct oxidation of cysteines. In particular, a recent study in endothelial cells showed that VEGFR-2 activity is negatively regulated by the reversible formation of a disulfide bond between the Cys1199 and Cys1206, where the Cys1206 is the direct target of the oxidation by ROS in the absence of the antioxidant enzyme PrxII. Therefore, under physiological conditions, PrxII preserves the reduced state of VEGFR-2 by blocking its oxidative inactivation by H₂O₂ [48].

The FGF type 1 receptor (FGFR-1) also contains a cysteine (Cys488) that is susceptible to be oxidized. This residue was first characterized in the corresponding Cys277 of Src kinase [49]. This study showed that Src in its reduced form is fully active, but it becomes partially inactivated under oxidizing conditions. It is known that the oxidation of the Src Cys277 generates an intermolecular disulfide bond with the Cys277 of other monomer of Src, forming

a dimer linked by the disulfide bridge Cys277-Cys277. However, other study shows that H₂O₂ induces Src activation through the formation of an intramolecular disulfide between Cys245 and Cys487, which takes place during cell adhesion [50]. The Cys277 of Src is located in the sequence GQGCFG of its catalytic domain called "Gly loop". Similarly, FGFR-1 contains the Cys488 in the corresponding conserved sequence. In this regard, FGFR-1 is also inactivated by oxidation of the Cys488, which also generates a dimer linked by an intermolecular disulfide bridge; although, in this case, other cysteines seem to participate to stabilize the dimer by oxidation [49].

All these studies suggest that ROS represent a key component for the transactivation pathways in neurons and highlight the physiological relevance of ROS in the mechanisms of transactivation, where ROS could activate multiple RTKs through the inactivation of phosphatases of tyrosine, rather than the transactivation of RTK by GPCR. Table 1 shows the redox sensitive cysteines of some signaling proteins.

PHYSIOLOGICAL ROLE OF ROS IN THE NERVOUS SYSTEM

ROS act as signal molecules that regulate different processes in the adult and developing brain [64-68]. Coincidentally, it is in the neurogenic regions of the developing and adult brain where ROS are relatively elevated in physiological conditions [65, 66, 69]. Particularly, during nervous system development, ROS have been shown to regulate the proliferation of neural stem cells and the neuronal differentiation [64-68]. ROS have also been shown to act as morphogens during brain development. For example, it has been observed an increased mitochondrial ROS levels, aberrant axonal targeting and abnormal brain formation when the mitochondrial SOD of the fruit fly *Drosophila* is mutated.

Table 1. Cysteine oxidation with physiological relevance in cell signaling

Protein	Cysteine	Oxidative modification	Physiological result	Refs
Trx1	Cys32 and Cys35	Intramolecular disulfide bond	Dissociates from ASK1 in the cytosol inducing apoptosis	[15, 51, 52]
	Cys32 or Cys35	Intermolecular disulfide bond with Cys250 of ASK1	Inhibits the activity of ASK1 in the cytosol	[14, 22]
Trx2	Cys90 and Cys93	Intramolecular disulfide bond	Dissociates from ASK1 in the mitochondrion inducing apoptosis	[14]
	Cys90	Intermolecular disulfide bond with Cys30 of ASK1	Inhibits the activity of ASK1 in the mitochondrion	[14, 53, 54]
Grx	Cys22 and Cys25	Glutathionylation and/or intramolecular disulfide bond	Dissociates from ASK1 inducing apoptosis	[18, 24, 55]

Table 1. (Continued)

Protein	Cysteine	Oxidative modification	Physiological result	Refs
TXNIP	Cys63 and Cys247 Cys247	Intramolecular disulfide bond Intermolecular disulfide bond with Cys32 of Trx1	Interaction with Trx1 Inhibition of reducing activity of Trx1 inducing cell death	[27] [27, 28, 56]
Akt	Cys297 and Cys311	Intramolecular disulfide bond	Binding of PP2A and inhibition of cell survival	[29, 57, 58]
Akt2	Cys124	Intramolecular disulfide bond with Cys297 o Cys311	Inactivation of Akt2, glucose uptake	[31]
JNK	Cys41, Cys162, Cys137, Cys177, Cys222	Direct oxidation	Cell cycle arrest	[35]
p38	Cys119 and Cys162	Direct oxidation	Inactivation of p38, inflammation	[34, 35]
ASK1	Cys250	Conformational change by direct oxidation	Formation of multimers of ASK1 which activates cell apoptosis	[59, 60]
PTEN	Cys124 and Cys71 Cys212	Intramolecular disulfide bond Intermolecular disulfide bond with Cys32 of Trx1	Inactivation of PTEN Inhibition of the phosphatase activity of PTEN inducing proliferation and cell survival	[25, 61, 62] [26]
ERK2	Cys38 and Cys214	Direct oxidation	Promotes proliferation	[35]
PKC	Cysteine-rich regions	Direct oxidation	Neuronal differentiation	[63]
Src	Cys277 Cys245 and Cys487	Intermolecular disulfide bond with Cys277 between two Src Intramolecular disulfide bond	Inactivation by the formation of a dimer Activation of Src in cell adhesion events	[49] [50]
EGFR	Cys797	Direct oxidation	Activation of EGFR	[47]
VEGFR-2	Cys1199 and Cys1206	Intramolecular disulfide bond	Inactivation kinase of VEGFR-2	[48]
FGFR-1	Cys488	Direct oxidation	Inactivation by the formation of a dimer	[49]
GST π	Cys47 and Cys101	Intramolecular disulfide bond	Formation of oligomers of GST π that cannot bind to JNK inducing apoptosis	[32, 33]
CRMP2	Cys540	Intermolecular disulfide bond with Cys540 between two CRMP2	Induce growth cone collapse	[64]

These flies also present clusters of nuclei located in the neuropile of the central brain, where normally does not contain these organelles [70].

In mammals, during the postnatal development of rat cerebellum, ROS is transiently produced at different stages of development and is restricted to specific regions of the developing cerebellar cortex. In addition, different members of the NOX family are differentially expressed during cerebellar development. The inhibition of ROS during rat development, leads to changes in cerebellar folia formation, as well as an alteration in motor behavior [65]. These studies suggest that the proper regulation of ROS during critical periods of time is required for normal brain development.

Little is known about the mechanisms related to the physiological actions of ROS in the nervous system, but three different conditions have been identified in these processes: 1) ROS are produced in response to a physiological stimulus induced by a growth factor or a neurotransmitter and the most likely source is a NOX and/or the mitochondria. 2) It is necessary a target protein with specific chemical features that allow to interact with ROS, as it was previously described. 3) These events should occur restrained in time and space in order to be specific; otherwise ROS could trigger unspecific responses, including cell death. In this chapter we describe some studies that exemplify the physiological actions of ROS in the nervous system.

a) Proliferation

A growing body of experimental evidence suggests that ROS induce proliferation of neural cells. It has been shown that the neural progenitor cells derived from embryonic hippocampus generate ROS under basal conditions and that the antioxidants and inhibitors of the ROS-producing enzyme NOX reduce their proliferation [71]. In these cells, it has been observed a correlation between the levels of ROS and proliferation [72]. Furthermore, *in vivo* administration of the antioxidant α -lipoic acid reduced cell proliferation in the dentate subgranular zone of the hippocampus [72].

Le Belle and collaborators [66] demonstrated in neurosphere cultures obtained from the subventricular zone that H_2O_2 promoted self-renewal of neural progenitor cells. Also, when ROS levels were lowered, the number of neurospheres was decreased and restored by exogenous addition of H_2O_2 . Consistent with these studies, high levels of ROS have been detected in the neurogenic regions of the subventricular zone, the glomerular layer of the olfactory bulb and the subgranular zone [66, 69]. In addition, BDNF also increased the levels of ROS and self-renewal of progenitor cells; however, none of these effects were observed in BDNF-treated cells derived from KO NOX2 mice. Besides, the KO NOX2 mice have less proliferating cells in the subventricular zone than wild type mice and the pharmacological inhibition of NOX diminished both the generation of ROS and proliferation in the subventricular zone. These results suggest that the ROS produced by BDNF are implicated in the proliferation and that the ROS source is NOX2.[66]. Furthermore, H_2O_2 also induced the oxidation of PTEN in these cells.

Finally, H_2O_2 activates the pathway PI3K/Akt/mTOR through the inactivation of PTEN [73]. In KO PTEN mice neither H_2O_2 nor BDNF were able to stimulate neurosphere formation. Thus, the effect of ROS in neural precursor cells seems to be mediated by the redox inactivation of PTEN [66].

b) Neuronal Differentiation

It has been found that ROS are critical determinants of neuronal differentiation in several experimental models. Part of this idea is supported by the *in vivo* observations of a transient ROS production in response to trophic conditions that induce neuronal differentiation in specific neurogenic regions of the brain [65, 66, 69]. Under these conditions, the differentiation process is delayed or diminished when ROS are decreased by antioxidants or inhibitors of the ROS sources.

Many of the studies on neuronal differentiation have been performed in the PC12 cell line. When these cells are treated with the neurotrophin NGF, these cells develop neurites (neuritogenesis) and express different neuronal markers, including β III-tubulin, GAP-43 and neurofilament L, among others. This process begins with the activation of TrkA, which leads to the activation of PLC γ -PKC-Raf and the subsequent activation of the signaling pathway Ras-Raf-MEK-ERK. The sustained activity of ERK is necessary for the achievement of the neuronal-like characteristics of PC12 cells. Finally, TrkA also activates the PI3K-Akt signaling pathway that promotes cell survival [74, 75].

In this regard, neuronal differentiation of PC12 is ROS dependent. For example, hyperoxia and xanthine/xanthine oxidase activation induce the formation of neurites through a sustained activation of ERKs in a process that is mediated by ROS production [76]. In particular, the activation of ERKs is affected by ROS in different points of the signaling cascade. In PC12 cells it has been demonstrated that ROS induce the phosphorylation of TrkA through the inhibition of PTPs (protein tyrosine phosphatases), and also promote the activation of PLC γ and PI3K, as well as the formation of the receptor complexes with the scaffold proteins Shc, Grb2 and Sos, which are indispensable for the activation of the MAPK pathway [77]. Although it is not clear how ROS induce the formation of the complex formed by the TrkA receptor and the scaffold proteins, it has been proposed that H₂O₂ induces the activation of ERKs by Src through the Ras-Raf pathway [78] and by Fyn through the Jak2-Shc-Grb2-Sos-Ras pathway [79]. Furthermore, neurite outgrowth of PC12 induced by NGF is mediated by Fyn [80], while Src is required for neurite outgrowth induced by cAMP, but not by NGF [81]. Thereby these kinases seem to be involved in the neuronal differentiation of PC12 induced by ROS and one of the possible targets of ROS produced by NGF might be Fyn that acts upstream ERKs activation.

It is not conclusive the role played by the different sources of ROS during the differentiation processes; however, it seems that different sources might have different effectors, which could have diverse effects in cells. For example, in PC12 cells, NGF induces a peak of ROS levels after 10 min of treatment. This production of ROS is inhibited by DPI, an inhibitor of NOX, suggesting that NOX is the ROS source induced by NGF at this time [82]. On the other hand, the NGF treatment produces a time dependent reduction of the expression of NOX2 at 48 h, with a concomitant increase in the expression of NOX1. After 72 h, there is a second peak of ROS, which is produced by NOX1, since the elimination of NOX1 abolishes this peak. Under this scenario, the inhibition of ROS production by NOX inhibitors and a mimetic of catalase (Euk-8) after 48 h of NGF treatment, increases the neurite length and the expression of β III-tubulin. However, when catalase is applied together with NGF from the beginning, the differentiation of PC12 cells is reduced [83]. These results suggest that ROS produced by different sources at different stages of PC12 cells differentiation have different effects in the differentiation process. The first peak of ROS,

probably produced by NOX2, is critical to initiate the observed changes, while the second peak of ROS, which is produced by NOX1, negatively regulate neurite outgrowth of differentiated PC12 cells.

The counterpart of ROS produced are the antioxidant systems. In this regard, it has been reported in PC12 cells that NGF induces the expression of the antioxidants glutathione peroxidase and catalase after 3 days of treatment [84]. This regulation of the antioxidant systems allows the cells to contend with the H₂O₂ chronically produced by NGF [85]. However, the role of the antioxidant systems in neuronal differentiation has not been completely determined. When PC12 cells are treated with NGF, there is an induction of the phosphorylation of ERKs from 5 min to 30 min, which is crucial to induce the expression and activity of the mitochondrial MnSOD that is necessary to induce differentiation. MnSOD is required to induce a second peak of the phosphorylation of ERKs at 180 min after NGF treatment. If MnSOD is overexpressed, it is induced the neural specific transcription of NGF1a in the absence of NGF; while MnSOD silencing leads to a reduction in the phosphorylation of ERKs. It is proposed that the mechanism by which MnSOD induces the phosphorylation of ERKs at 180 min is through the conversion of superoxide anion into H₂O₂, which is indispensable to induce the long term phosphorylation of ERKs. When H₂O₂ is reduced by the mimetic of glutathione peroxidase Ebselen, the second peak of ERKs phosphorylation is also inhibited and the neurite outgrowth is completely prevented [86].

It is not completely understood how ROS participate in the activation of ERKs. Gopalakrishna *et al.* [63] employed the xanthine/xanthine oxidase system and CoCl₂ as pro-oxidants to induce cell differentiation. Both oxidants were able to induce neuronal differentiation of PC12 measured as neurite outgrowth, the expression of neurofilament-L, GAP-43 and SCG10. The differentiation induced by oxidants was mediated by PKC, since the non-selective inhibitors of PKC, calphostin C and chelerythrine, reduced neurite outgrowth. Also, CoCl₂ induced the translocation of PKC from the cytosol to the membrane. During the period of activation the capacity of PKC to bind phorbol esters was reduced, suggesting that there is a redox modification of the regulatory domain of PKC. Further exposure to higher concentrations of CoCl₂ induced the inactivation of PKC. The exposure of cells to CoCl₂ oxidized 7 of the 18 sulfhydryls detected in PKC and exposure to higher concentrations of CoCl₂ induced the oxidation of 3 more PKC sulfhydryls. Thus, the increasing oxidation of sulfhydryls residues decreases PKC activity. In this study, the MEK inhibitor PD98059 did not affect the activation of PKC ϵ , but substantially decreased the activation of ERKs, CREB and neurite outgrowth induced by CoCl₂. This suggests that PKC ϵ couples the oxidative signal to the final activation of ERKs, and that there are more possible targets of oxidative modification upstream of MEK. Finally, in a context of NGF treatment, ROS produced during the first minutes activate PKC ϵ [63], indicating that the oxidation of PKC ϵ is an important event in the neuronal differentiation induced by NGF (Figure 2).

In primary cultures of neural precursor cells obtained from cerebral cortex, ROS control neuronal fate. In this model, those cells producing high levels of ROS were differentiated to neurons [87]. The same occurs in primary cultures of neural precursor cells obtained from the subventricular zone, where exogenous administration of H₂O₂ produced more differentiated neurons. Conversely, the inhibition of NOX or PI3K diminished the number of neurons, while the effect of the exogenous administration of H₂O₂ was abolished by the pharmacological inhibition of PI3K. Furthermore, cultures derived from KO NOX2 mice produced significantly lesser neurons than those from wild type animals [66].

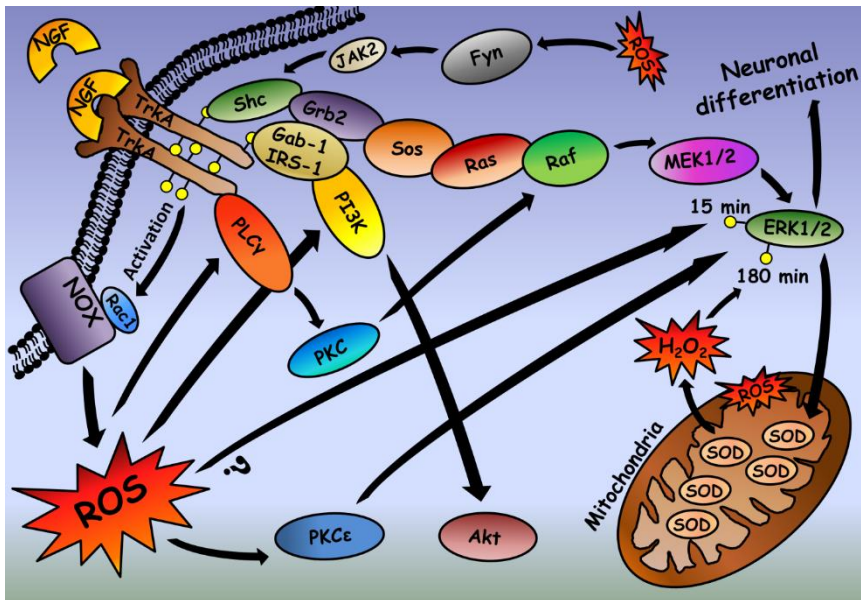


Figure 2. *Redox regulation of PC12 cells differentiation.* When PC12 cells are treated with NGF, there occurs a TrkA transphosphorylation, which induces the recruitment of adapter proteins leading to the activation of the signaling pathway Ras-Raf-MEK1/2-ERK1/2 that promotes differentiation. On the other hand, it is proposed that ROS produced by NOX induce a maximal phosphorylation of ERK at 15 min, which is crucial to induce the expression and activity of the mitochondrial MnSOD required for the conversion of superoxide anion into H₂O₂. The generation of H₂O₂ is necessary to generate a second peak of the phosphorylation of ERKs at 180 min. ROS generated by NOX may also induce the activation of PKC, coupling the oxidative signal to ERK activation. NGF binding to TrkA also leads to the activation of the signaling pathway PLC γ -PKC-Raf and the subsequent activation of ERK. ROS may also activate Fyn, coupling the signaling pathway Shc-Ras-Raf-MEK1/2-ERK1/2. It has also been suggested that PKC and Akt induce the activation of NOX.

Tsatmali et al. also demonstrated that neuronal differentiation of neural precursor cells from cortex are influenced by ROS in multiple aspects. When neural precursor cells are selected according to their ROS production, it was found that high ROS producer cells generated neurons, while low ROS producer cells generated astrocytes, oligodendrocytes and a different type of neurons. These former neurons were classified in two types: the type 1 neurons were predominant in number (around 65%) and had pyramidal morphology, multiples neurites and fired a single action potential, while the type 2 neurons were less in proportion (around 35%), had rounded soma, less neurites and fired repetitive action potentials. When low ROS producer cells are treated with antioxidants, the proportion of the generated neurons are reverted, increasing the number of neurons type 2 (around 80%) [69]. Overall, these results strongly suggest that ROS promotes neuronal differentiation of neural precursor cells in different regions of the brain.

c) Axonal Growth and Guidance

The participation of the ROS in axonal growth is a process that has extensively been studied in the axon growth cones of *Aplysia* neurons. Munnammalai *et al.* [67] found in this

model that axonal growth cones have high concentrations of ROS, which favor the axonal growth, since the decrease of ROS by treatments with antioxidants, inhibitors of NOX or lipoxygenase decreased the axonal growth. ROS modulate different aspects of the dynamics of the actin cytoskeleton. This regulation is determined by both the ROS levels and its source, which could define the compartmentalization of ROS. For example, physiological levels of ROS promote the assembly and protrusion of the actin filaments, while the inhibition of NOX prevents this process. On the other hand, lipoxygenase inhibition influences the assembly of actin in the actin arches, but not in the filopodia [67].

In further studies, Munnammalai et al. [68] determined that NOX2 is localized in the plasma membrane of the axonal growth cones. The activation of NOX2 increased the levels of ROS in the P domain, while the pharmacological inhibition of NOX2 impaired actin dynamics and axonal growth. Interestingly, the localization of active NOX2 was elevated in F-actin bundles in non-stimulated growth cones, which was reduced when F-actin bundles were disrupted with cytochalasin B treatments. Finally, the activity of NOX2 was increased when neurons were grown in beds of apCAM (*Aplysia* cell adhesion molecule), which evoke growth in the apCAM zones [68], indicating that the dynamics of the axonal growth cones are importantly affected by a bidirectional relationship between actin cytoskeleton and NOX2 [68].

As mentioned, the specific localization of ROS in the axonal growth cone might affect different aspects of axonal growth cone dynamics. In this regard, Zhang et al. [88] characterized in *Aplysia* neurons the relationship between ROS production and calcium. In this model, calcium is elevated in the axonal growth cone in response to serotonin, which is dependent on ROS produced by NOX. This relationship involves the regulation of microtubule dynamics and ROS production dependent on Rac1. Under control conditions, nearly 13% of the neurons showed increased levels of calcium, which was increased by 80% when the constitutive active form of Rac1 was injected into the cells. This constitutive active form of Rac1 promoted the movement of microtubules and endoplasmic reticulum Ca^{2+} stores towards the P-domain of the axonal growth cone. On the other hand, the constitutive active form of Rac1 promoted ROS formation in response to serotonin, while the dominant-negative form had the opposite effect. When ROS were inhibited by antioxidants in the presence of the constitutive active form of Rac1, the observed increase of calcium release evoked by serotonin was completely blocked. Conversely, the dominant-negative of Rac1, restored calcium release when low concentration of exogenous H_2O_2 was added. This effect of ROS is dependent on IP_3 receptors, since the blockade of these receptors with xestopongin C did not restore calcium release [88]. This is in line with the idea that ROS oxidizes the IP_3 receptors, which favor calcium release [89]. Furthermore, the regulation of calcium release by ROS in the axonal growth cone might regulate axonal growth cone dynamics, since calcium has pleiotropic effects in the growth cone motility [90].

During nervous system development, neurons tend to establish the proper contact with specific targets through a complex process that is regulated by extracellular cues that guide the axons. A group of proteins that guide the axonal growth cone are the semaphorins, whose mechanisms of action requires the activation of their receptors [91], which couple specific signaling pathways that regulate repulsive axon guidance and cell migration. In dorsal root ganglion neurons, semaphorin3A induces growth cone collapse by the cytoskeleton regulation through the collapsin response mediator protein 2 (CRMP2). The phosphorylation of CRMP2 by GSK3- β and Cdk5 promotes microtubule disassembly, which produces the growth cone

collapse [92]. In these cells, Morinaka et al. [64] found that the phosphorylation of CRMP2 is specifically regulated by ROS. Semaphorine3A induces the generation of H₂O₂ in the axonal growth cone through the participation of the Molecule Interacting with CasL (MICAL), which oxidizes CRMP2 and induces the formation of a transient disulfide-linked homodimer between the cysteines 504 of two CRMP2 proteins. Then, this homodimer is reduced by Trx that forms a disulfide bond with one molecule of CRMP2. This complex is crucial for CRMP2 phosphorylation by GSK3-β, which ultimately produces the growth cone collapse of these neurons [64]. Together, these studies demonstrate the importance of local ROS production in developing neurons, which can affect nervous system development and the proper establishment of neuronal circuits.

d) Apoptosis and Survival

i) *Trx, Grx and the MAPK Pathway*

During the last decade there has been a remarkably advance in the knowledge of the role of ROS as signal molecules involved in programmed cell death. Oxidative stress can alter the cell homeostasis at different level. For example, ROS can induce modifications of the sulfhydryl groups leading to modifications of the functional characteristics of proteins with reactive cysteine residues. This condition might be strengthened if ROS also inhibit the thioredoxin (Trx) and/or glutaredoxin (Grx) system, which are responsible for reversing the inter- or intramolecular disulfide bonds, as well as the S-glutathionylation of proteins, respectively [93].

As all redox proteins, both Trx and Grx can exist in an oxidized or reduced form, which accounts a critical feature for their interaction with other proteins. One of these proteins is ASK1, a member of the MAPKKK, which is expressed in the cytosol and mitochondria [14] and that is involved in the signaling initiated by oxidative stress that leads to apoptosis [94, 95]. Although ASK1 is involved in proliferation and differentiation in several cell types, its role in apoptosis has been the most widely characterized [96-99]. It has been proposed that ASK1 regulates the intrinsic, extrinsic and caspase-independent apoptotic pathways, which can be induced by conditions such as stimulation of death receptors, DNA damage, oxidative stress and stress of the endoplasmic reticulum [99]. ASK1 is also the target of many proteins related to survival, which bind to different domains of ASK1. Trx and Grx are part of this group of proteins. Trx binds to the N-terminal domain, while the Grx binds to the C-terminal domain of ASK1, inhibiting the activity of ASK1 [15, 24, 51].

Trx1 was the first identified negative regulator of the activity of ASK1 [15]. It has been described that under basal conditions, ASK1 forms homo-oligomers through their coiled-coil domains in the carboxyl terminal (CCC). Also, both Trx1 and 14-3-3 proteins, bind to ASK1 forming what is called the signalosome that negatively regulates ASK1 activity [52]. The 14-3-3 proteins bind to ASK1 in the phosphorylated Ser967 [94]. In response to ROS generation, Trx1 is oxidized and Cys35 and Cys32 form an intramolecular disulfide bridge with the consequent conformational change of Trx1 leading to its dissociation from ASK1 and the release of 14-3-3 proteins. Subsequently, TRAF2 and/or TRAF6, which act as positive regulators, are recruited to ASK1, which promotes the interaction between ASK1 molecules through their domains coiled-coil in the amino terminal (NCC) and allows the autophosphorylation of T845 in ASK1 and completing the ASK1 activation triggered by the

oxidative stimulus [52]. Under oxidative stress ASK1 is ubiquitinated and may be degraded; however, the peptidase USP9X promotes the deubiquitination of active ASK1 to counteract its proteasome-dependent degradation. In this way, USP9X stabilizes the activity of ASK1 [100]. Once active, ASK1 activates JNK and p38, which triggers the apoptotic cell death.

Alternatively, Nadeau *et al.* [59, 60] proposed another mechanism for Trx1 in the regulation of ASK1 in response to H₂O₂. They showed that H₂O₂ induces ASK1 oxidation leading to the formation of multimers of ASK1 linked by disulfide bonds. They also identified the Cys250 in ASK1 as the critical residue for JNK activation in response to H₂O₂-induced oxidative stress. When they mutated the Cys250 of ASK1, the binding of ASK1 to Trx1 was blocked; however, although the ASK1 multimers linked by disulfide bridges are still formed, no longer phosphorylation in T845 (related to activation) and downstream activation of the MAPKs pathway is observed.

These results suggest that the dissociation of ASK1 from Trx1 is not enough to promote ASK1 signaling, but it is required the oxidation of the Cys250 of ASK1 to induce a conformational change that allows the activation of the protein [59, 60]. It is necessary more experimental evidences to understand the role that plays the Cys250 in the activation of ASK1 in response to H₂O₂.

In cerebellar granule neurons it has been shown that staurosporine (Sts) and potassium deprivation (K5) cause apoptotic death [101, 102]. In addition, both K5 and Sts induce the generation of ROS, which is transient and occurs during the 4 h after treatment [101, 103]. In this regard, it was found that K5 activated both ASK1-JNK-cJun and ASK1-p38-ATF2 pathways, where ROS acted upstream ASK1 [101, 102]. On the other hand, Sts induced apoptotic death only through the ASK1-p38-ATF2 pathway, indicating that ROS generated by Sts seems to act at a different level [102].

On the other hand, it has been observed that the overexpression of Grx protects cells from metabolic oxidative stress induced by glucose deprivation by a mechanism that suppresses the redox activation of ASK1 and its targets downstream, including the JNK pathway [24, 55]. These results support the hypothesis that the Grx-ASK1 interaction sensitive to the redox state is regulated by the Grx through the regulation of the intracellular glutathione-dependent redox reactions that involve the participation of H₂O₂ [24]. The oxidative stress induced by glucose deprivation can activate ASK1 through two different pathways: the glutathione-dependent Grx-ASK1 and the Trx-ASK1 independent of glutathione. It is proposed that the release of either Grx or Trx is sufficient for activating ASK1 [55].

It has been observed that the knockdown of ASK1 protects the neuronal cells SHSY5Y from L-DOPA-induced apoptosis [104, 105]. These results support the idea that the possible regulation of Grx of apoptosis induced by oxidants in neurons is mediated via ASK1. However, there are many potential effectors for ASK1 activation and many of them are also sensitive to oxidation and potential targets of Grx; therefore, additional studies are needed to outline the specific role of Grx under this condition [106].

The reversible inactivation of PTEN has also been described in studies using H₂O₂ or ROS produced by NOX in macrophages [61, 62]. As already mentioned, Trx1, in its reduced state, directly binds to PTEN in a redox-dependent way to inhibit its phosphatase activity on PIP₃, resulting in an increase in the activity of Akt [26]. Akt binds to PIP₃ through their PH domains (domains of homology to pleckstrine), which allows that PDK1 phosphorylates Akt T803 (PDK2 phosphorylates the Ser473), leading to full Akt activation. In this regard, it is proposed that under basal conditions PTEN is active, carrying out the dephosphorylation of

PIP₃, and therefore decreasing the Akt activity. Under oxidative stress, Trx1 binds PTEN avoiding PIP₃ dephosphorylation and inducing a constitutive activation of Akt, which triggers the antiapoptotic signals.

As mentioned previously, under oxidative stress, Trx1 oxidizes and releases from ASK1. Therefore it is possible that Trx1, once reduced by the Thioredoxin reductase 1 (TrxR1), binds PTEN generating survival signals to counteract the apoptotic signals triggered by ASK1. The inhibition of ROS-dependent phosphatase activity of PTEN also suggests that ROS produced under pathological conditions could contribute to the apoptosis inhibition and subsequent formation of tumors in the nervous system.

ii) Redox Regulation of Akt

As mentioned above, it is known that Akt is sensitive to the redox state and that the oxidative modification of the Akt reactive cysteines are critical for its activity [29, 31, 57, 58]. Also, H₂O₂ induces the formation of disulfide bridges between Cys297 and Cys311 in Akt, as well as the subsequent dephosphorylation mediated by PP2A. Overexpression of Grx reduces Akt, which abolishes its binding to PP2A, then allowing a sustained Akt phosphorylation, inducing an inhibition of apoptosis in cardiac cells [29], indicating an antiapoptotic action of Grx through a redox regulation of Akt. Interestingly, it has been found that inactive Akt is fully oxidized, while the active form is only partially oxidized. In this regard, it was recently reported that ROS produced by NOX1 oxidize the Akt reactive cysteines promoting its interaction with PP2A, which inhibits Akt and therefore induces apoptosis in cardiomyocytes [57].

In the nervous system, it has been found that mice treated with MPTP, a neurotoxin which selectively damage dopaminergic neurons from the ventral midbrain, the critical cysteines of Akt are oxidized, increasing its association with PP2A, and therefore lowering the levels of Akt selectively phosphorylated. The presence of antioxidants fully reversed these effects [58]. Grx1 overexpression in primary neurons derived from human stem cells maintains the reduced state of Akt and inhibits the MPTP-mediated loss of phosphorylation [58], indicating that the preservation of the redox homeostasis by the overexpression of Grx1 can preserve the levels of phosphorylated Akt.

On the other hand, the inhibition of Akt induces an activation of p38 and JNK that promotes apoptosis, whereas active Akt directly phosphorylates ASK1 Ser83, which leads to apoptosis inhibition [107]. Min and collaborators [108] proposed that the regulation of Akt on ASK1 for the control of apoptosis occurs through the interaction between Hsp90, Akt and ASK1 to keep ASK1 in an inactive state. They suggest that this interaction allows Akt to be in the proximity of the N-terminal domain of ASK1 to phosphorylate it in the Ser83. In response to an apoptotic condition, such as H₂O₂, the Hsp90-Akt-ASK1 complex becomes more stable, since Akt moves to the ASK1 C-terminal domain, which causes a decrease in the phosphorylation of the Ser83 and the subsequent activation of ASK1 that activates p38 pathways and/or JNK leading to apoptosis.

In this model, Hsp90 would serve as a protein scaffold to keep Akt and ASK1 in proximity. Unlike Trx and Grx, Hsp90-Akt complex does not dissociate from ASK1 in response to oxidative stress, but it undergoes a conformational change that generates a more stable complex [108]. Thus, the regulation of apoptotic death through the ROS-mediated ASK1 activation is complex and represents an active research field (Figure 3).

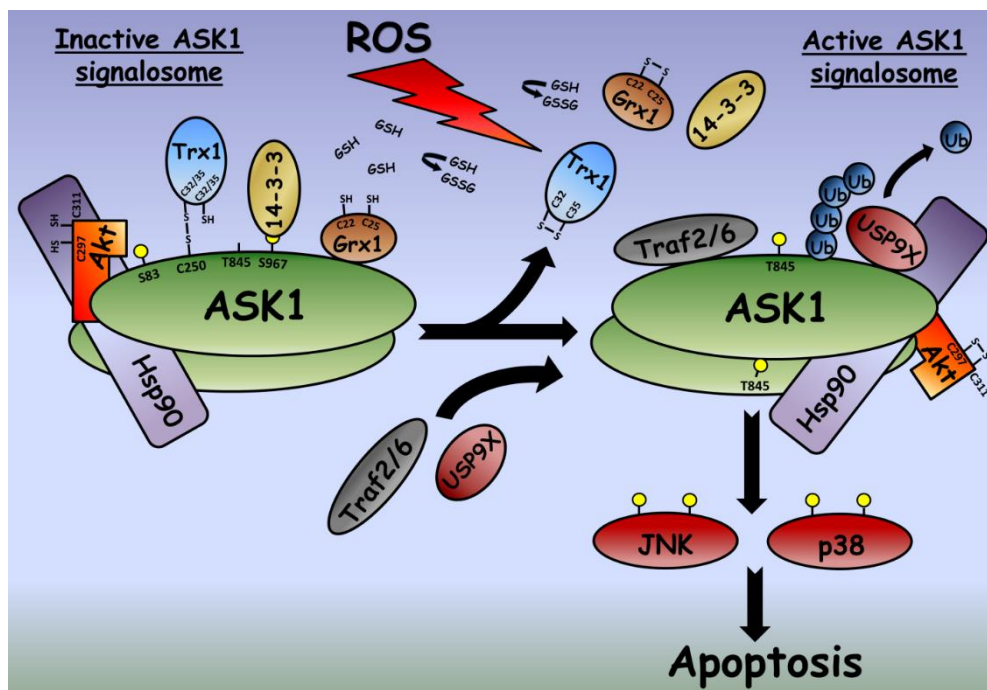


Figure 3. Participation of the reactive oxygen species in the activation of ASK1 through its different redox sensitive controllers. During the inactive condition, ASK1 forms homo-oligomers through their CCC domains. Each monomer binds Trx1, Grx1, 14-3-3 proteins, Akt, and Hsp90, which negatively regulate the activation of ASK1, forming the so called signalosome. HSP90 acts as a scaffold protein that maintains ASK1 bound to Akt, allowing the Ser83 ASK1 phosphorylation by Akt. Trx1 forms an intermolecular disulfide bridge with the Cys250 of ASK1, while Grx1 is attached to the c-terminus of ASK1 and 14-3-3 protein binds to the phosphorylated Ser967 of ASK1. In response to ROS generation, Trx1, Grx1 and 14-3-3 protein dissociate from ASK1 and Hsp90 and Akt undergoes a conformational rearrangement with respect to ASK1, which physically prevents that Akt negatively phosphorylates ASK1. Akt is inactivated when it forms an intramolecular disulfide bridge between the Cys297 and Cys311. Meanwhile, TRAF2 and/or TRAF6 join ASK1, which results in the homophilic interaction between the two ASK1 proteins through their NCC, allowing the autophosphorylation of T845 in ASK1. USP9X joins the signalosome and stabilizes active ASK1 by avoiding its proteasomal degradation by deubiquitination. Once ASK1 is totally active, it phosphorylates MAPKK, which in turn phosphorylates JNK and p38 MAPK, inducing apoptosis. See text for more details.

iii) TXNIP and TRX

Although most of the studies have focused on the interaction between Trx1 and cytosolic ASK1, it is also known that the mitochondrial isoform of thioredoxin (Trx2) also interacts with the mitochondrial ASK1 and inhibits its activity preventing the apoptosis induced by ASK1 in endothelial cells and hepatocytes [14, 53]. Trx2 has a critical role in the control of mitochondrial oxidative stress and mitochondria-dependent apoptosis [54]. Thus, Trx2 helps to repair the oxidative damage of proteins by reducing the disulfide bonds formed by the cysteines oxidation.

Unlike Trx1, Trx2 specifically regulates the JNK-independent apoptotic intrinsic pathway in vascular endothelial cells, suggesting that Trx1 and Trx2 control different apoptotic pathways [14].

On the other hand, TXNIP also known as VDUP1 (vitamin D3 up-regulated protein-1) or TBP2 (thioredoxin-binding protein-2), is a redox protein ubiquitously expressed that promotes apoptosis [56]. In mouse pancreatic beta cells, it has been described that under basal conditions, TXNIP is predominantly located in the nucleus. In response to oxidative stress, TXNIP translocates from the nucleus to the mitochondria, where it forms a complex with Trx2, removing Trx2 from ASK1. The Trx2-mediated inhibition of ASK1 elimination leads to cytochrome c release, caspase-3 activation and apoptosis [56]. The TXNIP translocation to the mitochondria induced by oxidative stress fits well with the role that TXNIP has as regulator of the redox state and the mitochondrial death pathway.

It is believed that under physiological levels of ROS, the TXNIP-Trx1 complex formation is favored. In endothelial cells, this complex translocates from the nucleus to the plasmatic membrane, activating the inflammatory processes and promoting cell survival. In this context, TXNIP acts as a scaffold protein for the transport of Trx1 to the membrane. This translocation is required, for example, to carry out the trans-activation of the VEGF type 2 receptor (VEGFR-2) mediated by H₂O₂ and the subsequent activation of ERK1/2. Here, the TXNIP-Trx1 complex acts as a redox sensitive mediator for the control of VEGFR-2 signaling, which promotes cell survival under physiological ROS levels [109]. Thus, TXNIP can function as an intermediary in the signaling depending on the cell compartment and can be proapoptotic under high concentrations of ROS or a survival protein in cells with physiological levels of ROS (Figure 4). Recently, it has been proposed the concept of "Redoxisome" to refer to the complex Trx-TXNIP as a signaling transducer relative to the redox state under normal and pathological conditions [110].

In the nervous system, the role played by these molecules and their interaction with ROS in the apoptotic death has not been explored in detail. It has been reported that the activation of ASK1 is involved in neuronal apoptosis, as occurs in NGF-deprived sympathetic neurons [111]. In addition, Trx attenuates neuronal damage [112], regulates the MAPK cascade through the suppression of ASK1 activation and increases the transcription factors activation [15]. In cerebellar granule neurons, it has been described that the TXNIP gene corresponds to the early response genes whose expression is directly regulated by the flow of calcium during neuronal apoptosis [32]. Therefore, it is possible that TXNIP regulates the MAPKs pathway forming a complex net of signal transduction in neuronal apoptosis. It is likely that these mechanisms have variations due to the fact that in other cell types TXNIP has been described as a cytosolic protein [23, 113, 114].

It is known that the overstimulation of NMDA receptors (NMDAR) leads to the generation of free radicals in neurons that causes an oxidative damage associated with neuronal death and several neurodegenerative diseases [115]. On the other hand, it has been reported that physiological synaptic activity increases the expression of antioxidant defenses (thioredoxin, peroxiredoxin and sulfiredoxin) in neurons. It was found that the blockade of the NMDAR under basal conditions promoted an increased vulnerability to oxidative insults [116].

The stimulation of the NMDAR activates the PI3K/Akt pathway leading to the phosphorylation of the transcription factor FOXO in the nucleus, causing its dissociation from the TXNIP promoter and inducing the release of FOXO from the nucleus, reducing TXNIP levels. Thus, a low TXNIP transcription results in less inhibition of Trx, and therefore promotes a neuroprotective action against oxidative damage under physiological conditions [116].

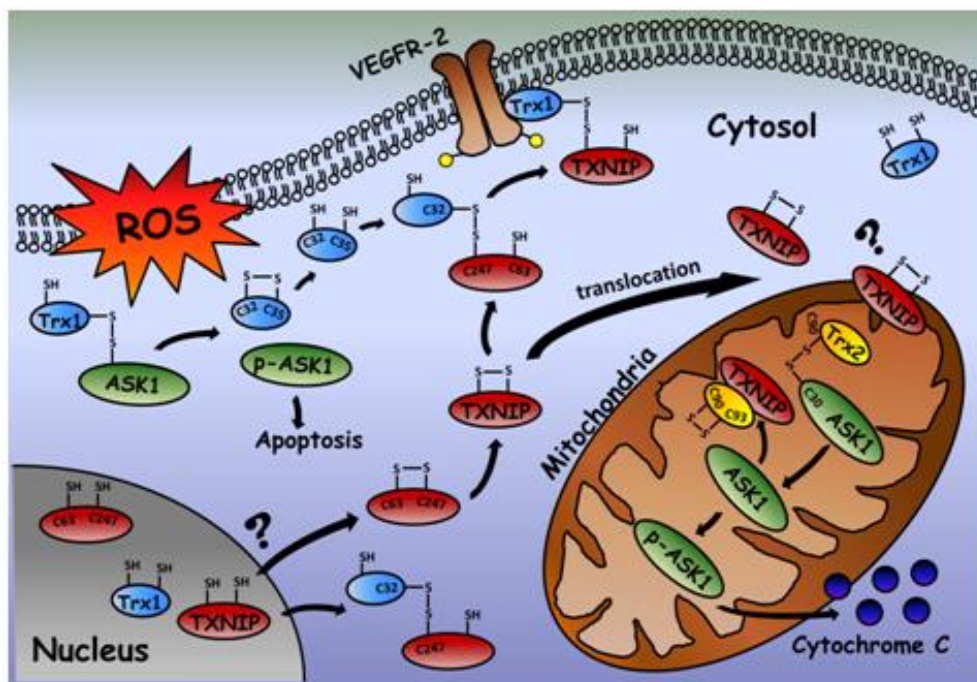


Figure 4. Participation of TXNIP in the cascade of signal transduction that promotes survival and cell death. Under basal conditions, TXNIP is located in the nucleus, while Trx1 is found both in the cytosol and the nucleus and Trx2 is located only in the mitochondria. The inactive form of ASK1 is located both in the cytosol (interacting with reduced Trx1), and in the mitochondria (bound to reduced Trx2). In response to oxidative stress, TXNIP translocates from the nucleus to the mitochondria, where it binds Trx2, which relieves the inhibition of ASK1 by Trx2 that is now in its oxidized form. This allows ASK1 activation in the mitochondria inducing signals that lead to apoptotic death. Meanwhile, Trx1 is oxidized and released from ASK1, which activates and induces apoptotic death. The antioxidant mechanisms activated by ROS can reduce the levels of oxidized Trx1. On the other hand, under physiological levels of ROS, the formation of the TXNIP-Trx1 complex is induced in the nucleus and in the cytosol. In the case of the VEGF receptor (VEGFR-2), this complex translocates to the membrane, where it carries out the trans-activation of the receptor, which activates ERK1/2 that promotes cell survival. See text for more details.

iv) ROS, Mitochondria and Apoptosis

The mitochondrion is one of the main sources of ROS in the cell. It has been suggested that the mitochondrial ROS are involved in several pathologies, including neurodegenerative diseases [117]. Interestingly, new mechanisms have been proposed to explain how changes in the redox state of a mitochondrial protein may lead to cell death/survival through a mechanism associated with changes in the mitochondrial morphology. It is known that dynamics of mitochondrial fusion and fragmentation regulates many mitochondrial functions necessary for cell physiology. Although the machinery that catalyzes these processes has been described, little is known about the signaling components that regulate these phenomena [118]. In this regard, in the nervous system, it is known that the inhibition of mitochondrial fission in cortical neurons blocks the ROS production and cell damage produced by inhibitors of the electron transport chain [119]. Also, the ROS overproduction observed in a condition of hyperglycemia requires an increase in mitochondrial fission [120].

Recently, it has been described that Romo1 (reactive oxygen species modulator 1) represents a fundamental element in the generation of mitochondrial ROS. Romo1 is a 79 amino acids transmembrane protein, which is located in the mitochondria and that induces the production of mitochondrial ROS through the complex III of the electron transport chain [121-123]. In this regard, Sreaton and cols. [118] reported that Romo1 is sensitive to the redox state and that this molecule represents a molecular switch (or redox switch) that links ROS and the mitochondrial morphology by modulating the mitochondrial fusion and the remodeling of the mitochondrial crests. This group found that the loss of Romo1 induces the deoligomerization of OPA1 (optic atrophy 1), which is required for mitochondrial fusion. Under this condition occurs a mitochondrial crests remodeling, which increases the probability of cytochrome c release and apoptosis [124]. In spite of the evidences of Romo1 as a protein involved in the morphological modeling of mitochondria and sensitive to the redox state, there is not enough information about the direct regulation of ROS on the components of the machinery responsible for the mitochondrial fission and fusion, therefore further research on this field is required.

In addition to its role in mitochondrial fusion, it has also been suggested that Romo1 may serve as a molecular link between TNF- α and the mitochondrial ROS during TNF- α -mediated apoptosis. In this regard, the complex II of TNF- α binds to the C-terminus of Romo1, which recruits Bcl-X_L and reduces the mitochondrial membrane potential, resulting in ROS production and apoptotic cell death [125]. Since Romo1 seems to participate in the modulation of the intrinsic pathway of apoptosis, its inhibition might have therapeutic applications by promoting the apoptotic death of cancer cells and by disrupting the ROS production involved in the signaling pathways responsible for cell proliferation.

ROS AND BRAIN FUNCTION

ROS play an important role in the regulation of normal brain function. For example, ROS is a regulator of dopamine release in the striatum and in the long term potentiation (LTP) and plasticity in the hippocampus. However, the underlying mechanisms by which ROS regulate these functions are not fully understood.

a) ROS as Neuromodulator

The group of Rice has significantly contributed to the understanding of the ROS function as neuromodulators of dopamine release in nigrostriatal pathway [126-130]. This system regulates motor movement [131-134], receives synaptic inputs from the cerebral cortex, thalamus and substantia nigra [135] and the degeneration of neurons from the substantia nigra has been related to Parkinson's disease [136, 137]. Avshalumov et al. [126] demonstrated in coronal striatal slices that endogenous glutamate release produces H₂O₂ under physiological conditions and that the blockade of glutamate receptors produced an increase in the release of dopamine by these neurons. The effect of glutamate on dopamine release seems to be indirect [126, 127], probably mediated by H₂O₂. This is supported by the fact that dopamine release was prevented in the presence of catalase or glutathione peroxidase. On the other hand, the

effect of GABA-dependent modulation of dopamine release is also mediated by H_2O_2 since catalase completely prevented the effect of picrotoxin (a blocker of $GABA_A$ receptors). On the other hand, when endogenous glutathione peroxidase was inhibited by mercaptosuccinate, the increased H_2O_2 markedly inhibits dopamine release, an effect that was blocked by catalase [126].

The modulation of H_2O_2 on dopamine release occurs in a physiological time scale. In experiments where a single pulse of electrical stimulation elicited dopamine release, glutathione peroxidase inhibition did not have any effect on dopamine release; however, if subsequent pulses are applied, it can be appreciated a decrease in dopamine release by decreasing glutathione peroxidase with mercaptosuccinate within the first three to five electrical pulses train. Thus, H_2O_2 produced during the first pulse seems to be responsible for dopamine release inhibition elicited by the subsequent pulses. The effect of glutamate and GABA occurs in the same neurons that produce H_2O_2 since the activation of $GABA_A$ receptors has no effect when glutamate receptors are blocked, which indicates that GABA has no effect on dopamine release. Since the antioxidant enzymes catalase and glutathione peroxidase are not expected to enter the cells, their effect most be in the extracellular space. Thus the release of H_2O_2 produced by neurons in the striatum diffuse from the postsynaptic sites to inhibit the presynaptic dopamine release [126].

The activity-dependent production of H_2O_2 also occurs in neurons from substantia nigra pars compacta (SNpc). An increase in the firing rate of these neurons by depolarizing current injection induces elevated H_2O_2 levels. The presence of catalase produced an increase in the firing rate. In contrast, high concentrations of mercaptosuccinate (1 mM) produced a marked hyperpolarization and cease of firing in one population of dopamine neurons. These results can be mimicked by adding exogenous H_2O_2 (1.5 mM) which also inhibits dopamine release [128]. Thus, two groups of SNpc neurons can be distinguished by their capacity to respond to H_2O_2 [129]. Avshalumov and collaborators [129, 130] also determined that the target upon which H_2O_2 acts to modulate dopamine release are the ATP-sensitive K^+ channels (K_{ATP}). These channels are activated by a decrease in the ATP/ADP ratio and are composed by inwardly rectifying pore-forming subunits ($K_{ir6.2}$ in neurons) and sulfonylurea receptor subunits (SUR1/SUR2) [138-140].

Mitochondria seem to be the source of H_2O_2 that regulates the dopamine release in the dorsal striatum. Bao et al. [141] demonstrated that inhibiting mitochondrial ROS by using succinate and rotenone inhibits glutamate-dependent regulation of dopamine release. The already mentioned increased of dopamine release induced by the blockade of glutamate receptors was completely prevented in the presence of succinate and rotenone. On the other hand, an increase the levels of H_2O_2 by mercaptosuccinate produced the typical 35% decrease in the evoked dopamine release, which was completely prevented by succinate and rotenone. Together, these results indicate that mitochondria are a primary source of ROS in the glutamate-dependent modulation of dopamine release [141].

b) ROS as Regulators of Synaptic Plasticity

ROS have also been identified as regulators of synaptic plasticity. Neurons have the ability to change their activity in response to experience through a modification in the efficiency of the synapses. Long-term potentiation (LTP) and long-term depression (LTD) are

two elements of synaptic plasticity in hippocampus that have been proposed as the cellular processes that are essential for the memory and learning. LTP is a long-lasting strengthening in the efficacy of synaptic transmission, while LTD is an activity-dependent reduction in synaptic efficiency [142, 143]

The molecular mechanisms of the LTP have been widely described in the CA1 region of hippocampus. In this region, the dendrites of pyramidal neurons receive synaptic inputs from the Shaffer collaterals of the CA3 region. Different studies have addressed the effects of ROS in LTP, which are diverse and seem to be related to the concentration of H₂O₂ and/or superoxide anion. In this regard, Kamsler et al. [43] demonstrated that H₂O₂ (20 μM) prevented the establishment of new LTP and enhanced LTD, while H₂O₂ (1 μM) markedly increased LTP and suppressed LTD [43]. On the other hand, brief incubations of hippocampal slices with H₂O₂ promoted LTP [144], while long time incubations prevented LTP [145]. In addition, the administration of antioxidants such as catalase or cell-permeable scavengers of superoxide or H₂O₂ impaired LTP [146, 147]. These experiments demonstrate that ROS are strong regulators of LTP.

Based on different models of transgenic mice, it has been possible to comprehend more about the role of ROS in synaptic plasticity. KO NOX2 mice have deficient LTP and suffer hippocampus-dependent memory impairments, as well as a slight motor coordination impairment and motor memory alterations [148]. On the other hand, in a mouse model that overexpresses extracellular superoxide dismutase (EC-SOD), hippocampal slices fail to show LTP and the contextual fear conditioning is markedly impaired as compared to wild type mice [149]. These evidences demonstrate that the regulation of ROS during LTP is related to the consolidation of hippocampus-dependent memories. Interestingly, these findings are reverted during aging, since hippocampal slices obtained from aged EC-SOD mice exhibit an enhanced LTP in comparison with wild type mice. Furthermore, aged EC-SOD mice exhibit better hippocampus-dependent spatial learning and better cerebellum-dependent learning than in aged wild type mice, which correlates with lower levels of ROS in hippocampus and cerebellum in aged EC-SOD mice [150]. These results emphasize the changes in ROS production during the lifespan and their implications in learning and memory.

CONCLUSION

Reactive oxygen species play a critical role in cellular physiology. An increasing body of evidence supports a role of ROS as signaling agents. The regulation of physiological and pathologic processes by ROS is mediated by specific proteins mainly involved in intracellular signaling. The mechanisms by which ROS modulate these processes involve the direct oxidation of cysteine residues of several proteins involved in redox signaling. This generates disulfide bonds between cysteine residues in the same protein or between two proteins. It is noteworthy to mention that ROS actions depend on the cellular context, as well as the specific time and particular location of ROS produced. This represents a very fine mechanism of regulation that also involves the antioxidant systems, the ROS sources and the target proteins. Direct oxidative modification of cysteines leads to the activation of specific signaling pathways that modify different physiological processes such as proliferation, neuronal differentiation, axonal growth and guidance and apoptosis. This can occur in a time scale that

goes from minutes to hours, but also in the order of seconds, as it occurs in the oxidation of receptors and channels. The importance of these studies underlie in our comprehension of nervous system function, as well as the redox biology. There are still many gaps in our knowledge about the mechanisms of action involving ROS as signaling molecules. Thus, many studies should be addressed to solve these subjects.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was partially supported by a grant from DGAPA-PAPIIT, UNAM, México (IN206213) and from CONACYT, México (179234).

REFERENCES

- [1] Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*, 2002;82(1):47-95.
- [2] Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T., Mazur M., Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry and cell biology*, 2007;39(1):44-84.
- [3] Tonks N. K. Redox redux: revisiting PTPs and the control of cell signaling. *Cell*, 2005;121(5):667-70.
- [4] Pourova J., Kottova M., Voprsalova M., Pour M. Reactive oxygen and nitrogen species in normal physiological processes. *Acta physiologica*, 2010;198(1):15-35.
- [5] Kamata H., Hirata H. Redox regulation of cellular signalling. *Cellular signalling*, 1999;11(1):1-14.
- [6] Day A. M., Brown J. D., Taylor S. R., Rand J. D., Morgan B. A., Veal E. A. Inactivation of a peroxiredoxin by hydrogen peroxide is critical for thioredoxin-mediated repair of oxidized proteins and cell survival. *Molecular cell*, 2012;45(3):398-408.
- [7] Jonsson T. J., Lowther W. T. The peroxiredoxin repair proteins. *Sub-cellular biochemistry*, 2007;44:115-41.
- [8] Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species. *The Journal of cell biology*, 2011;194(1):7-15.
- [9] Lo Conte M., Carroll K. S. The redox biochemistry of protein sulfenylation and sulfinylation. *The Journal of biological chemistry*, 2013;288(37):26480-8.
- [10] Rinna A., Torres M., Forman H. J. Stimulation of the alveolar macrophage respiratory burst by ADP causes selective glutathionylation of protein tyrosine phosphatase 1B. *Free radical biology and medicine*, 2006;41(1):86-91.
- [11] Forman H. J., Fukuto J. M., Torres M. Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers. *American journal of physiology Cell physiology*, 2004;287(2):C246-56.
- [12] Forman H. J., Ursini F., Maiorino M. An overview of mechanisms of redox signaling. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2014.

- [13] Cross J. V., Templeton D. J. Regulation of signal transduction through protein cysteine oxidation. *Antioxidants and redox signaling*, 2006;8(9-10):1819-27.
- [14] Zhang R., Al-Lamki R., Bai L., Streb J. W., Miano J. M., Bradley J., et al. Thioredoxin-2 inhibits mitochondria-located ASK1-mediated apoptosis in a JNK-independent manner. *Circulation research*, 2004;94(11):1483-91.
- [15] 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. *The EMBO journal*, 1998;17(9):2596-606.
- [16] Holmgren A. Thioredoxin structure and mechanism: conformational changes on oxidation of the active-site sulfhydryls to a disulfide. *Structure*, 1995;3(3):239-43.
- [17] Roos G., Garcia-Pino A., Van Belle K., Brosens E., Wahni K., Vandenbussche G., et al. The conserved active site proline determines the reducing power of *Staphylococcus aureus* thioredoxin. *Journal of molecular biology*, 2007;368(3):800-11.
- [18] Chrestensen C. A., Eckman C. B., Starke D. W., Mieyal J. J. Cloning, expression and characterization of human thioltransferase (glutaredoxin) in *E. coli*. *FEBS letters*, 1995;374(1):25-8.
- [19] Yang Y., Jao S., Nanduri S., Starke D. W., Mieyal J. J., Qin J. Reactivity of the human thioltransferase (glutaredoxin) C7S, C25S, C78S, C82S mutant and NMR solution structure of its glutathionyl mixed disulfide intermediate reflect catalytic specificity. *Biochemistry*, 1998;37(49):17145-56.
- [20] Chai Y. C., Ashraf S. S., Rokutan K., Johnston R. B., Jr., Thomas J. A. S-thiolation of individual human neutrophil proteins including actin by stimulation of the respiratory burst: evidence against a role for glutathione disulfide. *Archives of biochemistry and biophysics*, 1994;310(1):273-81.
- [21] Ciriolo M. R., Palamara A. T., Incerpi S., Lafavia E., Bue M. C., De Vito P., et al. Loss of GSH, oxidative stress, and decrease of intracellular pH as sequential steps in viral infection. *The Journal of biological chemistry*, 1997;272(5):2700-8.
- [22] Liu Y., Min W. Thioredoxin promotes ASK1 ubiquitination and degradation to inhibit ASK1-mediated apoptosis in a redox activity-independent manner. *Circulation research*, 2002;90(12):1259-66.
- [23] Junn E., Han S. H., Im J. Y., Yang Y., Cho E. W., Um H. D., et al. Vitamin D3 up-regulated protein 1 mediates oxidative stress via suppressing the thioredoxin function. *Journal of immunology*, 2000;164(12):6287-95.
- [24] Song J. J., Rhee J. G., Suntharalingam M., Walsh S. A., Spitz D. R., Lee Y. J. Role of glutaredoxin in metabolic oxidative stress. Glutaredoxin as a sensor of oxidative stress mediated by H₂O₂. *The Journal of biological chemistry*, 2002;277(48):46566-75.
- [25] Lee S. R., Yang K. S., Kwon J., Lee C., Jeong W., Rhee S. G. Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H₂O₂. *The Journal of biological chemistry*, 2002;277(23):20336-42.
- [26] Meuillet E. J., Mahadevan D., Berggren M., Coon A., Powis G. Thioredoxin-1 binds to the C2 domain of PTEN inhibiting PTEN's lipid phosphatase activity and membrane binding: a mechanism for the functional loss of PTEN's tumor suppressor activity. *Archives of biochemistry and biophysics*, 2004;429(2):123-33.
- [27] Patwari P., Higgins L. J., Chutkow W. A., Yoshioka J., Lee R. T. The interaction of thioredoxin with Txnip. Evidence for formation of a mixed disulfide by disulfide exchange. *The Journal of biological chemistry*, 2006;281(31):21884-91.

- [28] Hwang J., Suh H. W., Jeon Y. H., Hwang E., Nguyen L. T., Yeom J., et al. The structural basis for the negative regulation of thioredoxin by thioredoxin-interacting protein. *Nature communications*, 2014;5:2958.
- [29] Murata H., Ihara Y., Nakamura H., Yodoi J., Sumikawa K., Kondo T. Glutaredoxin exerts an antiapoptotic effect by regulating the redox state of Akt. *The Journal of biological chemistry*, 2003;278(50):50226-33.
- [30] Sundaresan M., Yu Z. X., Ferrans V. J., Irani K., Finkel T. Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science*, 1995;270(5234):296-9.
- [31] Wani R., Qian J., Yin L., Bechtold E., King S. B., Poole L. B., et al. Isoform-specific regulation of Akt by PDGF-induced reactive oxygen species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011;108(26):10550-5.
- [32] Bernardini S., Bernassola F., Cortese C., Ballerini S., Melino G., Motti C., et al. Modulation of GST P1-1 activity by polymerization during apoptosis. *Journal of cellular biochemistry*, 2000;77(4):645-53.
- [33] Adler V., Yin Z., Fuchs S. Y., Benezra M., Rosario L., Tew K. D., et al. Regulation of JNK signaling by GSTp. *The EMBO journal*, 1999;18(5):1321-34.
- [34] Templeton D. J., Aye M. S., Rady J., Xu F., Cross J. V. Purification of reversibly oxidized proteins (PROP) reveals a redox switch controlling p38 MAP kinase activity. *PloS one*, 2010;5(11):e15012.
- [35] Galli S., Antico Arciuch V. G., Poderoso C., Converso D. P., Zhou Q., Bal de Kier Joffe E., et al. Tumor cell phenotype is sustained by selective MAPK oxidation in mitochondria. *PloS one*, 2008;3(6):e2379.
- [36] Trachootham D., Lu W., Ogasawara M. A., Nilsa R. D., Huang P. Redox regulation of cell survival. *Antioxidants and redox signaling*, 2008;10(8):1343-74.
- [37] Groeger G., Quiney C., Cotter T. G. Hydrogen peroxide as a cell-survival signaling molecule. *Antioxidants and redox signaling*, 2009;11(11):2655-71.
- [38] Liu Y., Li M., Warburton R. R., Hill N. S., Fanburg B. L. The 5-HT transporter transactivates the PDGFbeta receptor in pulmonary artery smooth muscle cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2007;21(11):2725-34.
- [39] Moody T. W., Osefo N., Nuche-Berenguer B., Ridnour L., Wink D., Jensen R. T. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide causes tyrosine phosphorylation of the epidermal growth factor receptor in lung cancer cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 2012;341(3):873-81.
- [40] Huang Y. Z., McNamara J. O. Neuroprotective effects of reactive oxygen species mediated by BDNF-independent activation of TrkB. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 2012;32(44):15521-32.
- [41] Huang E. J., Reichardt L. F. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annual review of neuroscience*, 2001;24:677-736.
- [42] Kruk J. S., Vasefi M. S., Heikkila J. J., Beazely M. A. Reactive oxygen species are required for 5-HT-induced transactivation of neuronal platelet-derived growth factor and TrkB receptors, but not for ERK1/2 activation. *PloS one*, 2013;8(9):e77027.
- [43] Kamsler A., Segal M. Hydrogen peroxide modulation of synaptic plasticity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 2003;23(1):269-76.

- [44] Lee J. W., Kim J. E., Park E. J., Kim J. H., Lee C. H., Lee S. R., et al. Two conserved cysteine residues are critical for the enzymic function of the human platelet-derived growth factor receptor-beta: evidence for different roles of Cys-822 and Cys-940 in the kinase activity. *The Biochemical journal*, 2004;382(Pt 2):631-9.
- [45] Goldkorn T., Balaban N., Matsukuma K., Chea V., Gould R., Last J., et al. EGF-Receptor phosphorylation and signaling are targeted by H₂O₂ redox stress. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 1998;19(5):786-98.
- [46] Bae Y. S., Kang S. W., Seo M. S., Baines I. C., Tekle E., Chock P. B., et al. Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *The Journal of biological chemistry*, 1997; 272(1): 217-21.
- [47] Paulsen C. E., Truong T. H., Garcia F. J., Homann A., Gupta V., Leonard S. E., et al. Peroxide-dependent sulfenylation of the EGFR catalytic site enhances kinase activity. *Nature chemical biology*, 2012;8(1):57-64.
- [48] Kang D. H., Lee D. J., Lee K. W., Park Y. S., Lee J. Y., Lee S. H., et al. Peroxiredoxin II is an essential antioxidant enzyme that prevents the oxidative inactivation of VEGF receptor-2 in vascular endothelial cells. *Molecular cell*, 2011;44(4):545-58.
- [49] Kemble D. J., Sun G. Direct and specific inactivation of protein tyrosine kinases in the Src and FGFR families by reversible cysteine oxidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009;106(13):5070-5.
- [50] Giannoni E., Buricchi F., Raugei G., Ramponi G., Chiarugi P. Intracellular reactive oxygen species activate Src tyrosine kinase during cell adhesion and anchorage-dependent cell growth. *Molecular and cellular biology*, 2005;25(15):6391-403.
- [51] Liu H., Nishitoh H., Ichijo H., Kyriakis J. M. Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 requires prior dissociation of the ASK1 inhibitor thioredoxin. *Molecular and cellular biology*, 2000;20(6):2198-208.
- [52] Shiizaki S., Naguro I., Ichijo H. Activation mechanisms of ASK1 in response to various stresses and its significance in intracellular signaling. *Advances in biological regulation*, 2013;53(1):135-44.
- [53] Lim P. L., Liu J., Go M. L., Boelsterli U. A. The mitochondrial superoxide/thioredoxin-2/Ask1 signaling pathway is critically involved in troglitazone-induced cell injury to human hepatocytes. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 2008;101(2):341-9.
- [54] Tanaka T., Hosoi F., Yamaguchi-Iwai Y., Nakamura H., Masutani H., Ueda S., et al. Thioredoxin-2 (TRX-2) is an essential gene regulating mitochondria-dependent apoptosis. *The EMBO journal*, 2002;21(7):1695-703.
- [55] Song J. J., Lee Y. J. Differential role of glutaredoxin and thioredoxin in metabolic oxidative stress-induced activation of apoptosis signal-regulating kinase 1. *The Biochemical journal*, 2003;373(Pt 3):845-53.
- [56] Saxena G., Chen J., Shalev A. Intracellular shuttling and mitochondrial function of thioredoxin-interacting protein. *The Journal of biological chemistry*, 2010;285(6):3997-4005.
- [57] Matsuno K., Iwata K., Matsumoto M., Katsuyama M., Cui W., Murata A., et al. NOX1/NADPH oxidase is involved in endotoxin-induced cardiomyocyte apoptosis. *Free radical biology and medicine*, 2012;53(9):1718-28.

- [58] Durgadoss L., Nidadavolu P., Valli R. K., Saeed U., Mishra M., Seth P., et al. Redox modification of Akt mediated by the dopaminergic neurotoxin MPTP, in mouse midbrain, leads to down-regulation of pAkt. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2012;26(4):1473-83.
- [59] Nadeau P. J., Charette S. J., Landry J. REDOX reaction at ASK1-Cys250 is essential for activation of JNK and induction of apoptosis. *Molecular biology of the cell*, 2009;20(16):3628-37.
- [60] Nadeau P. J., Charette S. J., Toledano M. B., Landry J. Disulfide Bond-mediated multimerization of Ask1 and its reduction by thioredoxin-1 regulate H₂O₂-induced c-Jun NH₂-terminal kinase activation and apoptosis. *Molecular biology of the cell*, 2007;18(10):3903-13.
- [61] Kwon J., Lee S. R., Yang K. S., Ahn Y., Kim Y. J., Stadtman E. R., et al. Reversible oxidation and inactivation of the tumor suppressor PTEN in cells stimulated with peptide growth factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004;101(47):16419-24.
- [62] Leslie N. R., Bennett D., Lindsay Y. E., Stewart H., Gray A., Downes C. P. Redox regulation of PI 3-kinase signalling via inactivation of PTEN. *The EMBO journal*, 2003;22(20):5501-10.
- [63] Gopalakrishna R., Gundimeda U., Schiffman J. E., McNeill T. H. A direct redox regulation of protein kinase C isoenzymes mediates oxidant-induced neuritogenesis in PC12 cells. *The Journal of biological chemistry*, 2008;283(21):14430-44.
- [64] Morinaka A., Yamada M., Itofusa R., Funato Y., Yoshimura Y., Nakamura F., et al. Thioredoxin mediates oxidation-dependent phosphorylation of CRMP2 and growth cone collapse. *Science signaling*, 2011;4(170):ra26.
- [65] Coyoy A., Olguin-Albuerne M., Martinez-Briseno P., Moran J. Role of reactive oxygen species and NADPH-oxidase in the development of rat cerebellum. *Neurochemistry international*, 2013;62(7):998-1011.
- [66] Le Belle J. E., Orozco N. M., Paucar A. A., Saxe J. P., Mottahedeh J., Pyle A. D., et al. Proliferative Neural Stem Cells Have High Endogenous ROS Levels that Regulate Self-Renewal and Neurogenesis in a PI3K/Akt-Dependant Manner. *Cell Stem Cell*, 2011;8(1):59-71.
- [67] Munnamalai V., Suter D. M. Reactive oxygen species regulate F-actin dynamics in neuronal growth cones and neurite outgrowth. *Journal of neurochemistry*, 2009; 108(3): 644-61.
- [68] Munnamalai V., Weaver C. J., Weisheit C. E., Venkatraman P., Agim Z. S., Quinn M. T., et al. Bidirectional interactions between NOX2-type NADPH oxidase and the F-actin cytoskeleton in neuronal growth cones. *Journal of neurochemistry*, 2014.
- [69] Tsatmali M., Walcott E. C., Makarenkova H., Crossin K. L. Reactive oxygen species modulate the differentiation of neurons in clonal cortical cultures. *Molecular and cellular neurosciences*, 2006;33(4):345-57.
- [70] Celotto A. M., Liu Z., Vandemark A. P., Palladino M. J. A novel *Drosophila* SOD2 mutant demonstrates a role for mitochondrial ROS in neurodevelopment and disease. *Brain and behavior*, 2012;2(4):424-34.
- [71] Yoneyama M., Kawada K., Gotoh Y., Shiba T., Ogita K. Endogenous reactive oxygen species are essential for proliferation of neural stem/progenitor cells. *Neurochemistry international*, 2010;56(6-7):740-6.

- [72] Limoli C. L., Rola R., Giedzinski E., Mantha S., Huang T. T., Fike J. R. Cell-density-dependent regulation of neural precursor cell function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004;101(45):16052-7.
- [73] Leslie N. R. The redox regulation of PI 3-kinase-dependent signaling. *Antioxidants and redox signaling*, 2006;8(9-10):1765-74.
- [74] Patapoutian A., Reichardt L. F. Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Current opinion in neurobiology*, 2001;11(3):272-80.
- [75] Kaplan D. R., Miller F. D. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Current opinion in neurobiology*, 2000;10(3):381-91.
- [76] Katoh S., Mitsui Y., Kitani K., Suzuki T. Hyperoxia induces the neuronal differentiated phenotype of PC12 cells via a sustained activity of mitogen-activated protein kinase induced by Bcl-2. *The Biochemical journal*, 1999;338 (Pt 2):465-70.
- [77] Kamata H., Oka S., Shibukawa Y., Kakuta J., Hirata H. Redox regulation of nerve growth factor-induced neuronal differentiation of PC12 cells through modulation of the nerve growth factor receptor, TrkA. *Archives of biochemistry and biophysics*, 2005;434(1):16-25.
- [78] Aikawa R., Komuro I., Yamazaki T., Zou Y., Kudoh S., Tanaka M., et al. Oxidative stress activates extracellular signal-regulated kinases through Src and Ras in cultured cardiac myocytes of neonatal rats. *The Journal of clinical investigation*, 1997;100(7):1813-21.
- [79] Abe J., Berk B. C. Fyn and JAK2 mediate Ras activation by reactive oxygen species. *The Journal of biological chemistry*, 1999;274(30):21003-10.
- [80] Dey N., Howell B. W., De P. K., Durden D. L. CSK negatively regulates nerve growth factor induced neural differentiation and augments AKT kinase activity. *Experimental cell research*, 2005;307(1):1-14.
- [81] Obara Y., Labudda K., Dillon T. J., Stork P. J. PKA phosphorylation of Src mediates Rap1 activation in NGF and cAMP signaling in PC12 cells. *Journal of cell science*, 2004;117(Pt 25):6085-94.
- [82] Suzukawa K., Miura K., Mitsushita J., Resau J., Hirose K., Crystal R., et al. Nerve growth factor-induced neuronal differentiation requires generation of Rac1-regulated reactive oxygen species. *The Journal of biological chemistry*, 2000;275(18):13175-8.
- [83] Ibi M., Katsuyama M., Fan C., Iwata K., Nishinaka T., Yokoyama T., et al. NOX1/NADPH oxidase negatively regulates nerve growth factor-induced neurite outgrowth. *Free radical biology and medicine*, 2006;40(10):1785-95.
- [84] Sampath D., Jackson G. R., Werrbach-Perez K., Perez-Polo J. R. Effects of nerve growth factor on glutathione peroxidase and catalase in PC12 cells. *Journal of neurochemistry*, 1994;62(6):2476-9.
- [85] Jackson G. R., Sampath D., Werrbach-Perez K., Perez-Polo J. R. Effects of nerve growth factor on catalase and glutathione peroxidase in a hydrogen peroxide-resistant pheochromocytoma subclone. *Brain research*, 1994;634(1):69-76.
- [86] Cassano S., Agnese S., D'Amato V., Papale M., Garbi C., Castagnola P., et al. Reactive oxygen species, Ki-Ras, and mitochondrial superoxide dismutase cooperate in nerve growth factor-induced differentiation of PC12 cells. *The Journal of biological chemistry*, 2010;285(31):24141-53.

- [87] Tsatmali M., Walcott E. C., Crossin K. L. Newborn neurons acquire high levels of reactive oxygen species and increased mitochondrial proteins upon differentiation from progenitors. *Brain research*, 2005;1040(1-2):137-50.
- [88] Zhang X. F., Forscher P. Rac1 modulates stimulus-evoked Ca²⁺ release in neuronal growth cones via parallel effects on microtubule/endoplasmic reticulum dynamics and reactive oxygen species production. *Molecular biology of the cell*, 2009;20(16):3700-12.
- [89] Joseph S. K., Nakao S. K., Sukumvanich S. Reactivity of free thiol groups in type-I inositol trisphosphate receptors. *The Biochemical journal*, 2006;393(Pt 2):575-82.
- [90] Henley J., Poo M. M. Guiding neuronal growth cones using Ca²⁺ signals. *Trends in cell biology*, 2004;14(6):320-30.
- [91] Sharma A., Verhaagen J., Harvey A. R. Receptor complexes for each of the Class 3 Semaphorins. *Frontiers in cellular neuroscience*, 2012;6:28.
- [92] Zhou Y., Gunput R. A., Pasterkamp R. J. Semaphorin signaling: progress made and promises ahead. *Trends in biochemical sciences*, 2008;33(4):161-70.
- [93] Mieyal J. J., Gallogly M. M., Qanungo S., Sabens E. A., Shelton M. D. Molecular mechanisms and clinical implications of reversible protein S-glutathionylation. *Antioxidants and redox signaling*, 2008;10(11):1941-88.
- [94] Goldman E. H., 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. *The Journal of biological chemistry*, 2004;279(11):10442-9.
- [95] 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;275(5296):90-4.
- [96] Chang H. Y., Nishitoh H., Yang X., Ichijo H., Baltimore D. Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by the adapter protein Daxx. *Science*, 1998;281(5384):1860-3.
- [97] Hatai T., Matsuzawa A., Inoshita S., Mochida Y., Kuroda T., Sakamaki K., et al. Execution of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)-induced apoptosis by the mitochondria-dependent caspase activation. *The Journal of biological chemistry*, 2000;275(34):26576-81.
- [98] Charette S. J., Lambert H., Landry J. A kinase-independent function of Ask1 in caspase-independent cell death. *The Journal of biological chemistry*, 2001;276(39):36071-4.
- [99] Nishitoh H., Matsuzawa A., Tobiume K., Saegusa K., Takeda K., Inoue K., et al. ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes and development*, 2002;16(11):1345-55.
- [100] Nagai H., Noguchi T., Homma K., Katagiri K., Takeda K., Matsuzawa A., et al. Ubiquitin-like sequence in ASK1 plays critical roles in the recognition and stabilization by USP9X and oxidative stress-induced cell death. *Molecular cell*, 2009;36(5):805-18.
- [101] Ramiro-Cortes Y., Moran J. Role of oxidative stress and JNK pathway in apoptotic death induced by potassium deprivation and staurosporine in cerebellar granule neurons. *Neurochemistry international*, 2009;55(7):581-92.
- [102] Ramiro-Cortes Y., Guemez-Gamboa A., Moran J. Reactive oxygen species participate in the p38-mediated apoptosis induced by potassium deprivation and staurosporine in

- cerebellar granule neurons. *The international journal of biochemistry and cell biology*, 2011;43(9):1373-82.
- [103] Valencia A., Moran J. Role of oxidative stress in the apoptotic cell death of cultured cerebellar granule neurons. *Journal of neuroscience research*, 2001;64(3):284-97.
- [104] Sabens E. A., Distler A. M., Mielal J. J. Levodopa deactivates enzymes that regulate thiol-disulfide homeostasis and promotes neuronal cell death: implications for therapy of Parkinson's disease. *Biochemistry*, 2010;49(12):2715-24.
- [105] Liedhegner E. A., Steller K. M., Mielal J. J. Levodopa activates apoptosis signaling kinase 1 (ASK1) and promotes apoptosis in a neuronal model: implications for the treatment of Parkinson's disease. *Chemical research in toxicology*, 2011;24(10):1644-52.
- [106] Allen E. M., Mielal J. J. Protein-thiol oxidation and cell death: regulatory role of glutaredoxins. *Antioxidants and redox signaling*, 2012;17(12):1748-63.
- [107] Kim A. H., Khursigara G., Sun X., Franke T. F., Chao M. V. Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. *Molecular and cellular biology*, 2001;21(3):893-901.
- [108] Zhang R., Luo D., Miao R., Bai L., Ge Q., Sessa W. C., et al. Hsp90-Akt phosphorylates ASK1 and inhibits ASK1-mediated apoptosis. *Oncogene*, 2005;24(24):3954-63.
- [109] World C., Spindel O. N., Berk B. C. Thioredoxin-interacting protein mediates TRX1 translocation to the plasma membrane in response to tumor necrosis factor-alpha: a key mechanism for vascular endothelial growth factor receptor-2 transactivation by reactive oxygen species. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 2011;31(8):1890-7.
- [110] Yoshihara E., Masaki S., Matsuo Y., Chen Z., Tian H., Yodoi J. Thioredoxin/Txnip: Redoxosome, as a Redox Switch for the Pathogenesis of Diseases. *Frontiers in immunology*, 2014;4:514.
- [111] Kanamoto T., Mota M., Takeda K., Rubin L. L., Miyazono K., Ichijo H., et al. Role of apoptosis signal-regulating kinase in regulation of the c-Jun N-terminal kinase pathway and apoptosis in sympathetic neurons. *Molecular and cellular biology*, 2000;20(1):196-204.
- [112] Takagi Y., Mitsui A., Nishiyama A., Nozaki K., Sono H., Gon Y., et al. Overexpression of thioredoxin in transgenic mice attenuates focal ischemic brain damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999; 96(7):4131-6.
- [113] Schulze P. C., Yoshioka J., Takahashi T., He Z., King G. L., Lee R. T. Hyperglycemia promotes oxidative stress through inhibition of thioredoxin function by thioredoxin-interacting protein. *The Journal of biological chemistry*, 2004;279(29):30369-74.
- [114] Schulze P. C., De Keulenaer G. W., Yoshioka J., Kassik K. A., Lee R. T. Vitamin D3-upregulated protein-1 (VDUP-1) regulates redox-dependent vascular smooth muscle cell proliferation through interaction with thioredoxin. *Circulation research*, 2002;91(8):689-95.
- [115] Lipton S. A. NMDA receptor activity regulates transcription of antioxidant pathways. *Nature neuroscience*, 2008;11(4):381-2.
- [116] Papadia S., Soriano F. X., Leveille F., Martel M. A., Dakin K. A., Hansen H. H., et al. Synaptic NMDA receptor activity boosts intrinsic antioxidant defenses. *Nature neuroscience*, 2008;11(4):476-87.

- [117] Federico A., Cardaioli E., Da Pozzo P., Formichi P., Gallus G. N., Radi E. Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration. *Journal of the neurological sciences*, 2012;322(1-2):254-62.
- [118] Norton M., Ng A. C., Baird S., Dumoulin A., Shutt T., Mah N., et al. ROMO1 is an essential redox-dependent regulator of mitochondrial dynamics. *Science signaling*, 2014;7(310):ra10.
- [119] Liot G., Bossy B., Lubitz S., Kushnareva Y., Sejbuk N., Bossy-Wetzel E. Complex II inhibition by 3-NP causes mitochondrial fragmentation and neuronal cell death via an NMDA- and ROS-dependent pathway. *Cell death and differentiation*, 2009; 16(6): 899-909.
- [120] Yu T., Robotham J. L., Yoon Y. Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006;103(8):2653-8.
- [121] Chung Y. M., Kim J. S., Yoo Y. D. A novel protein, Romo1, induces ROS production in the mitochondria. *Biochemical and biophysical research communications*, 2006; 347(3): 649-55.
- [122] Chung Y. M., Lee S. B., Kim H. J., Park S. H., Kim J. J., Chung J. S., et al. Replicative senescence induced by Romo1-derived reactive oxygen species. *The Journal of biological chemistry*, 2008;283(48):33763-71.
- [123] Lee S. B., Kim J. J., Kim T. W., Kim B. S., Lee M. S., Yoo Y. D. Serum deprivation-induced reactive oxygen species production is mediated by Romo1. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 2010;15(2):204-18.
- [124] Scorrano L., Ashiya M., Buttle K., Weiler S., Oakes S. A., Mannella C. A., et al. A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Developmental cell*, 2002;2(1):55-67.
- [125] Kim J. J., Lee S. B., Park J. K., Yoo Y. D. TNF-alpha-induced ROS production triggering apoptosis is directly linked to Romo1 and Bcl-X(L). *Cell death and differentiation*, 2010;17(9):1420-34.
- [126] Avshalumov M. V., Chen B. T., Marshall S. P., Pena D. M., Rice M. E. Glutamate-dependent inhibition of dopamine release in striatum is mediated by a new diffusible messenger, H₂O₂. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 2003;23(7):2744-50.
- [127] Avshalumov M. V., Patel J. C., Rice M. E. AMPA receptor-dependent H₂O₂ generation in striatal medium spiny neurons but not dopamine axons: one source of a retrograde signal that can inhibit dopamine release. *Journal of neurophysiology*, 2008;100(3):1590-601.
- [128] Chen B. T., Avshalumov M. V., Rice M. E. H₂O₂ is a novel, endogenous modulator of synaptic dopamine release. *Journal of neurophysiology*, 2001;85(6):2468-76.
- [129] Avshalumov M. V., Chen B. T., Koos T., Tepper J. M., Rice M. E. Endogenous hydrogen peroxide regulates the excitability of midbrain dopamine neurons via ATP-sensitive potassium channels. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 2005;25(17):4222-31.
- [130] Avshalumov M. V., Rice M. E. Activation of ATP-sensitive K⁺ (K(ATP)) channels by H₂O₂ underlies glutamate-dependent inhibition of striatal dopamine release.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003;100(20):11729-34.
- [131] Gruber A. J., McDonald R. J. Context, emotion, and the strategic pursuit of goals: interactions among multiple brain systems controlling motivated behavior. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 2012;6:50.
- [132] Yin H. H., Knowlton B. J. The role of the basal ganglia in habit formation. *Nature reviews Neuroscience*, 2006;7(6):464-76.
- [133] Palmiter R. D. Dopamine signaling in the dorsal striatum is essential for motivated behaviors: lessons from dopamine-deficient mice. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2008;1129:35-46.
- [134] Balleine B. W., Delgado M. R., Hikosaka O. The role of the dorsal striatum in reward and decision-making. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 2007;27(31):8161-5.
- [135] Nakano K., Kayahara T., Tsutsumi T., Ushiro H. Neural circuits and functional organization of the striatum. *Journal of neurology*, 2000;247 Suppl. 5:V1-15.
- [136] Hernandez M. S., Britto L. R. NADPH oxidase and neurodegeneration. *Current neuropharmacology*, 2012;10(4):321-7.
- [137] Valencia A., Sapp E., Kimm J. S., McClory H., Reeves P. B., Alexander J., et al. Elevated NADPH oxidase activity contributes to oxidative stress and cell death in Huntington's disease. *Human molecular genetics*, 2013;22(6):1112-31.
- [138] Stephan D., Winkler M., Kuhner P., Russ U., Quast U. Selectivity of repaglinide and glibenclamide for the pancreatic over the cardiovascular K(ATP) channels. *Diabetologia*, 2006;49(9):2039-48.
- [139] Ashcroft S. J., Ashcroft F. M. Properties and functions of ATP-sensitive K-channels. *Cellular signalling*, 1990;2(3):197-214.
- [140] Babenko A. P., Aguilar-Bryan L., Bryan J. A view of sur/KIR6.X, KATP channels. *Annual review of physiology*, 1998;60:667-87.
- [141] Bao L., Avshalumov M. V., Patel J. C., Lee C. R., Miller E. W., Chang C. J., et al. Mitochondria are the source of hydrogen peroxide for dynamic brain-cell signaling. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 2009;29(28):9002-10.
- [142] Dan Y., Poo M. M. Spike timing-dependent plasticity of neural circuits. *Neuron*, 2004;44(1):23-30.
- [143] Raymond C. R. Different requirements for action potentials in the induction of different forms of long-term potentiation. *The Journal of physiology*, 2008;586(7):1859-65.
- [144] Katsuki H., Nakanishi C., Saito H., Matsuki N. Biphasic effect of hydrogen peroxide on field potentials in rat hippocampal slices. *European journal of pharmacology*, 1997; 337(2-3):213-8.
- [145] Auerbach J. M., Segal M. Peroxide modulation of slow onset potentiation in rat hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 1997;17(22):8695-701.
- [146] Thiels E., Urban N. N., Gonzalez-Burgos G. R., Kanterewicz B. I., Barrionuevo G., Chu C. T., et al. Impairment of long-term potentiation and associative memory in mice that overexpress extracellular superoxide dismutase. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 2000;20(20):7631-9.

- [147] Klann E. Cell-permeable scavengers of superoxide prevent long-term potentiation in hippocampal area CA1. *Journal of neurophysiology*, 1998;80(1):452-7.
- [148] Kishida K. T., Hoeffler C. A., Hu D., Pao M., Holland S. M., Klann E. Synaptic plasticity deficits and mild memory impairments in mouse models of chronic granulomatous disease. *Molecular and cellular biology*, 2006;26(15):5908-20.
- [149] Thiels E., Klann E. Hippocampal memory and plasticity in superoxide dismutase mutant mice. *Physiology and behavior*, 2002;77(4-5):601-5.
- [150] Hu D., Serrano F., Oury T. D., Klann E. Aging-dependent alterations in synaptic plasticity and memory in mice that overexpress extracellular superoxide dismutase. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 2006; 26(15):3933-41.