



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
FACULTAD DE QUÍMICA**

**ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA VÍA DE LA
NEDILACIÓN EN EL DAÑO CELULAR POR ESTRÉS
OXIDANTE**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
Q.F.B. ANA CRISTINA ANDÉRICA ROMERO**

**TUTOR PRINCIPAL:
DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI
Facultad de Química**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
DRA. MARINA MACÍAS SILVA
Instituto de Fisiología Celular
DRA. GUADALUPE REYES
Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

MÉXICO, D. F. MARZO 2015



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.

Reconocimientos

Esta tesis de maestría fue dirigida por el Dr. José Pedraza Chaverri en el laboratorio 209 del Departamento de Biología de la Facultad de Química de la UNAM.

A los miembros del comité tutor por sus comentarios y apoyo para la realización de este trabajo:

Dra. Marina Macías Silva Instituto de Fisiología Celular (UNAM)

Dra. Guadalupe Reyes Cruz Departamento de Biología Celular (CINVESTAV)

Este trabajo fue apoyado por los proyectos PAPIIT IN210713 y CONACYT 220046.

Se agradece al CONACYT por el apoyo otorgado durante la realización de esta tesis (355558).

Agradecimientos

Agradezco a Dios, por todas las bendiciones que me ha dado y por haberme permitido llegar hasta aquí.

A Manuelita por ser esa estrellita que me ilumina en las noches de desvelo. A Luciano, gracias por toda tu sabiduría y por la herencia más valiosa que me pudiste dejar, sé que siempre estarás aquí abuelito.

Con todo mi cariño y mi amor, te doy gracias mami, por motivarme y escucharme siempre, por ser mi amiga y confidente. A ti papi por enseñarme a perseverar siempre y a no desistir nunca para cumplir mis metas y mis sueños.

A Sebastián, por tu paciencia y comprensión. Por inspirarme a ser mejor, por el abrazo cuando algo va mal y por las alegrías compartidas. Esta tesis lleva mucho de ti, gracias por estar siempre a mi lado.

A todos los chicos del laboratorio 209 por hacer de este camino una gran experiencia. A la Dra. Susy por enseñarme el arte de cultivar neuronas, a la Dra. Jacquie por sus comentarios y todo su apoyo, por ayudarme a llevar este proyecto hacia adelante, pero sobre todo por la gran amistad que me ha brindado.

A mi Kika que a pesar de la distancia ha sido más que una amiga...

Por último a la Dra. Irma por sembrar en mí esta pasión por la investigación y por ser mi mentora en la vía de la nedilación, gracias Irma.



“La sabiduría que viene de lo alto es, ante todo, pura y además pacífica, amable, benigna, llena de compasión y de buenos frutos, ecuánime y genuina.”



Abreviaturas

ATP	Adenosíntrifosfato	KLHL3	Miembro de la familiaKelch-like número 3
BTB	DominioBric– abrac/tramtrack/broad- complex	MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5- difenil bromuro de tetrazolio
CAT	Catalasa	NAE	Enzima activadora de Nedd8
CRL4A	Ligasa de culina 4A	Nedd8	Proteína 8 expresada en células precursoras neurales- regulada negativamente en el desarrollo
CRLs	Cullin-RING ligasas	Nek2	Cinasa 2 relacionada a NIMA
Cul3	Culina 3	NFκB	Factor nuclear kappa B
DGR	Dominio de repeticiones de doble glicina	NGC	Neuronas granulares de cerebelo
DHE	Dihidroetidio	Nrf2	Factor nuclear eritroide 2- relacionado al factor 2
E1	Enzima activadora de ubiquitina	PHAI1	Pseudohipoaldosteronismo del tipo II
E2	Enzima conjugadora de ubiquitina	PLK1	Cinasa 1 tipo polo
E3	Ligasa de ubiquitina	RING	Really interesting new gene
ERO	Especies reactivas de oxígeno	RNR	Ribonucleótidoeductasa
FDA	Diacetato de fluoresceína	SOD-1	Superóxido dismutasa-1
GCL	Glutamato cisteína ligasa	Ub	Ubiquitina
GPx	Glutación peroxidasa	UBL	Parecida a ubiquitina
GST	Glutación S-transferasa	UPS	Sistema ubiquitin- proteasoma
HECT	Carboxilo terminal homólogo a E6-AP		
HIF-1α	Factor inducible por hipoxia 1α		
HO-1	Hemo oxigenasa-1		
Keap1	Proteína 1 asociada al dominio tipo Kelch-ECH		
KLHL18	Miembro de la familiaKelch- likenúmero18		

Resumen	7
I. Introducción	9
1.1 Sistema ubiquitin proteasoma.	9
1.1.1 Mecanismo de ubiquitinación.	9
1.2 Ligasas de ubiquitina (E3).	10
1.2.1 Familias HECT y RING.....	10
1.2.2 Ligasas de ubiquitina tipo Culina-RING.	11
1.2.3 Culina 3 y su importancia biológica.	13
1.3 Proteínas parecidas a ubiquitina.....	15
1.4 Nedd8 y sus proteínas diana.	15
1.4.1 Nedilación de culinas.....	17
1.4.2 Inhibidor de la nedilación: MLN4924.....	17
1.4.3 Importancia biológica de Nedd8.	19
1.5 Especies reactivas de oxígeno y respuesta antioxidante.....	19
1.5.1 El factor Nrf2 ante el estrés oxidante: Regulación de su actividad.....	20
1.5.2 Enfermedades neurodegenerativas y estrés oxidante.	24
II. Justificación	26
III. Hipótesis.....	27
IV. Objetivos y estrategia experimental.....	27
2.1 General:	27
2.2 Particulares:	27
2.3 Estrategia experimental:	28
V. Materiales y métodos	29
5.1 Reactivos	29
5.2 Modelo <i>in vitro</i>	29
5.3 Determinación de la viabilidad celular.....	30
5.3.1 MTT.....	30
5.3.2 FDA.....	30
5.4 Determinación de los niveles de ERO	31
5.5 Inmunoprecipitación y western blot.....	31
VI. Resultados	33
6.1 El peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) induce daño celular y aumento en los niveles de ERO	33

6.2	El MLN4924 induce la producción de ERO en NGC pero no afecta la viabilidad celular.	36
6.3	Efecto del inhibidor MLN4924 sobre la disminución de viabilidad celular y el aumento de ERO inducido por H ₂ O ₂ .	38
6.4	El MLN4924 aumenta los niveles de Nrf2.	42
VII.	Discusión.	44
VIII.	Conclusión	49
IX.	Perspectivas.	49
X.	Referencias	50

Antecedentes. El sistema ubiquitin-proteasoma se encarga de la degradación de proteínas intracelulares y requiere de unas proteínas llamadas ligasas de ubiquitina que brindan especificidad de sustrato al sistema. Uno de los blancos de la culina 3 (Cul3), una ligasa de ubiquitina, es el factor nuclear eritroide 2-relacionado al factor 2 (Nrf2). El Nrf2 se considera el principal regulador de la respuesta antioxidante. La Cul3 se modifica postraduccionalmente por la proteína 8 en las células precursoras neurales regulada negativamente en el desarrollo (Nedd8 por sus siglas en inglés: *Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 8*), esta modificación se necesita para la actividad ligasa de ubiquitina de Cul3.

Justificación. Inhibir la nedilación podría significar un nuevo blanco terapéutico contra el estrés oxidante y por ello, en este trabajo surge el interés de investigar y evidenciar si el inhibidor de la nedilación MLN4924 modifica la respuesta antioxidante mediada por Nrf2.

Hipótesis. El inhibidor de la nedilación MLN4924 aumentará los niveles del factor Nrf2 y con ello, se protegerá del estrés oxidante inducido por peróxido de hidrógeno (H₂O₂) a las neuronas granulares de cerebelo.

Objetivo. Estudiar el efecto del inhibidor de la nedilación MLN4924 sobre los niveles de Nrf2 y la disminución de la viabilidad celular inducida por el H₂O₂ en las NGC.

Métodos. En este trabajo se utilizaron NGC que por ser altamente homogéneas entre sí, son un buen modelo para caracterizar y estudiar mecanismos de muerte o supervivencia neuronal, así como mecanismos de neurodegeneración y neuroprotección. Como estrategia experimental se generó estrés oxidante con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y se utilizó el inhibidor de la nedilación MLN4924 para evaluar la viabilidad celular, la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y los niveles de Nrf2.

Resultados. Se evidenció que el MLN4924 no afectó la viabilidad de las NGC como lo hizo el H₂O₂. Posteriormente se evaluó si el MLN4924 prevenía la disminución de la viabilidad de las NGC inducida por el H₂O₂ y se observó que tanto el pretratamiento de

las NGC con el MLN4924 como el tratamiento con el MLN4924 durante el reto tóxico atenuaron la disminución de la viabilidad celular inducida por el H₂O₂. También se observó que el MLN4924 indujo la generación de ERO de manera dependiente del tiempo en las NGC, pero interesantemente disminuyó significativamente la generación de ERO inducida por H₂O₂. Aunado a esto, el MLN4924 aumentó los niveles de Nrf2 tanto en el núcleo como en el citoplasma de las NGC.

Conclusión. El tratamiento con el MLN4924 en las NGC, atenuó la disminución de la viabilidad celular y el aumento de las ERO inducido por el H₂O₂. Así también, el MLN4924 aumentó los niveles de Nrf2 tanto en el núcleo como en el citoplasma de las NGC, lo que sugiere la participación de Nrf2 en la citoprotección contra el H₂O₂ de las NGC tratadas con el MLN4924.

1.1 Sistema ubiquitin proteasoma.

Con el objetivo de mantener la funcionalidad y la viabilidad celular, es importante que las proteínas dañadas o que han llegado a ser innecesarias para la célula sean reconocidas y degradadas. Uno de los sistemas más importantes para la degradación de proteínas es el sistema ubiquitin-proteasoma (UPS por sus siglas en inglés) (Jung, et al., 2009; Hochstrasser, 1992). Este sistema se encuentra tanto en el núcleo como en el citosol (Peters et al., 1994). Al degradar ciclinas e inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas, el UPS está involucrado en el control de la progresión del ciclo celular (Thompson et al., 2008) y en la expresión génica mediante la degradación de reguladores transcripcionales como el proto-oncogen jun (c-Jun), el factor nuclear kappa B (NFκB), la proteína supresora de tumores p53 (Lim et al., 2004) y β-catenina (Miller y Moon, 1996), entre otros.

1.1.1 Mecanismo de ubiquitinación.

El sistema de degradación vía proteasoma se encuentra mediado por un proceso denominado ubiquitinación (Hochstrasser, 1992), en el cual la ubiquitina (Ub), una proteína pequeña de 76 aminoácidos, se une a la proteína blanco por una unión peptídica (Jung et al., 2009). La ubiquitinación es un proceso complejo que consta de varios pasos, y está mediado por una serie de enzimas en las que se incluye una enzima activadora de Ub (E1, UAE por sus siglas en inglés, también conocida como UBA1), una enzima conjugadora de Ub (E2) y una ligasa de Ub (E3) (Bedford et al., 2011).

El primer paso en la poliubiquitinación del substrato es la activación inicial de un residuo conservado de glicina (Gly76) en el extremo carboxilo de la Ub; esta reacción es dependiente de adenosín trifosfato (ATP) y se cataliza por una E1. Hasta ahora se han encontrado 9 enzimas activadoras de Ub diferentes y se encuentran tanto en el núcleo como en el citoplasma (Jung et al., 2009). Enseguida la E1 transfiere la Ub a una E2 a través de una reacción de transtiolación y posteriormente, la E2 interactúa

con una E3 para que, finalmente, se de la transferencia de la Ub a la proteína diana. Este proceso puede ser por dos vías y depende del tipo de E3 involucrada; de esta forma la especificidad biológica de la ubiquitinación parece regularse por una combinación selectiva de las enzimas E2 y E3 (Wong et al., 2003; Komander, 2009; Bosu y Kipreos, 2008; Herrmann et al., 2007).

1.2 Ligasas de ubiquitina (E3).

Las E3 son el grupo más grande de enzimas involucradas en el UPS. En contraste con las enzimas E1 y E2, hasta ahora se han identificado más de 500 E3, lo que permite sugerir que una E2 puede asociarse a diferentes ligasas E3; dando lugar a una gran cantidad de complejos E2/E3 funcionales y por lo tanto reconocer un alto número de proteínas diana de manera específica (Jung et al., 2009; Ulrich, 2002).

1.2.1 Familias HECT y RING.

Las E3 están clasificadas en dos clases principales: E3 tipo HECT; que tienen un dominio carboxilo terminal homólogo a E6-AP (HECT por sus siglas en inglés: *Homologous to the E6-AP [E6-Associated Protein] carboxyl terminus domain*), y E3 tipo RING (por sus siglas en inglés: *Really Interesting New Gene*). Las E3 tipo RING son aquellas que tienen un dominio de coordinación a Zn^{2+} , que consiste en una serie de residuos principalmente de histidina y cisteína; formando una estructura de “dedo de zinc” (por lo cual también se le denomina *RING finger*) (Pintard et al., 2004; Borden y Freemont, 1996; Freemont et al., 1991).

Cuando la reacción de ubiquitinación se encuentra mediada por una ligasa E3 tipo RING, la Ub es transferida a la proteína diana directamente de la E2, es decir la E3 funciona como un andamio entre la E2 y la proteína diana lo que permite la transferencia eficiente de la Ub (Metzger et al., 2012). Cuando la reacción de ubiquitinación se encuentra mediada por una ligasas E3 tipo HECT, la reacción de transferencia de Ub es diferente, ya que primero la Ub se transfiere de la E2 a la E3 y posteriormente de la E3 a la proteína diana (Hua y Vierstra, 2011; Budhidarmo et al., 2012).

Las E3 tipo RING se dividen en monoméricas y multiméricas; las primeras están formadas por una única proteína que une la E2 con la proteína sustrato para la

transferencia de la Ub. Por otro lado, las multiméricas además de una proteína con dominio RING (Rbx1 o Rbx2), poseen alguna de las diferentes culinas descritas. La culina es una especie de andamio que facilita la transferencia de la Ub a la proteína sustrato. Estas E3 tipo RING multiméricas también son llamadas ligasas Culina-RING (CRLs por sus siglas en inglés: *Cullin-RING ligases*) (Hua y Vierstra, 2011; Budhidarmo et al., 2012; Metzger et al., 2012).

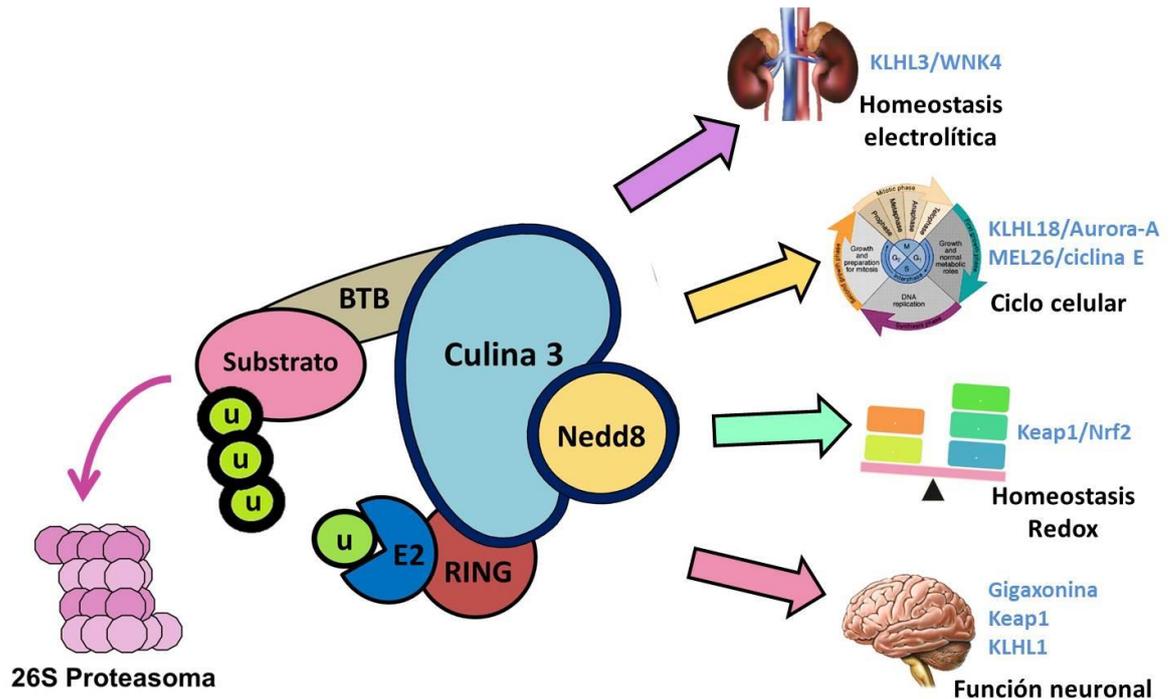
1.2.2 Ligasas de ubiquitina tipo Culina-RING.

Las CRLs son el tipo de ligasas de ubiquitina más conocido hasta ahora. Las culinas son una familia de proteínas estructuralmente relacionadas, que contienen los siguientes dominios conservados: la región N-terminal (NTD); que consta de tres repeticiones del motivo *Cullin* (CR1 a CR3) y la región C-terminal (CTD); que alberga un dominio de homología a *Cullin* (CH). El motivo CR1 ancla las proteínas adaptadoras afines al complejo E3, y el dominio CH en el extremo carboxilo es crítico para la unión de la proteína RING (Sarikas et al., 2011). Hasta ahora, se han identificado por lo menos 7 tipos diferentes de culinas en eucariontes: Cul1, Cul2, Cul3, Cul4A, Cul4B, Cul5 y Cul7 (Petroski y Deshaies, 2005; Sarikas et al., 2011).

Como se mencionó, las CRLs son complejos multiméricos que tienen en su centro catalítico a un miembro de la familia de las culinas por lo que, cada culina forma una clase distinta de complejo CRL; cada uno con distintos adaptadores y/o subunidades que tienen como función reconocer específicamente una proteína blanco (Petroski y Deshaies, 2005; Marín 2009; Duda et al., 2011). Debido a que las CRLs regulan la ubiquitinación de diversas proteínas, su actividad se ha considerado esencial en numerosos procesos celulares; ya que la ubiquitinación no sólo es una marca para la degradación, sino también es vital para otras funciones celulares como la regulación del crecimiento celular, reparación del ADN, degeneración neural y muscular y la respuesta al estrés (Sarikas et al., 2011; Jung et al., 2009).

En comparación a los demás complejos CRL, aquél basado en culina 3 (Cul3) es un complejo muy peculiar, pues no requiere de diversos adaptadores para poder reconocer a su proteína blanco, sino que sólo requiere de una proteína con un dominio BTB (bric-a-brac/tramtrack/broad-complex) para reconocerla. Estos dominios están presentes en una gran variedad de proteínas e interesantemente se encontró que,

diversas proteínas BTB sólo interactúan con Cul3 y no así con los demás integrantes de la familia (Stogios 2005; Furukawa, Borchers y Xiong, 2003; Xu et al., 2003; Canning et al., 2013). Esta característica de unión a proteínas BTB hace que la participación de Cul3 en procesos biológicos sea muy amplia, sin embargo, en los últimos años se ha establecido que el complejo basado en Cul3 está involucrado especialmente en procesos como el ciclo celular y la regulación de la homeostasis redox celular (Andérica-Romero et al., 2013)(Esquema 1).



Esquema 1. El complejo CRL basado en culina 3 participa en diferentes procesos celulares. Las proteínas con dominios BTB interactúan con Cul3 y funcionan como proteínas adaptadoras del sustrato que será ubiquitinado y degradado. En azul, se encuentran algunos ejemplos de las proteínas con dominios BTB que interactúan con Cul3 y los procesos en los que participa; como la homeostasis electrolítica, el estado Redox, el ciclo celular y la función neuronal. BTB: dominio *Bric-a brac /tramtrack/ broad-complex*; Cul3:culina 3; Nedd8:proteína 8 en células precursoras neurales-regulada negativamente durante el desarrollo; RING: proteína con un dominio RING (*really interesting new gene*); u: ubiquitina; E2: enzima de transferencia de ubiquitina; KLHL1: proteína tipo kelch 1; KLHL18: proteína tipo kelch 18; KLHL3: proteína tipo kelch 3; Keap1: proteína 1 asociada al dominio tipo kelch-ECH; Nrf2:factor nuclear eritroide 2-relacionado al factor 2; MEL26: *maternal lethal effect-26 protein*.

1.2.3 Culina 3 y su importancia biológica.

La Cul3 principalmente se asocia a la vía citoprotectora mediada por el factor nuclear eritroide 2-relacionado al factor 2 (Nrf2), que combate el estrés oxidante y electrofílico generado por la exposición a agentes químicos exógenos, endógenos y/o la radiación; para así, mantener la homeostasis redox (Dhakshinamoorthy et al., 2000; Lo y Hannink, 2006; Kobayashi et al., 2004; Motohashi y Yamamoto, 2004).

Numerosos estudios hacen referencia a la importancia de Cul3 en la regulación de la actividad de Nrf2. Se ha demostrado que Cul3 participa en la ubiquitinación de Nrf2 para su degradación vía UPS (Sekhar et al., 2010; Okawa et al., 2006; Wang et al., 2008). Así también, se ha observado que modificaciones en el residuo de Cys151 de la proteína 1 asociada al dominio tipo Kelch-ECH (Keap1 por sus siglas en inglés: *Kelch-like ECH*-associated protein 1*) alteran la unión de Cul3 a Keap1 y, por lo tanto, se evita la ubiquitinación de Nrf2 (Itoh et al., 1999; Furukawa y Xiong, 2005; Egger et al., 2009; Sekhar et al., 2010; Cullinan et al., 2004).

Loignon y colaboradores (2009) observaron que la Cul3 se sobreexpresa en diferentes tipos de cáncer de mama. Esta sobreexpresión está asociada a la sensibilidad de las células cancerosas a agentes quimioterapéuticos y al estrés oxidante, debido a que esta sobreexpresión contribuye a la depleción de los niveles de Nrf2 (Loignon et al., 2009). Por otro lado, el silenciamiento del gen Cul3 aumenta la resistencia de las células cancerosas a agentes quimioterapéuticos y al estrés oxidante (Loignon et al., 2009), por lo que se piensa que lejos de ser sólo una proteína accesoria de un complejo que dirige la degradación de Nrf2 vía UPS, la actividad de Cul3 podría ser, además de Keap1, un factor determinante en la regulación de dicho factor en respuesta al estrés (Kaspar et al., 2009; Singh et al., 2006; Padmanabhan et al., 2006; Kaspar y Jaiswal 2010).

Así también se han encontrado evidencias que resaltan la importancia de Cul3 en el control adecuado de la progresión del ciclo celular. Por ejemplo, a través de la proteína MEL26 (por sus siglas en inglés: *maternal lethal effect-26 protein*) ubiquitina a la proteína MEI-1 (por sus siglas en inglés: *meiosis inhibitor protein 1*); necesaria en la formación del huso mitótico. Cul3 también participa en la degradación de la ciclina E, la cual se une a la cinasa dependiente de ciclina *Cdk2* en la fase G1 del ciclo celular, promoviendo así la expresión de la ciclina A, lo que permite la entrada y progreso de la

fase S. (Luke-Glaser et al., 2005; Kossatz et al., 2010; McEvoy et al., 2007; Pintard et al., 2003; Singer et al., 1999).

Moghe y colaboradores (2012) demostraron en las células HeLa, U2OS y 293T; que la depleción de Cul3 y del miembro número 18 de la familia de proteínas tipo Kelch (KLHL18 por sus siglas en inglés: *Kelch-like family member 18*), causan un retraso en la entrada a la mitosis. Además la sobreexpresión de Cul3 promueve la ubiquitinación de Aurora-A, una cinasa que participa en la maduración de los centrosomas y en la formación del huso mitótico. Así, la Cul3 participa en la regulación de la entrada a mitosis por una vía dependiente de Aurora-A por medio de la interacción con la proteína KLHL18, así como por la activación de la Aurora-A en los centrosomas. Esta regulación es un proceso importante pues se ha demostrado que en algunos tumores existe la desregulación de diversas cinasas mitóticas entre ellas Aurora-A, la cinasa 2 relacionada a NIMA (Nek2 por sus siglas en inglés: *NIMA-related kinase 2*) y la cinasa 1 tipo polo (PLK1 por sus siglas en inglés: *polo-like kinase 1*) (Moghe et al., 2012; Meraldi et al., 2004; Strebhardt et al., 2006; Hayward et al., 2004; Beck et al., 2013).

Además, Cul3 se ha relacionado con el desarrollo de pseudohipoaldosteronismo del tipo II (Síndrome de Gordon/PHAII). En este padecimiento se han identificado mutaciones en el miembro número 3 de la familia tipo Kelch (KLHL3 por sus siglas en inglés: *Kelch-like family member 3*) (Boyden et al., 2012), el cual es una proteína de la familia con dominios BTB-BACK-Kelch, que sirve como un adaptador de sustrato para Cul3. La KLHL3 se expresa en los túbulos distales de la nefrona donde se encuentra involucrada con la regulación de la homeostasis electrolítica y la presión sanguínea (Ji y Privé, 2013).

A partir de la identificación de las mutaciones en la proteína KLHL3 y debido a su interacción con la Cul3, se consideró que Cul3 podría ser una nueva proteína candidata a presentar mutaciones relacionadas con el desarrollo de PHAII. La existencia de estas mutaciones fue corroborada, así como la expresión ubicua de Cul3 en todos los segmentos de la nefrona. Estos resultados sugieren que el complejo formado por KLHL3/ Cul3 es de suma importancia en la regulación de la presión arterial; ya que la proteína KLHL3 se une a la cinasa WNK4 (por sus siglas en inglés: *with no lysine (K) kinase 4*) para su ubiquitinación y degradación mediada por Cul3. La WNK4 participa

en la regulación de la presión arterial a través de varios mecanismos, principalmente porque afecta diferentes transportadores y canales iónicos como el canal ROMK (por sus siglas en inglés: *Renal Outer Medullary Potassium*), el NCC (por sus siglas en inglés: *Na⁺-Cl⁻ cotransporter*) y el ENaC (por sus siglas en inglés: *epithelial sodium channel*); regulando el transporte de sodio (Na⁺), cloruro (Cl⁻) y potasio (K⁺) en la nefrona distal (Ohta et al., 2013; Boyden et al., 2012; Shibata et al., 2013; Andérica-Romero et al., 2014). De esta forma, el estudio del papel de Cul3 en patologías relacionadas con la hipertensión arterial (ej. la enfermedad renal crónica), resulta fundamental y novedoso; además las evidencias mencionadas sugieren a Cul3 como un nuevo blanco terapéutico en este tipo de patologías (Andérica-Romero et al., 2014; Ruilope et al., 2011).

1.3 Proteínas parecidas a ubiquitina.

La complejidad del sistema de ubiquitinación aumenta con la identificación de varias proteínas parecidas a ubiquitina (UBL por sus siglas en inglés: *ubiquitin-like*), incluyendo a la proteína UCRP (por sus siglas en inglés: *ubiquitin cross-reactive protein*), la SUMO1 (por sus siglas en inglés: *small ubiquitin-related modifier 1*), la ISG15 (por sus siglas en inglés: *interferon-stimulated gene 15*) y Nedd8 (por sus siglas en inglés: *Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 8*) (Herrmann et al., 2007). En la Tabla 1 se presentan las funciones de las principales UBL.

1.4 Nedd8 y sus proteínas diana.

La proteína Nedd8 es una proteína de 81 aminoácidos (9 kDa) que presenta una secuencia un 60% de homología con la secuencia de la ubiquitina, incluyendo un residuo de lisina (Lys48) importante para la formación de multímeros (Kamitani et al., 1997; Herrmann et al., 2007). Esta característica coloca a Nedd8 como la proteína de mayor homología a ubiquitina dentro de las proteínas UBL y se clasifica como una UBL del tipo 1, lo que quiere decir que se puede unir covalentemente a otras proteínas como lo hace la ubiquitina.

Tabla 1. Funciones de las principales UBLs (Modificada de Herrmann et al., 2007).

UBL	% de homología a ubiquitina	Funciones
ISG15(UCRP)	29	Regulador positivo de IFN-relacionado a la respuesta inmune, involucrado en crecimiento y diferenciación.
FUB1 (MNSFβ)	37	Regulador negativo de activación leucocitaria y proliferación.
Nedd8	60	Regulador positivo de ligasas E3 por lo que dirige la degradación proteasomal.
FAT10	29-36	Regula la activación del punto de control SAC.
SUMO-1	18	Controla procesos de estabilidad, función y localización proteica. Antagonista de la ubiquitina.
SUMO-2 SUMO-3	16	Regulación de la transcripción y progresión del ciclo celular.

Se ha demostrado que Nedd8 se activa y transfiere a otras proteínas en un proceso análogo al de ubiquitinación y que las proteínas conjugadas a Nedd8 residen predominantemente en el núcleo (Pan et al., 2004; Kamitani et al., 1997).

Hasta ahora se conoce que las culinas son las principales proteínas blanco de Nedd8, y debido a que induce la actividad ligasa de ubiquitina de las CRLs, la nedilación podría ser un evento clave en degradación de proteínas vía ubiquitina-proteosoma (Boh et al., 2011). Así también, recientemente se encontró que Nedd8 regula la actividad y estabiliza a otras proteínas como p53 (Harper 2004), el factor de transcripción E2F1 (Aoki et al., 2013), el factor inducible por hipoxia 1 α (HIF-1 α por sus siglas en inglés: *Hypoxia-Inducible Factor 1 α*) (Ryu et al., 2011) y a la proteína 3 del

gen asociado a cáncer de mama (BCA3 por sus siglas en inglés: *Breast cancer-associated gene 3 protein*) (Gao et al. 2006).

1.4.1 Nedilación de culinas.

El proceso de conjugación de Nedd8 con las diversas culinas, conocido como nedilación y parecido a la ubiquitinación, es un proceso dependiente de ATP. En la nedilación se requiere de tres enzimas diferentes para la unión de Nedd8 a su proteína diana (Kamitani et al., 1997). Al igual que la Ub, Nedd8 es sintetizado como un precursor de 81 aminoácidos, por lo que, Nedd8 es hidrolizado hasta el residuo conservado de glicina (Gly76) por la proteasa NEDP1 (también conocida como DEN1/SEN8); y queda expuesto el motivo de doble glicina que servirá para su unión a la proteína diana (Parry y Estelle 2004; Bosu y Kipreos, 2008).

Después, la Gly76 expuesta en el extremo carboxilo es adenilada en una reacción dependiente de ATP por la enzima E1 (también conocida como NAE o enzima activadora de Nedd8), que es un heterodímero compuesto por las proteínas: APP-BP1 y Uba3 (Pan et al., 2004). Esta adenilación promueve la unión de la Gly76 con la cisteína del centro catalítico de la NAE (Watson et al., 2011; Pan et al., 2004). Posteriormente, la NAE adenila otra molécula de Nedd8 y promueve la formación de un enlace tioléster entre la primera Nedd8 adenilada y la E2 (conocida como Ubc12 o Ube2f). Finalmente, una ligasa E3 con un dominio RING (conocida como Rbx1 y Rbx2) transfiere la Nedd8 de la E2 hasta una lisina conservada (Lys712) de la culina (Pan et al., 2004; Xirodimas, 2008; Kamitani et al., 1997; Watson et al., 2011) (Esquema 2).

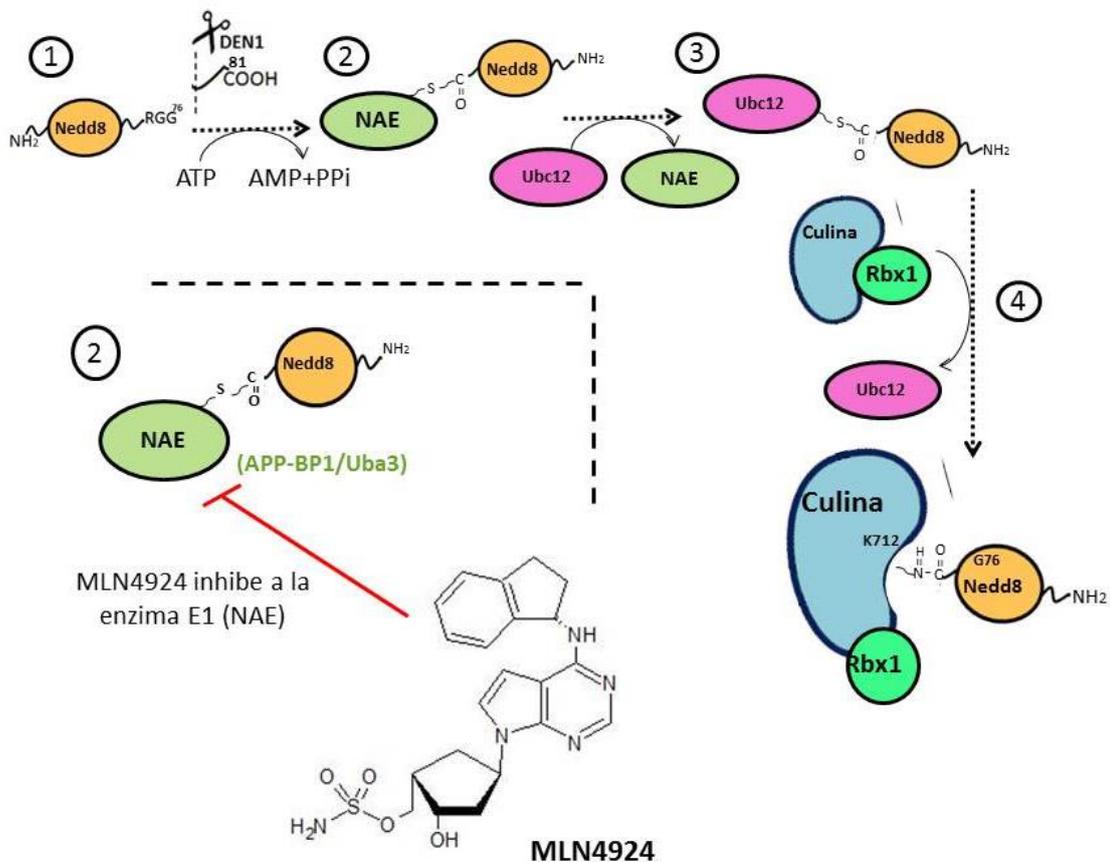
La nedilación de las culinas incrementa la actividad de las CRLs (Duda et al., 2008; Wu, 2005). La unión de Nedd8 a las culinas, promueve por un lado el reclutamiento de la E2 de ubiquitina; y por otro induce un re arreglo conformacional en el dominio *winged-helixB* del carboxilo terminal de la culina y el dominio RING de la E3, permitiendo de esta manera formar una estructura más “dinámica” que promueve la transferencia de la ubiquitina a la proteína diana (Boh et al., 2011).

1.4.2 Inhibidor de la nedilación: MLN4924.

Actualmente existe un inhibidor del proceso de nedilación, el fármaco MLN4924 (Esquema 2). Este inhibidor es un derivado del sulfamato de adenosina y está

relacionado estructuralmente con el AMP requerido para la adenilación de la Gly76 de Nedd8 (Soucy et al., 2009a, 2009b).

Se ha demostrado que el MLN4924 forma un aducto entre Nedd8 y la subunidad catalítica Uba3 de la NAE, lo que impide la adenilación de Nedd8 (Brownell et al., 2010), por lo que, la vía de la nedilación se interrumpe, así como la activación de las culinas y; por consiguiente bloquea la actividad de los complejos CRLs, lo que induce un aumento de los niveles totales de los sustratos directos de las mismas (Brownell et al., 2010; Toth et al., 2012).



Esquema 2. Mecanismo de la nedilación de las culinas. En la nedilación se requiere de tres enzimas diferentes para la unión de Nedd8 a su proteína diana, brevemente: Nedd8 se sintetiza como un precursor (81 a.a) que se procesa hasta el residuo Gly76 (1). Después, la Gly76 se adenila por la enzima E1 (también conocida como NAE) (2). Nedd8 “activado” es transferido de la E1 a una enzima E2 (Ubc12) (3). Y por último, una ligasa E3 (Rbx1) forma un enlace isopeptídico entre el grupo amino del residuo de Lys712 de la proteína diana y la Gly76 de Nedd8 (4). En la imagen también se muestra la estructura del inhibidor MLN4924, que inhibe a la enzima E1 (NAE).

1.4.3 Importancia biológica de Nedd8.

No existen muchas evidencias muy contundentes de la función de Nedd8 en procesos celulares, sin embargo, hasta ahora su importancia biológica reside en su efecto sobre la actividad de las CRLs.

Diversas evidencias sugieren que la Nedd8 está involucrada en la etiopatología de algunas enfermedades neurodegenerativas pues se ha identificado como componente esencial en la formación de inclusiones tanto intracitoplásmicas como intranucleares; incluyendo los cuerpos de Lewy presentes en la enfermedad de Parkinson y en las enfermedades por poliglutamina (Mori et al., 2005; Ferro et al., 2007), así también en inclusiones neuronales y gliales; en la atrofia multisistémica y en los nudos neurofibrilares de la enfermedad de Alzheimer (Chen et al., 2012; Mori et al., 2005).

En los últimos años, también se ha vinculado indirectamente a Nedd8 con procesos oncogénicos, por su asociación con la E3 MDM2 (por sus siglas en inglés: *mouse double minute 2 homolog*) que se encuentra aumentada en diferentes tipos de cáncer humano, lo que promueve una ubiquitinación y degradación de p53 (Watson et al., 2011).

1.5 Especies reactivas de oxígeno y respuesta antioxidante.

Un radical libre es cualquier especie química capaz de existir independientemente y que contiene uno o más electrones desapareados y pueden ser derivados de oxígeno (ERO) o de nitrógeno (ERN) (Halliwell 2006). Las especies reactivas de oxígeno (ERO) incluyen tanto a los radicales de oxígeno como a los no radicales (Tabla 2).

El estrés oxidante es un estado celular que resulta de una condición de desequilibrio entre los sistemas prooxidantes y antioxidantes en la célula, y puede ser generado por el incremento a la exposición de agentes oxidantes, por la disminución de la protección de los sistemas antioxidantes o incluso, por la aparición de ambas condiciones simultáneamente. Como consecuencia de este desbalance se pueden producir alteraciones en biomoléculas como lípidos, proteínas y DNA, lo que puede originar disfunción y muerte celular.

Debido a la exposición continua al estrés oxidante proveniente de varias fuentes, la célula cuenta con mecanismos eficientes para la protección contra metabolitos

reactivos. Este sistema de defensa involucra una importante defensa antioxidante que incluye tanto enzimas antioxidantes como un sistema no enzimático que utiliza antioxidantes de bajo peso molecular que sirven como quelantes o “scavengers” contra diversas ERO (Valko et al., 2006).

Tabla 2. Especies reactivas de oxígeno.

Radicales libres	No radicales
Superóxido, $O_2^{\cdot-}$	Peróxido de hidrógeno, H_2O_2
Hidroxilo, OH^{\cdot}	Ácido hipocloroso, $HOCl$
Hidroperoxilo, HO_2^{\cdot} (superóxido protonado)	Ozono, O_3
Ión carbonato, $CO_3^{\cdot-}$	Singulete, $O_2^1 \Delta g$
Peroxilo, RO_2^{\cdot}	Peróxidos orgánicos, $ROOH$
Alcoxilo, RO^{\cdot}	Peroxinitrito, $ONOO^{\cdot-}$
Radical dióxido de carbono, $CO_2^{\cdot-}$	Peroxinitrato, $O_2NOO^{\cdot-}$
Singulete $O_2^1 \Sigma g^+$	Ácido peroxinitroso, $ONOOH$

Entre los antioxidantes de bajo peso molecular que tiene la célula, se encuentran moléculas neutralizantes como ácido ascórbico, α -tocoferol, glutatión, β -caroteno y ubiquinona, que en conjunto limitan reacciones en cadena de radicales libres, evitando el daño a la membrana y el daño fotosensible (Davies, 2000). Por otra parte, las enzimas con actividad antioxidante también evitan el daño celular provocado por las ERO, algunos ejemplos de estas enzimas son: las superóxido dismutasas (Cu-Zn SOD y Mn SOD), las peroxirredoxinas, la glutatión peroxidasa (GPx), las glutatión S-transferasas (GST), la catalasa (CAT) y la hemo-oxigenasa 1 (HO-1); todas estas reguladas por el factor Nrf2, uno de los principales factores de transcripción involucrados en la respuesta antioxidante (Dhakshinamoorthy et al., 2000).

1.5.1 El factor Nrf2 ante el estrés oxidante: Regulación de su actividad.

El Nrf2 es un miembro de la subfamilia Cap' n' collar (CNC) de los factores de transcripción tipo zipper o cierre de leucinas (bZIP) que se une al sitio de elementos de respuesta antioxidante (ARE por sus siglas en inglés: *antioxidant response element*) de

genes que codifican para enzimas antioxidantes, así como para la rápida inducción y activación de enzimas de la fase II (revisado en Königsberg, 2007). Este factor contiene un dominio regulatorio en su extremo amino (Neh2, el cual contiene 7 residuos de lisina que son dirigidos a ubiquitinación mediante Cul3 por Keap1), un dominio central de transactivación y su dominio bZIP en el extremo carboxilo, que es el responsable tanto para su localización nuclear como para su unión al ADN (Lo y Hannink, 2006).

La vía citoprotectora de Nrf2 contra el estrés oxidante, se ha caracterizado como una de las más importantes para la célula (Dhakshinamoorthy et al., 2000; Lo y Hannink, 2006; Kobayashi et al., 2004) y su regulación hasta ahora ha sido una de las más estudiadas debido a que la actividad de Nrf2 puede ser un buen blanco para tratar diversas patologías.

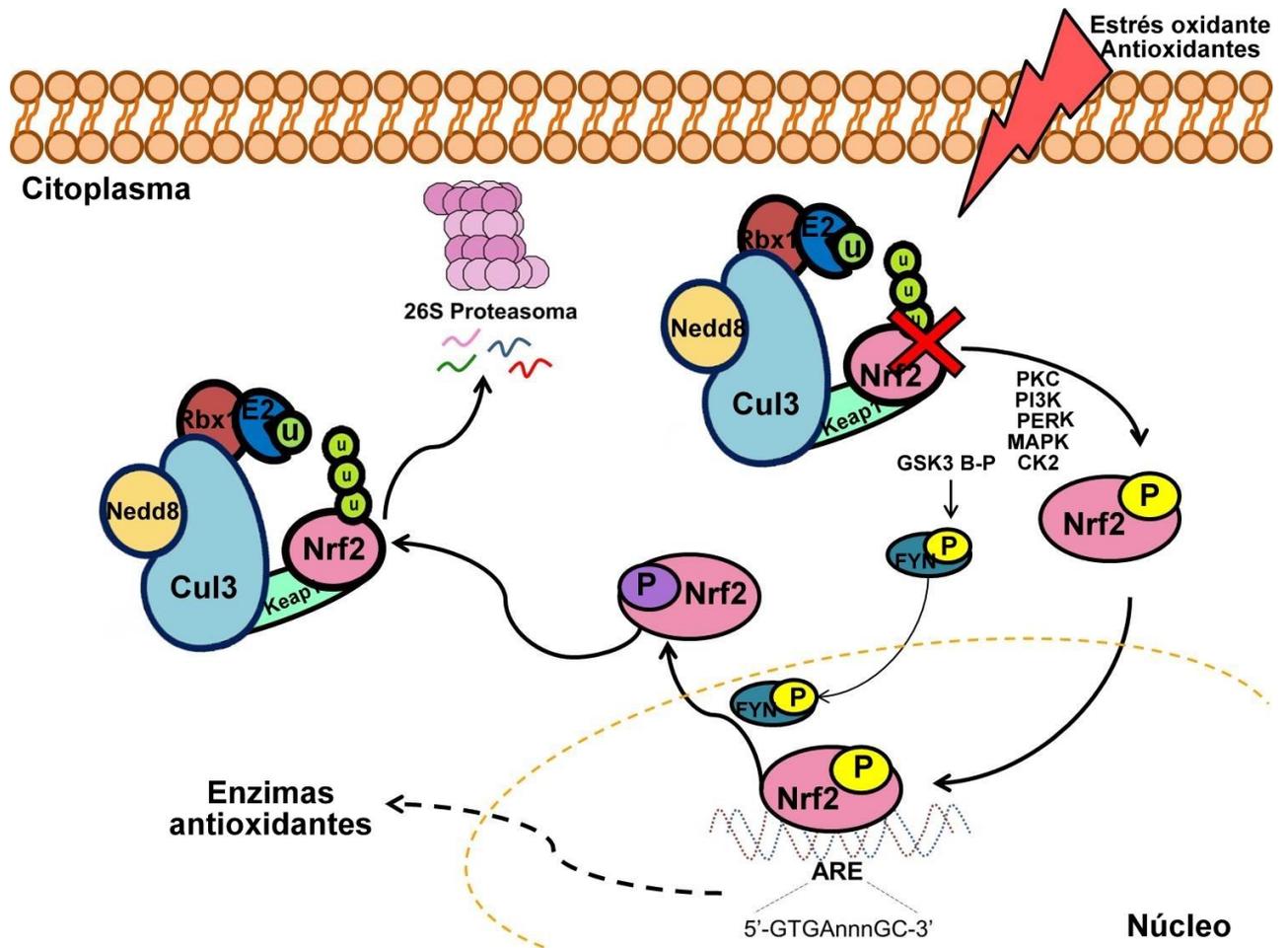
Una de las proteínas reguladoras de Nrf2 más conocidas hasta el momento es la proteína tipo Kelch denominada Keap1 que contiene un dominio BTB en su extremo amino, el cual es de homodimerización y de unión a Cul3 (Motohashi y Yamamoto, 2004; Copple et al., 2008).

En condiciones de homeostasis, el Nrf2 no se encuentra libre y activo todo el tiempo sino únicamente cuando se generan condiciones de estrés oxidante, se plantea que el Nrf2 se mantiene principalmente en el citoplasma unido a la proteína Keap1 y en bajos niveles en el resto de la célula (Königsberg 2007; Stewart et al., 2003; Kaspar et al., 2009; Itoh et al., 1999). Su localización en el citoplasma se debe principalmente a la interacción del dominio Neh2 de Nrf2 con el dominio de repeticiones de doble glicina (DGR por sus siglas en inglés: *doublé glycine repeat*) de Keap1, dominio que está formado por seis repeticiones de doble glicina (Cullian et al., 2004; Lo y Hannink, 2006) (Esquema 3).

La proteína Keap1 tiene dos papeles importantes en la regulación de Nrf2: por un lado forma un complejo con Nrf2, el cual tiene la función de mantener a Nrf2 en el citoplasma a través de un complejo denominado Crm1, que impide la translocación de Nrf2 al núcleo de las células (Eggler, 2009; Copple et al., 2008). Su otra función es servir como un adaptador entre Nrf2 y Cul3 para su ubiquitinación y su posterior degradación dependiente del proteasoma 26S (Kobayashi et al., 2004). Es decir es esencial para la formación del complejo Nrf2-Keap1-Cul3. Se ha propuesto que el dominio IVR de esta metaloproteína funciona como sensor de estrés oxidante, debido a

que contiene residuos de cisteínas que se consideran altamente reactivas, y al reaccionar éstos ante un estímulo de estrés, Keap1 sufre cambios en su estructura lo que reduce su capacidad de retener a Nrf2 (Wakabayashi et al., 2004).

De esta manera, el Nrf2 se disocia del complejo Keap1/Cul3 cuando la célula se expone al estrés oxidante, se estabiliza y se transloca al núcleo. Una vez en el núcleo, el Nrf2 forma un heterodímero con otras proteínas del tipo cierre de leucina básico (bZIP por sus siglas en inglés: *basic zipper*), incluyendo a Jun (c-Jun, JunD y JunB) y proteínas Maf pequeñas (MafG, MafK, MafF) para así unirse a la región ARE y regular la expresión génica de enzimas antioxidantes (Niture et al., 2010; Niture et al., 2014; Niture y Jaiswal, 2009). Después de que Nrf2 cumple su función en el núcleo, se exporta al citoplasma para su degradación vía ubiquitin-proteasoma a través del complejo Keap1/Cul3 (Kaspar y Jaiswal, 2010; Kaspar et al., 2009; Lo y Hannink, 2006) (Esquema 3).



Esquema 3. Modelo de la respuesta antioxidante mediada por Nrf2. En condiciones basales, Nrf2 se encuentra en el citoplasma unido a las proteínas Keap1 y Cul3, las cuales dirigen su ubiquitinación para su degradación vía proteasoma. Ante un estímulo de estrés oxidante o antioxidante Nrf2 se separa de este complejo de ubiquitinación, se estabiliza y se transloca al núcleo, donde se une a la región ARE de los genes que codifican para las enzimas antioxidantes, activando su transcripción. Al terminar la función de Nrf2 dentro del núcleo, éste puede ser fosforilado (Tyr568) por la proteína FYN lo que permite su salida del núcleo para su posterior degradación. *Rbx1*: proteína con dominio RING; *E2*: enzima de transferencia de ubiquitina; *u*: ubiquitina; *Nrf2*: factor nuclear eritroide 2-relacionado al factor 2; *P*: fosforilación; *ARE*: elementos de respuesta antioxidante; *FYN*: proteína tirosina cinasa; *Keap1*: proteína 1 asociada al dominio tipo Kelch-ECH; *Nedd8*: proteína 8 expresada en células precursoras neurales-regulada negativamente en el desarrollo; *Cul3*: culina 3; *PKC*: proteína cinasa C; *PI3K*: fosfoinositol 3 cinasa; *PERK*: proteína cinasa del retículo endoplasmático similar a PKR; *MAPK*: proteína cinasa activada por mitógenos; *CK2*: caseína cinasa II.

1.5.2 Enfermedades neurodegenerativas y estrés oxidante.

Como se mencionó anteriormente el estrés oxidante resulta de una condición de desequilibrio entre la producción de especies oxidantes y los sistemas antioxidantes en el organismo. El cerebro es muy susceptible a los daños provocados por el estrés oxidante. Algunas de las razones por las que el cerebro es propenso al estrés oxidante son: posee niveles muy bajos de defensas antioxidantes, presenta una elevada tasa metabólica derivada de la glucosa, alto consumo de oxígeno para la producción de ATP necesario para la propagación del potencial de acción, la neurosecreción y la transmisión sináptica; contiene altas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados y presenta alta concentración de metales de transición como el Fe^{2+} y el Cu^{2+} que pueden catalizar la formación de radicales libres (Andersen 2004; Peinado et al., 2000).

El estrés oxidante es una característica común de las enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington y la esclerosis lateral amiotrófica (Barnham et al., 2004). En todas estas condiciones existe un incremento de los marcadores de daño oxidante. Por ejemplo, en la enfermedad de Alzheimer y en la enfermedad de Parkinson el 4-hidroxi-2-nonenal (4HNE), un marcador de oxidación de lípidos, está asociado en la pérdida de la función del transportador de glutamato (GLT1) y por lo tanto en la muerte neuronal por excitotoxicidad. Así también, se ha demostrado que en la enfermedad de Alzheimer el 4HNE promueve apoptosis vía el factor de transcripción c-Jun y la proteína p38 (Tamagno et al., 2003).

Además, en la enfermedad de Alzheimer existe un incremento en la oxidación del RNA y peroxidación de lípidos, así como un aumento en la actividad de enzimas antioxidantes incluyendo a la catalasa, la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa (Sultana et al., 2006; Shan y Lin, 2006; Korolainen et al., 2006). En etapas tempranas de la enfermedad de Huntington también existe un incremento en los marcadores de daño oxidante, tales como nitración de proteínas, peroxidación de lípidos y oxidación del ADN. Este aumento en el estrés oxidante se exacerba por la disfunción mitocondrial presente en la enfermedad y potencia la agregación de huntingtina poliglutaminada induciendo la muerte neuronal por apoptosis (Goswami et al., 2006; Stack et al., 2008). Así también, en la enfermedad de Parkinson el estrés oxidante inducido por el cobre, el hierro (II) y el peróxido de hidrogeno promueve la

formación de filamentos y posteriormente agregados de la α -sinucleína (Olanow y Arendash, 1994; Dexter y Jenner, 2013). Se ha demostrado que la forma protofibrilar de la α -sinucleína puede alterar la homeostasis intracelular del calcio provocando apoptosis y que esta neurotoxicidad aumenta en la presencia de ERO y dopamina (Takeda et al., 2006; Jensen et al., 1999).

Las proteínas como el beta amiloide en la enfermedad de Alzheimer, la α -sinucleína en la enfermedad de Parkinson y la superóxido dismutasa 1 en la esclerosis lateral amiotrófica tienen un papel importante en la generación de ERO. Estas proteínas presentan alta afinidad a iones de hierro y cobre que reaccionan con el oxígeno inapropiadamente generando ERO como el peróxido de hidrogeno, que a través de la reacción de Fenton pueden originar otras ERO (Yan et al., 2013; Sayre et al., 2001; Barnham et al., 2004).

Aún no está claro, si el estrés oxidante puede tener un papel causal o ser un fenómeno secundario en el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas, sin embargo, existen evidencias que indican que el estrés oxidante tiene un papel importante en amplificar y propagar el daño que lleva a una degeneración irreversible (Andersen, 2004; Halliwell, 2006). Sin embargo, la activación de la vía de Nrf2 por antioxidantes ha mostrado beneficios en modelos animales de diversos trastornos neurodegenerativos que apoyan el concepto de desarrollo de productos farmacéuticos para activar la vía Nrf2-ARE en el cerebro. Debido a esto y con el objetivo de generar un eventual tratamiento para estas enfermedades, la búsqueda de estrategias para combatir el estrés oxidante presente en enfermedades neurodegenerativas ha avanzado rápidamente en los últimos años.

II. Justificación

Las ligasas de ubiquitina basadas en culinas son un componente esencial para la función del UPS ya que se ha propuesto que de éstas depende la especificidad del sistema. Estas proteínas requieren de la modificación postraducciona por Nedd8 para activarse conocida como nedilación.

La nedilación ha comenzado a emerger como un mecanismo clave para regular diversos procesos celulares, como el ciclo celular y la apoptosis. Hasta el momento, no se ha estudiado este proceso de nedilación en condiciones de estrés oxidante e inhibir la nedilación podría significar un nuevo blanco terapéutico contra el estrés oxidante presente en diversas enfermedades neurodegenerativas; y debido a que la culina 3 está involucrada en la degradación del factor de transcripción Nrf2, en este trabajo se plantea investigar y evidenciar si el uso del inhibidor MLN4924, un inhibidor de la nedilación, puede influir en la respuesta antioxidante mediada por Nrf2.

III. Hipótesis

El inhibidor de la nedisilación MLN4924 aumentará los niveles del factor Nrf2 y con ello, se protegerá del estrés oxidante inducido por peróxido de hidrógeno (H₂O₂) a las neuronas granulares de cerebelo (NGC).

IV. Objetivos y estrategia experimental

2.1 General:

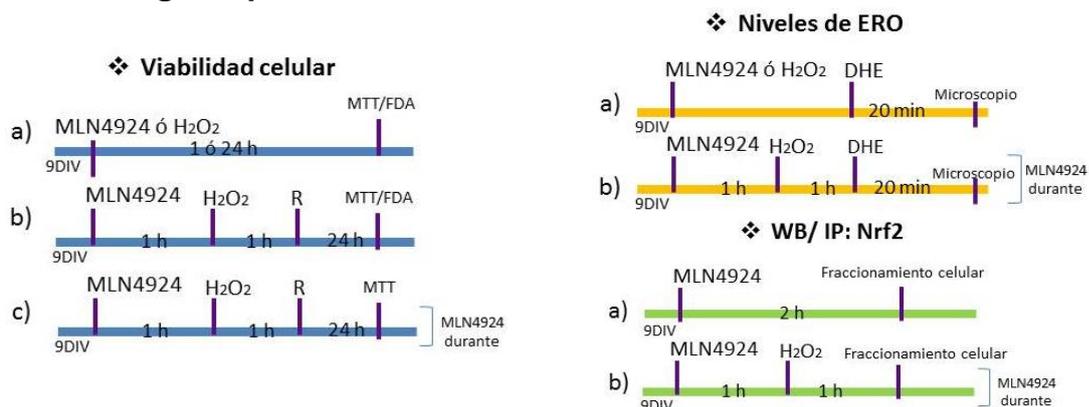
Estudiar el efecto del inhibidor de la nedisilación MLN4924 sobre los niveles de Nrf2 y la disminución de la viabilidad celular inducida por el H₂O₂ en las NGC.

2.2 Particulares:

Evaluar:

- Los posibles cambios en la viabilidad de las NGC tratadas con el inhibidor de la nedisilación MLN4924.
- El efecto del inhibidor de la nedisilación MLN4924 sobre los niveles de ERO en las NGC.
- Si existe citoprotección contra el estrés oxidante inducido por H₂O₂ en las NGC tratadas con el inhibidor de la nedisilación MLN4924.
- Los niveles de Nrf2 en las NGC de ratas tratadas con el inhibidor de la nedisilación MLN4924 en núcleo y citoplasma.

2.3 Estrategia experimental:



Estrategia experimental. Se aislaron neuronas granulares del cerebelo (NGC) de ratas de 7 días de nacidas y se utilizaron después de 9 días *in vitro* (9DIV). Primero se midió la **viabilidad celular** de las NGC: En **a)** las NGC se incubaron con H₂O₂ (1 h) o con el inhibidor MLN4924 (24 h) a diferentes concentraciones, después de este tiempo se retiró el medio con el tratamiento y se dejó un tiempo de recuperación (R) de 24 h, para después realizar los ensayos de 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio (MTT) y de diacetato de fluoresceína (FDA). De este ensayo se eligió la concentración del MLN4924 que se utilizó para los siguientes experimentos. En **b)** las NGC se incubaron con el MLN4924 (330nM, 1 h), pasado el tiempo se quitó el MLN4924 y se agregó el H₂O₂ a diferentes concentraciones, después de este tiempo se retiró el medio con el tratamiento y se dejó un tiempo de recuperación (R) de 24 h, para después realizar los ensayos de MTT y FDA. En **c)** el tratamiento de las NGC fue parecido a b), sin embargo, en este experimento el MLN4924 estuvo presente durante el tratamiento con el H₂O₂.

Después se realizó el ensayo de dihidroetidio (DHE) para medir los **niveles de ERO**. En **a)** las NGC se incubaron con H₂O₂ (1 h, diferentes concentraciones) o con el inhibidor MLN4924 (330nM, diferentes tiempos), después del tratamiento, las NCG se incubaron por 20 min con el DHE y se observaron al microscopio. A partir de estos experimentos se eligió la concentración de H₂O₂ para analizar los niveles de ERO en las NGC tratadas con el MLN4924. En **b)** las NGC se incubaron con el MLN4924 (330nM, 1 h), pasado el tiempo se agregó el H₂O₂ (20 μ M, 1 h), después de este tiempo se retiró el medio con el tratamiento, se incubaron por 20 min con el DHE y se observaron al microscopio.

Para observar el efecto del MLN4924 sobre los niveles de Nrf2, se realizó un ensayo de **inmunoprecipitación (IP) y western blot (WB)**. En **a)** las NGC se incubaron con el MLN4924 (330nM, 2 h), mientras que en **b)** las NGC se incubaron con el MLN4924 (330nM, 2 h), H₂O₂ (20 μ M, 1 h) o MLN4924+ H₂O₂. En el último grupo, las NGC se incubaron con el MLN4924 (330nM, 1 h), pasado el tiempo se agregó el H₂O₂ (20 μ M, 1 h) y el MLN4924 estuvo presente durante el tratamiento con el H₂O₂. Pasado el tiempo se realizó un fraccionamiento celular, seguido de una IP y WB de Nrf2.

5.1 Reactivos

Los reactivos siguientes se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, EUA): tripsina, desoxirribonucleasa I (DNAsal), citosina arabinosa, L-glutamina, glucosa, gentamicina, medio Basal Eagle, poli-L-lisina, imidazol, tween 20, diacetato de fluoresceína (FDA), tris-HCl, tritón X-100, nonidet P-40, tris, dodecil sulfato de sodio (SDS), sacarosa, desoxicolato de sodio y el 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio (MTT). El cloruro de potasio (KCl) se obtuvo de Mallinckrodt Pharmaceuticals (St Louis, MO, EUA). El cloruro de sodio (NaCl), el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el ácido etildiaminotetraacético (EDTA) se obtuvieron de J.T. Baker (St Louis, MO, EUA). El azul de tripano 0.4% y el dihidroetidio (DHE) se obtuvieron de Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA). El inhibidor de tripsina, la penicilina-estreptomomicina, la proteína G-agarosa *fast flow* (#16-266) y el suero fetal bovino (SFB) se obtuvieron de Life Technologies (Gaithersburg, MD, EUA). El inhibidor de la nedilación (MLN4924 no. cat. #A1139), se obtuvo de Active Biochem (Maplewood, NJ, EUA). Los anticuerpos anti-Nrf2 y anti-PCNA (policlonal en conejo) se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EUA).

5.2 Modelo *in vitro*

Los cerebelos de ratas Wistar de 7 días de nacidas se disgregaron con bisturí en cubos de aproximadamente 300 µm. Se incubaron con tripsina 0.25% a 37°C por 10 minutos para disociar el tejido enzimáticamente, posteriormente se agregó una solución con inhibidor de tripsina 0.52% y DNAsa 0.08% para detener la reacción de tripsinización, y se centrifugó para realizar una disgregación mecánica. Una vez terminada la disgregación se hizo un conteo de las células vivas por medio de tinción con azul de tripano en una cámara de Neubauer. Las células se resuspendieron en medio de cultivo (medio basal Eagle, L- glutamina 2 mM, SFB 10%, penicilina 5 U/mL-estreptomomicina y gentamicina 50 µg/mL, KCl 25 mM). Finalmente, se sembraron las células en cajas Costar de 24 pozos o 100 mm tratadas previamente con poli-L-lisina.

El cultivo se mantuvo a 37°C en una atmósfera húmeda de CO₂ al 5% y O₂ al 95% por 24 h y después se adicionó citosina arabinosa a una concentración final de 10 µM para inhibir la proliferación de células no neuronales. Finalmente, 96 h después se agregó glucosa a una concentración final de 5 mM. A los 9 días in vitro (DIV) se utilizaron las células para los diferentes ensayos.

5.3 Determinación de la viabilidad celular

5.3.1 MTT

Este método se basa en la reducción de la sal de tetrazolio MTT a formazán a través de la actividad de las deshidrogenasas (NADH-dependientes) presentes principalmente en las mitocondrias de las células vivas y viables (Berridge et al., 2005; Sumantran, 2011); evidenciando la actividad mitocondrial, por lo que, este método considera como un indicador de viabilidad celular (Berridge y Tan, 1993; Ulukaya et al., 2008). Una solución de MTT se adicionó a los cultivos neuronales (1 mg/mL) después de cada tratamiento (1 h a 37°C), pasado el tiempo el medio de cultivo se eliminó y se agregó isopropanol ácido al 4% para promover la disolución de los cristales de formazán. Se determinó la absorbancia a 570 nm. Los resultados obtenidos se expresaron como porcentaje de MTT reducido, tomando como el 100% al grupo control.

5.3.2 FDA

El diacetato de fluoresceína (FDA) es un compuesto que difunde libremente en las células intactas, donde es hidrolizado a fluoresceína por esterasas no específicas presentes en las células vivas (Battin, 1997; Rotman and Papermaster, 1966). Debido a su polaridad, la fluoresceína se acumula intracelularmente y parece ser un proceso dependiente de la integridad de la membrana celular (Prosperi, 1990). Por lo tanto, esta técnica se considera como indicador de la viabilidad celular. La fluoresceína excitada mediante una longitud de onda adecuada, emite fluorescencia de un color verde brillante. Debido a esto, las neuronas vivas, presentan un color verde brillante en sus cuerpos celulares. Después de cada tratamiento, se aspiró el medio de cultivo y se lavaron las células con PBS frío, después se incubaron a 37°C durante 5 min en PBS con FDA 15 mg/mL. Tras un par de lavados con PBS frío, se examinaron las células al

microscopio de fluorescencia descartando el ruido de fondo en exceso y se cuantificó la intensidad de fluorescencia con los filtros de excitación 485/20nm y emisión 528/20nm. Los resultados obtenidos se expresaron como porcentaje de fluorescencia del FDA, tomando como el 100% al grupo control.

5.4 Determinación de los niveles de ERO

El dihidroetidio (DHE) es un compuesto permeable a las células que puede interactuar con el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) provocando su oxidación a 2-hidroxitetidio (2-OH-E⁺) (Zhao et al., 2003). La reacción es relativamente específica para $O_2^{\cdot-}$ ya que el DHE puede oxidarse por la presencia de otros oxidantes como el radical $\cdot OH$, el $ONOO^-$ y el H_2O_2 , formando principalmente etidio (E⁺) (Zielonka y Kalyanaraman, 2010; Kalyanaraman et al., 2014). Tanto el 2-OH-E⁺ como el E⁺ son fluoróforos que se unen por intercalación al DNA y por su estructura aromática al ser irradiados con la energía adecuada emiten luz en la región UV-VIS (excitación: 480 nm/emisión: 567 nm; excitación: 510 nm/emisión: 600 nm respectivamente) por lo que, se observa una fluorescencia roja brillante en el núcleo (Zhao et al., 2005; Kalyanaraman 2011). Después de cada tratamiento las neuronas contenidas en cajas de 24 pozos, se lavaron con solución Ringer y se agregaron 300 μL de una solución de DHE a una concentración final 10 μM . Después de 20 minutos de incubación a 37°C las células se lavaron con solución Ringer frío y las células se examinaron bajo un microscopio de epifluorescencia utilizando el cubo fluorescente G-2A-excitación 510-560 nm de Nikon Instruments Inc. (Melville, NY, EUA). Se tomaron cinco fotos por pozo de cada condición para hacer la cuantificación de la intensidad de fluorescencia con el programa NIS-Elements BR 3.0.

5.5 Inmunoprecipitación y western blot

Después de los tratamientos las células se lavaron con PBS frío que contenía inhibidores de proteasas y fosfatasa (estuche Active Motif) y se rasparon de las cajas que las contenían agregando 1,000 μL de amortiguador de homogenización (imidazol 3 mM pH 7.4, sacarosa 250 mM e inhibidores de proteasas y fosfatasa). Las células se dejaron reposar 10 minutos en hielo y se pasaron 30 veces por una aguja de 22G en hielo para romper la membrana celular; una vez confirmada la ruptura en el

microscopio, el homogenado se centrifugó a 3,400 rpm por 30 minutos [Microfuge R Beckman rotor F241.5 radio: 50.3 mm (min) - 82.5 mm (máx.)] a 4°C. Se recolectó el sobrenadante (fracción citoplásmica) en un tubo nuevo. El pellet (fracción nuclear) se resuspendió con la solución de lisis RIPA 1X (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, desoxicolato de sodio 0.5%, Nonidet P-40 1%, SDS 0.1% e inhibidores de proteasas) por 2 h en inversión a 4°C. El sobrenadante se lisó con el amortiguador RIPA 5X por 2 h a 4°C. Después de las 2 h el homogenado se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min (rotor F241.5) y se recuperó el sobrenadante.

Para la cuantificación de proteínas totales se utilizó el método de Lowry. Posteriormente se realizó la inmunoprecipitación de Nrf2 de la siguiente manera: se tomaron el equivalente a 1,000 µg de proteína por cada condición y se incubaron por 14 h a 4°C con el anticuerpo anti-Nrf2 (2 µL); después del tiempo de incubación se agregaron 80 µL de proteína G/agarosa reconstituida 1:5 en solución fría TNTE 0.1% (Tris 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, tritón 0.5%, EDTA 1 mM) por 2 h a 4°C. Una vez pasado el tiempo las muestras se centrifugaron a 2,500 rpm (rotor F241.5) por 30 segundos a 4°C y el pellet se lavó 3 veces con solución TNTE 0.1%. Al final las perlas de agarosa se resuspendieron en 20 µL amortiguador de carga Laemli 2X y se hirvieron 3 minutos. Las muestras se separaron mediante electroforesis SDS-PAGE (gel al 7.5%) y se transfirieron a membranas de PVDF (Immobilon-P, Millipore). Las membranas se bloquearon durante 1 h con leche al 5% en TBS con Tween 20 al 1% (TBST). Después, las membranas se incubaron por 14 h a 4°C con anti-Nrf2 (1:1000) y luego de 4 lavados con TBST (10 min c/u) se incubaron durante 1 h con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano, usando una dilución 1:30,000 en TBST; concluido el tiempo se realizaron 6 lavados con TBST (10 min c/u). Se prosiguió con la detección de la banda correspondiente a la proteína de interés por quimioluminiscencia (estuche Immobilon, Millipore), la cual fue captada en filmes BioMax. Los filmes obtenidos se analizaron por densitometría utilizando el programa ImageJ y los datos se expresaron como unidades relativas de densitometría (URD) de la proteína estudiada y comparada respecto al control (-) nuclear o citoplásmico respectivamente.

VI. Resultados

6.1 El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) induce daño celular y aumento en los niveles de ERO

Con el objetivo de generar estrés oxidante en las NGC se utilizó H_2O_2 . El H_2O_2 es una ERO que, debido a su capacidad para difundir a través de las membranas celulares e inducir la formación de radicales libres altamente reactivos, induce estrés oxidante y; daño celular por la oxidación de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Halliwell 1992; Wei et al., 2000). Para evaluar el efecto del H_2O_2 sobre la viabilidad de las NGC, éstas se trataron con diferentes concentraciones de H_2O_2 (grupo control, 5, 10, 12.5, 15, 20, 25 y 50 μM) durante 1 h. En la Figura 1 se presentan imágenes representativas de las NGC a los 9 DIV, en la imagen se pueden observar los cambios morfológicos de las NGC después del tratamiento con H_2O_2 ; se observa una reducción de los somas así como una disminución en la longitud de las neuritas.

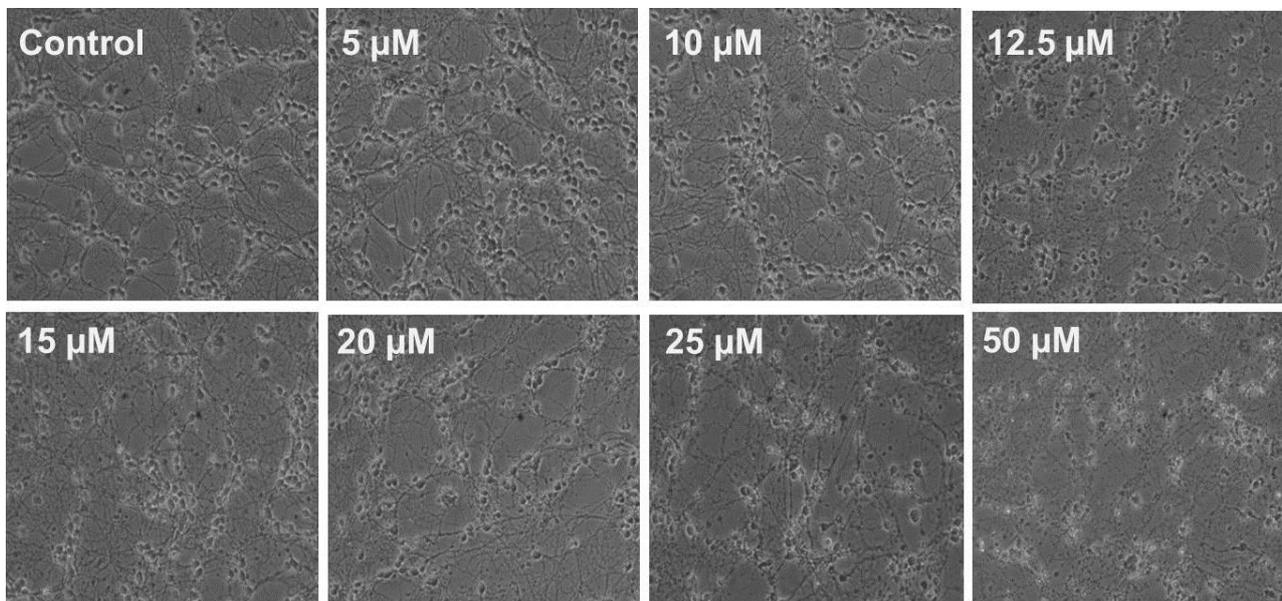


Figura 1. Efecto del H_2O_2 sobre la morfología de las neuronas granulares de cerebelo. Las células se trataron durante 1 h con H_2O_2 a las concentraciones indicadas y las imágenes se obtuvieron 24 h después (40X).

Los cambios morfológicos observados fueron más notables al aumentar la concentración de H_2O_2 . Estos cambios se asociaron a la disminución de la viabilidad observada en el ensayo de MTT (Figura 2), en el cual se observa que la viabilidad celular disminuye significativamente desde 10 μM y disminuye de manera dependiente de la concentración. En esta curva de viabilidad se observa que la viabilidad de las células NGC expuestas durante 1 h a H_2O_2 , se redujo significativamente de manera dosis dependiente (Figura 2) desde la concentración 12.5 μM . La tasa de reducción de MTT disminuyó a 95.70%, 82.88%, 80.08%, 77.66%, 66.11%, 44.62% y 25.30% a 5 μM , 10 μM , 12,5 μM , 15 μM , 20 μM , 25 μM y 50 μM , respectivamente.

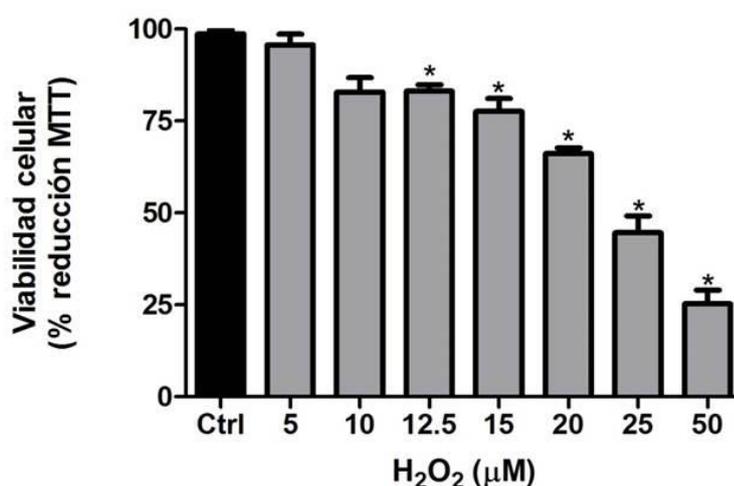


Figura 2. Efecto del H_2O_2 sobre la viabilidad de las NGC. Las NGC fueron tratadas con H_2O_2 a las concentraciones indicadas por 1 h. La viabilidad celular fue determinada por el ensayo de MTT y 24 h después de agregar el H_2O_2 . Los datos se expresan como media \pm DS. * $p < 0.05$ vs control (Ctrl), ANOVA de una vía seguida de un test de Dunnett, $n=3$.

Para establecer si el efecto del H_2O_2 sobre la viabilidad celular estaba asociada con su capacidad para inducir estrés oxidante, se realizó un ensayo de los niveles de ERO. El ensayo fluorescente por DHE (Figura 3) reveló que el H_2O_2 induce la generación de ERO en una manera dependiente de la concentración, lo que se relacionó con la disminución de la viabilidad observada en la Figura 2. En la figura 3A se presentan imágenes representativas de las NGC, en las cuales se observa que existe un aumento en la intensidad de fluorescencia del DHE dependiente de la concentración. En la figura 3B se presentan los datos cuantitativos de este mismo ensayo, se observó que a partir de 15 μM de H_2O_2 aumentaron significativamente los niveles de ERO en las NGC.

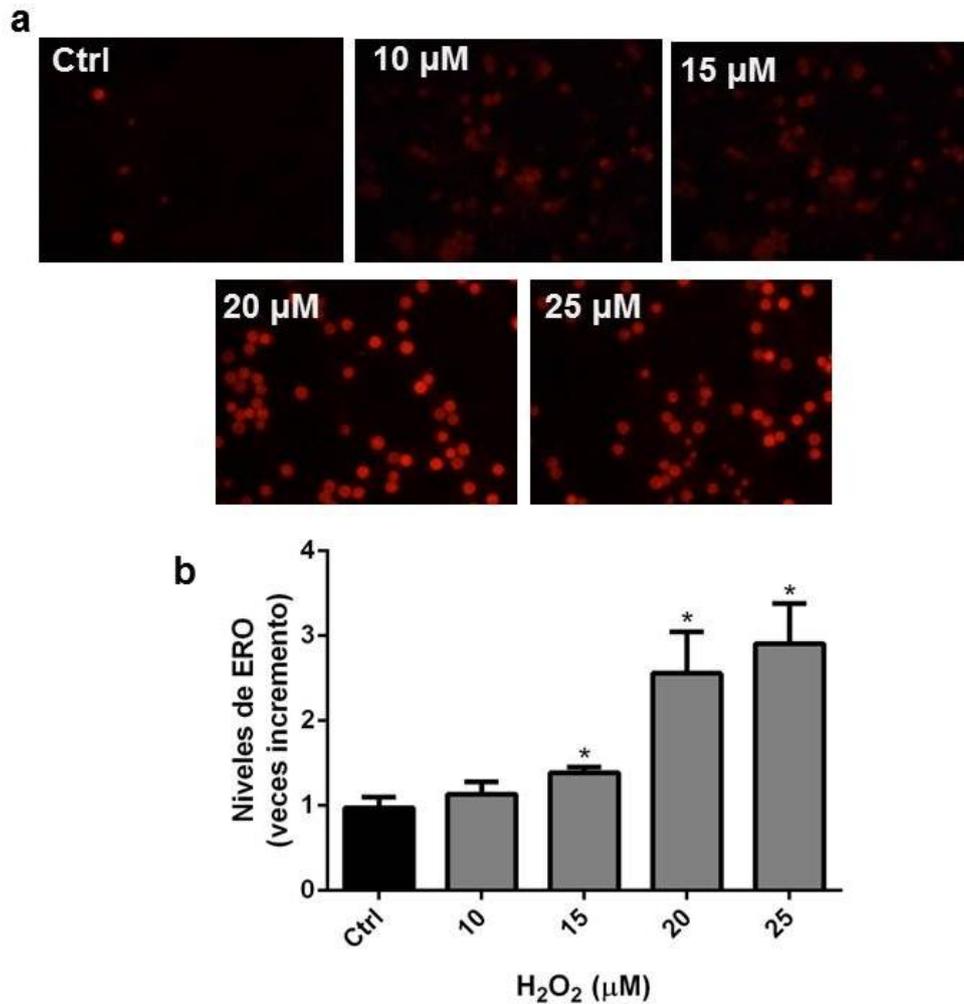


Figura 3. Efecto del H₂O₂ sobre la producción de ERO. (a) Imágenes representativas de la generación de ERO por diferentes concentraciones de H₂O₂ (1 h). (b) Los datos cuantitativos se obtuvieron después del tratamiento con el H₂O₂ (0-25 μM). La intensidad de fluorescencia del etidio se cuantificó utilizando un analizador de imágenes de 5 campos diferentes por pozo por condición, en tres experimentos independientes. Los datos se expresan como media±DS. *p<0.05 vs control (Ctrl), ANOVA de una vía seguida de un test de Dunnett, n=3.

6.2 El MLN4924 induce la producción de ERO en NGC pero no afecta la viabilidad celular.

Se realizaron ensayos para elegir la concentración del inhibidor MLN4924. Estos ensayos fueron imprescindibles ya que este inhibidor se ha utilizado ampliamente en líneas celulares del tipo cancerosas y no se han descrito los efectos en células con fisiología normal, por lo que se consideró relevante determinar el efecto de este inhibidor sobre la viabilidad celular en NGC, empleando un ensayo de MTT. Las NGC se incubaron con diferentes concentraciones de MLN4924 por 24 h, sin embargo, no se presentó una disminución significativa en la viabilidad (Figura 4). Las concentraciones estudiadas se eligieron de acuerdo lo reportado en estudios principalmente dirigidos como terapias contra el cáncer (Soucy et al., 2009a, 2009b). Importantemente estos resultados muestran que bajo estas condiciones el MLN4924 no induce la disminución de la viabilidad como lo hace en células cancerosas.

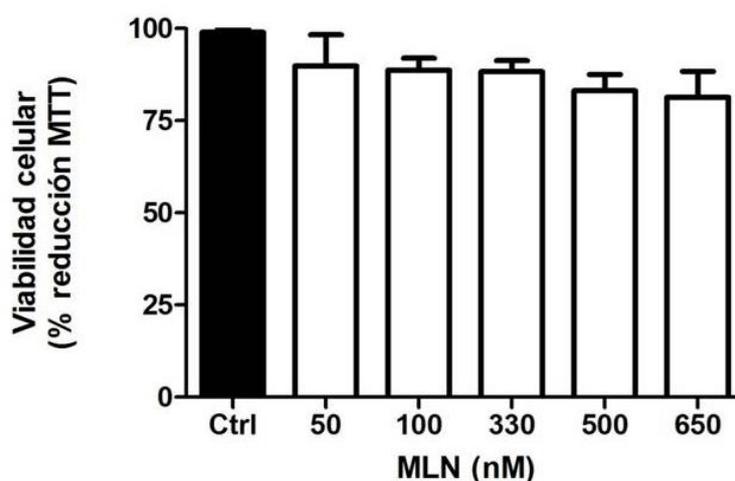


Figura 4. Efecto del MLN4924 (MLN) en la viabilidad de las NGC. Las NGC fueron tratadas con diferentes concentraciones del MLN por 24 h. La viabilidad celular fue determinada después del tratamiento con el MLN. Los datos se expresan como media \pm DS. * $p < 0.05$ vs control (Ctrl), ANOVA de una vía seguida de un test de Dunnett, $n=3$.

Por otro lado, en este trabajo fue importante mostrar el efecto del MLN4924 sobre el estrés oxidante, por lo que las NGC se trataron durante diferentes tiempos con MLN4924 (330 nM). Esta concentración de MLN4924 se eligió con base en experimentos anteriores en los que la nedilación de las culinas se inhibe de manera

eficiente (Soucy et al., 2009a, 2009b, 2010), y no afecta la viabilidad celular de las NGC como se observa en la Figura 4.

Se realizó un ensayo para medir los niveles de ERO y la Figura 5 muestra que interesantemente el inhibidor MLN4924 aumenta la producción de ERO en las NGC de una manera dependiente del tiempo. En la Figura 5a se pueden observar imágenes representativas del ensayo de DHE. La cuantificación de estas imágenes muestran que los niveles de ERO fueron mayores a las 4 h, pero disminuyó a las 6 h (Figura 5b). El mecanismo por el cual el MLN4924 induce la generación de ERO en las NGC deberá ser estudiado con mayor detenimiento.

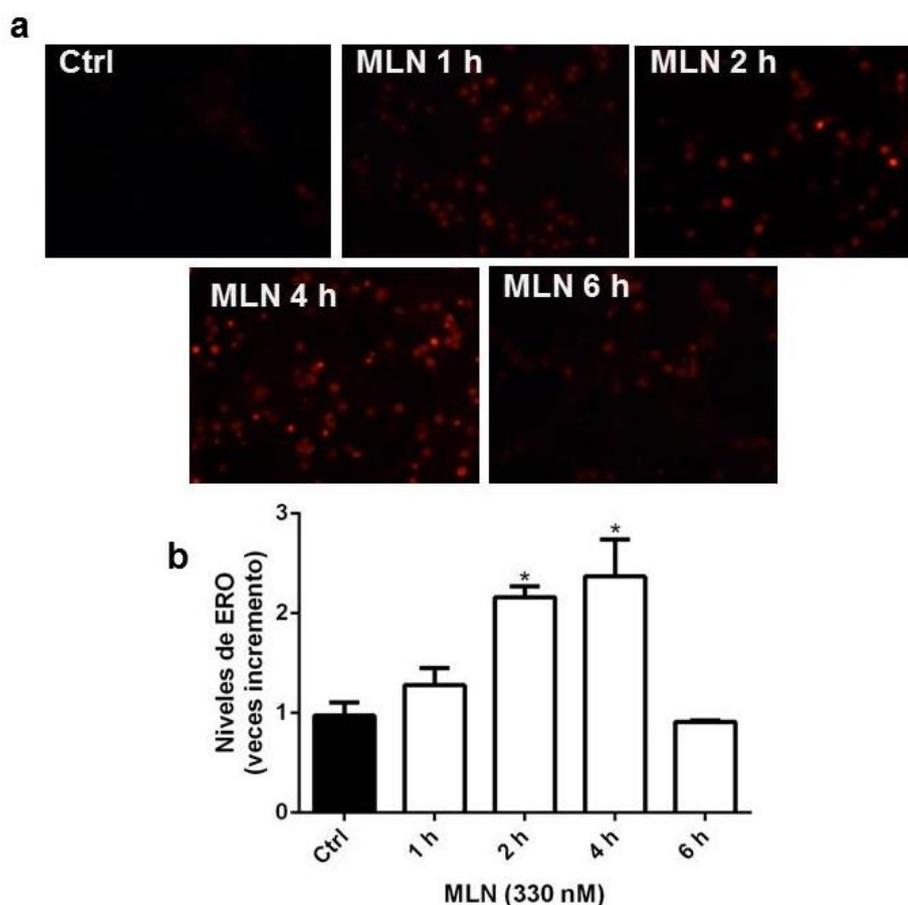


Figura 5. Efecto del MLN4924 (MLN) en la producción de ERO. (a) Imágenes representativas de la generación de ERO por el MLN (330 nM) a diferentes tiempos. (b) Los datos cuantitativos se obtuvieron después del tratamiento con el MLN. La intensidad de fluorescencia del etidio se cuantificó utilizando un analizador de imágenes de 5 campos diferentes por pozo por condición, en tres experimentos independientes. Los datos se expresan como media \pm DS. * $p < 0.05$ vs control (Ctrl), ANOVA de una vía seguida de un test de Dunnett, $n=3$.

6.3 Efecto del inhibidor MLN4924 sobre la disminución de viabilidad celular y el aumento de ERO inducido por H₂O₂.

Una vez analizado el efecto del H₂O₂ y el inhibidor de la nedilación sobre las NGC, se eligieron las concentraciones adecuadas para que en una segunda etapa, se realizaron curvas de viabilidad de las NGC que fueron pre-incubadas con el inhibidor en respuesta al reto tóxico. De esta manera, se examinó si el inhibidor de la nedilación podría prevenir o atenuar la disminución de la viabilidad celular inducida por el H₂O₂. Las NGC se preincubaron durante 1 h con el inhibidor MLN4924 (330 nM).

La Figura 6 muestra el efecto del MLN4924 sobre la disminución de la viabilidad celular de las NGC inducida por el H₂O₂. Las concentraciones de H₂O₂ se encuentran entre 10-25 µM y se eligieron debido a que en la curva de reducción de MTT (Figura 2) disminuye significativamente la viabilidad celular. La viabilidad celular se midió por dos métodos: MTT y FDA. Los resultados de dichos análisis se correlacionaron entre sí (Figura 6a y 6b). Estos análisis revelan que cuando las NGC se exponen durante 1 h a H₂O₂, la tasa de reducción del MTT disminuye a 86.31%, 80.78%, 69.21% y 47.99% con 10 µM, 15 µM, 20 µM y 25 µM respectivamente y; que el MLN4924 atenuó significativamente la disminución de la reducción del MTT inducida por el H₂O₂, ya que la viabilidad fue de 96.88%, 97.18%, 90.04% y 75.23% en NGC tratadas previamente con 330 nM de MLN4924 (Figura 6).

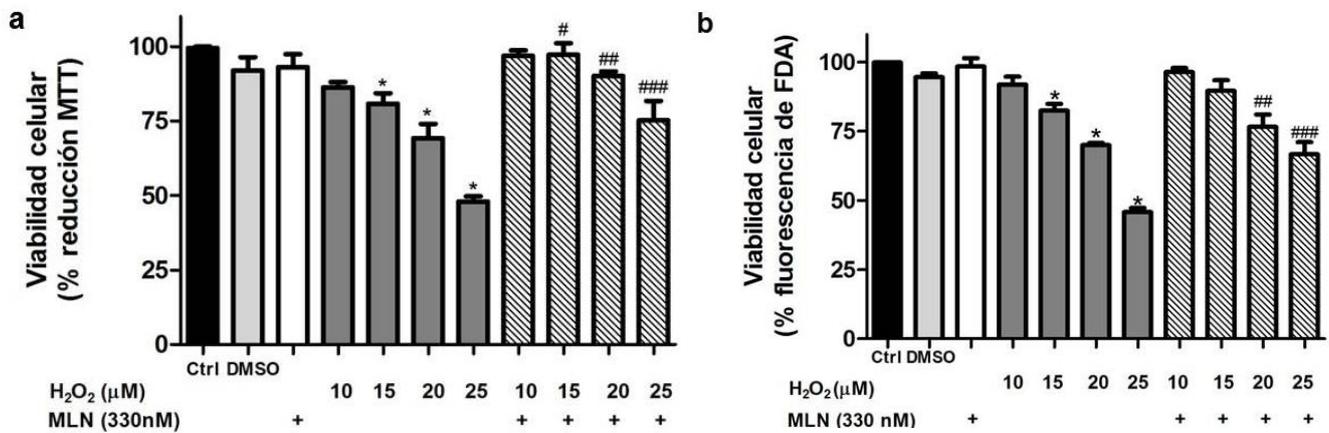


Figura 6. Efecto del pretratamiento con el MLN4924 (MLN) en la disminución de la viabilidad inducida por H₂O₂ evaluada por los ensayos (a) MTT y (b) FDA. Las NGC fueron incubadas con diferentes concentraciones de H₂O₂ (0–25 μM) por 1 h después de la incubación con MLN (330 nM, 1 h), 24 h después se determinó la viabilidad celular. DMSO = dimetilsulfoxido como vehículo para el MLN. Los datos se expresan como media±DS. *p<0.05 vs control (Ctrl), #p<0.05 vs. H₂O₂ (15 μM), ##p<0.05 vs. H₂O₂ (20 μM), ###p<0.05 vs. H₂O₂ (25 μM), ANOVA de una vía seguida de un test de Bonferroni, n=3.

Se evaluó el efecto de la administración del MLN4924 antes y durante la exposición a H₂O₂. En este experimento, la adición de MLN4924 (330 nM) a los cultivos de NGC se realizó 60 min antes y durante (1 h) la exposición a H₂O₂ 10, 15, 20 y 25 μM; observándose una reducción significativa en la disminución de la viabilidad celular inducida por el H₂O₂ (Figura 7a) corroborando lo observado en la Figura 6.

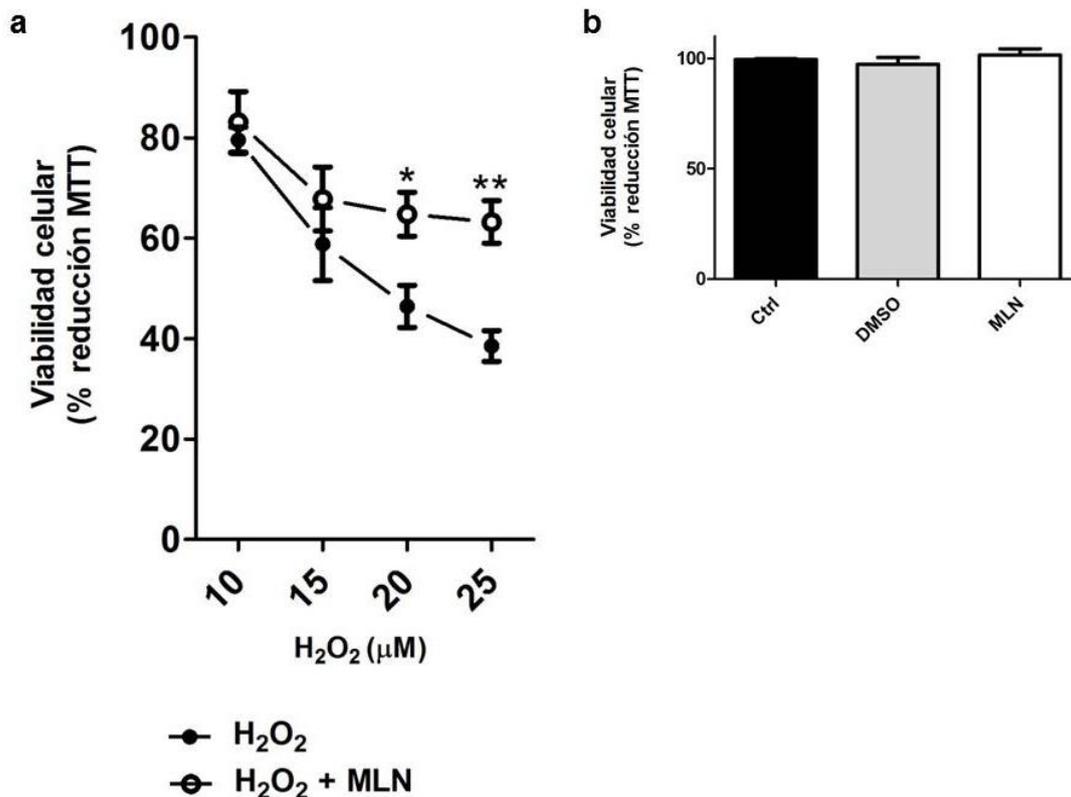


Figura 7. Efecto del tratamiento de las NGC con el MLN4924 (MLN) durante la exposición a H₂O₂. (a) La viabilidad celular se midió por el ensayo de MTT. El H₂O₂ se agregó 1 h después de la incubación con el MLN (330 nM, for 1 h). El MLN estuvo presente durante el tratamiento con el H₂O₂. 24 h después se determinó la viabilidad celular. En el panel (b) se presentan los grupos control (Ctrl). DMSO = dimetilsulfoxido como vehículo para el MLN. Los datos se expresan como media±DS. *p<0.05 vs H₂O₂ (20 μM), **p<0.05 vs H₂O₂ (25 μM), ANOVA de una vía seguida por un test de Bonferroni, n=5.

Cuando las NGC se preincubaron con el MLN4924, el inhibidor disminuyó la generación de ERO inducida por H₂O₂ (Figura 8a y 8b), por lo que el efecto del inhibidor descrito con anterioridad en los ensayos de viabilidad se asociaron a esta disminución en los niveles de ERO. Estos datos demuestran por primera vez, que el inhibidor MLN4924, bajo estas condiciones, puede proteger contra el estrés oxidante en un contexto celular normal, independientemente de su actividad anticancerígena descrita hasta ahora.

Parece contradictorio el efecto protector del inhibidor, ya que los resultados de producción de ERO muestran que el MLN4924 induce un aumento en los niveles de ERO (Figura 5), sin embargo, en NGC preincubadas con el MLN4924 disminuye la generación de ERO inducida por el H₂O₂ (Figura 8). Este efecto debe estudiarse con mayor detalle, ya que en esto podría residir el mecanismo de protección del inhibidor.

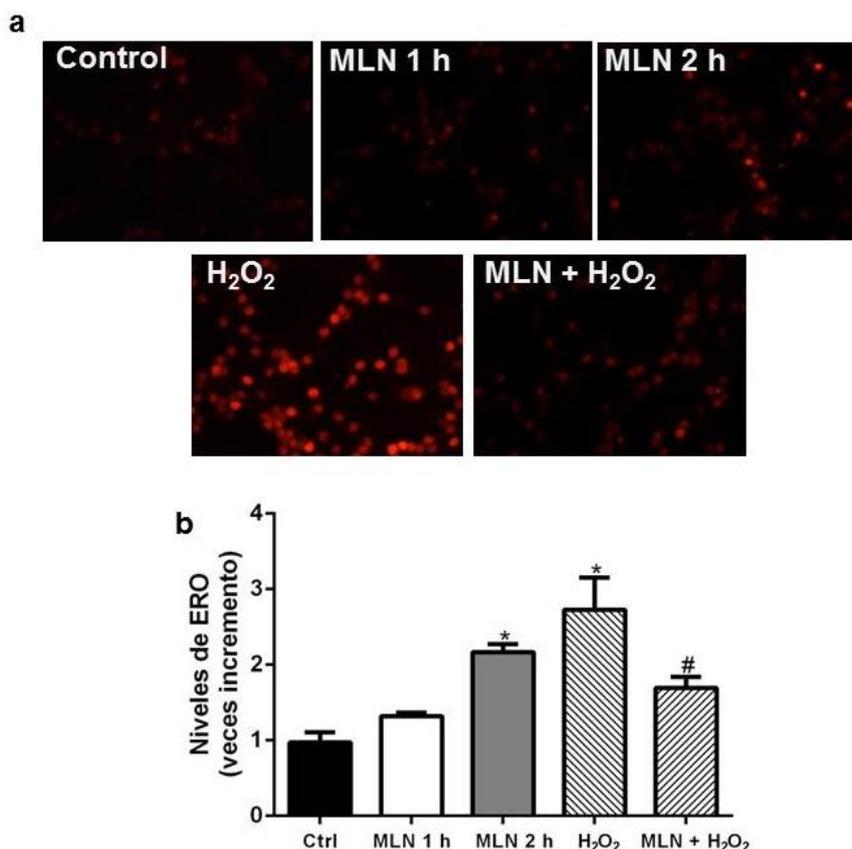


Figura 8. Efecto del MLN4924 (MLN) en la producción de ERO inducida por H₂O₂. (a) Imágenes representativas de los niveles de ERO en células tratadas con H₂O₂ (20 μM, 1 h), MLN (330 nM, 1 h y 2 h) y MLN + H₂O₂. En el grupo MLN + H₂O₂, el H₂O₂ se agregó 1 h después de la incubación con MLN (330 nM for 1 h) y el MLN estuvo presente durante el tratamiento con el H₂O₂. (b) Los datos cuantitativos se obtuvieron al final de cada tratamiento. La intensidad de fluorescencia del etidio se cuantificó utilizando un analizador de imágenes de 5 campos diferentes por pozo por condición, en tres experimentos independientes. Los datos se expresan como media±DS. *p<0.05 vs control (Ctrl), #p<0.05 vs H₂O₂, ANOVA de una vía seguida de un test de Dunnett, n=3.

Para los experimentos siguientes, se empleó la concentración de 330 nM de MLN4924 por 1 h antes y durante (1 h) el estímulo con H₂O₂, para evaluar el efecto de la inhibición de la nedilación sobre el daño neuronal inducido por H₂O₂.

6.4 El MLN4924 aumenta los niveles de Nrf2.

Una vez que se observó que el inhibidor disminuyó la generación de ERO inducida por el H_2O_2 y que atenuó los efectos sobre la viabilidad celular; se evaluó si este efecto estaba relacionado con los niveles de Nrf2 en las NGC, por lo que se realizó fraccionamiento celular de las NGC e inmunoprecipitación seguida de western blot para detectar los niveles de Nrf2 (Figura 9a).

Se realizó un ensayo de IP de Nrf2, con el propósito de aislar y concentrar la proteína de Nrf2, ya que en resultados anteriores el uso de un WB de lisado total no permitía evidenciar los niveles de Nrf2 en NGC. En estos ensayos se observó que el inhibidor MLN4924 aumentó de manera significativa los niveles de Nrf2 tanto en el citoplasma como en el núcleo de las NGC (Figura 9a), incluso cuando las NGC son tratadas con el H_2O_2 . Este resultado sugiere que el aumento de Nrf2 observado en las NGC tratadas con el MLN4924, podría estar implicado en la atenuación de la generación de ERO y en la disminución de la viabilidad la inducida por el H_2O_2 como se observó en los experimentos anteriores.

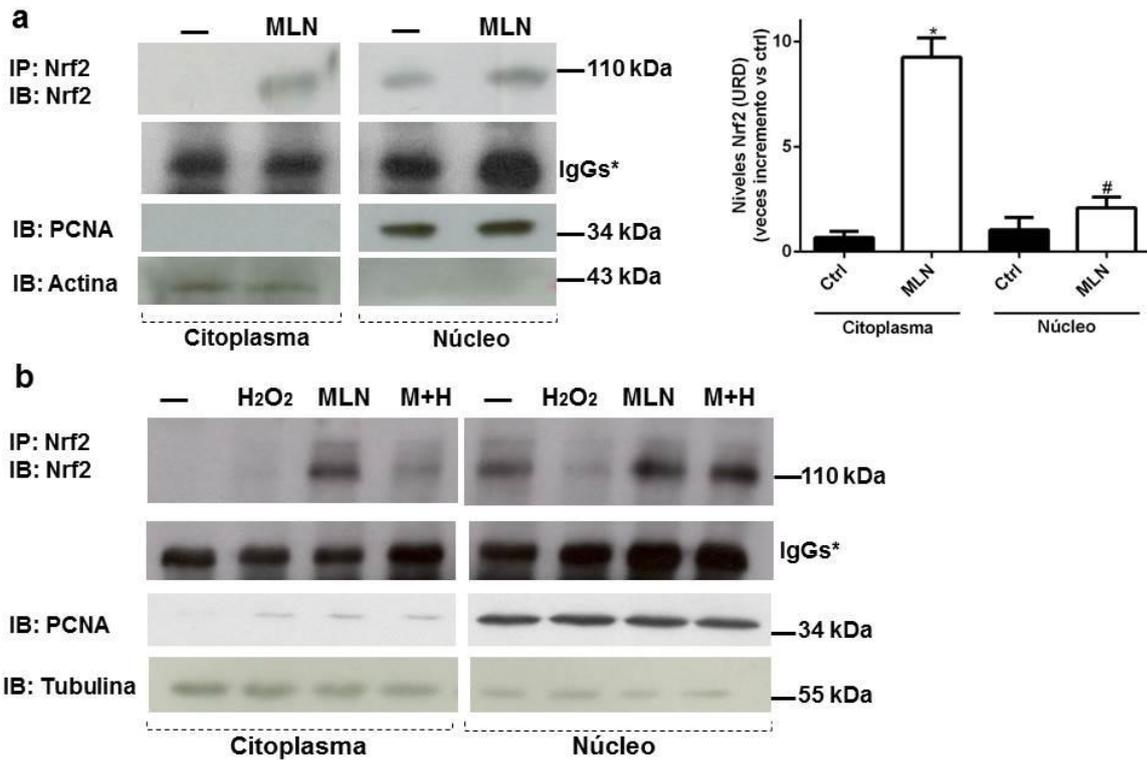


Figura 9. Efecto del tratamiento de las NGC con el MLN4924 (MLN) en los niveles nucleares de Nrf2. (a) Imagen representativa de los niveles de Nrf2 por un ensayo de inmunoprecipitación. Las células fueron tratadas con o sin el MLN (330 nM, 2 h). La gráfica representa el promedio del análisis densitométrico de 3 experimentos independientes. Los datos se expresan como media \pm DS. * $p < 0.05$ vs control citoplasma, # $p < 0.05$ vs control núcleo, test t-student, $n = 5$. URD: unidades relativas de densitometría. (b) Imagen representativa del efecto del H_2O_2 (20 μ M, 1 h), el MLN (330 nM, 2 h) y el grupo MLN+ H_2O_2 (M+H) sobre los niveles de Nrf2. En el grupo M+H, el H_2O_2 se agregó 1 h después de la incubación con MLN (330 nM for 1 h). El MLN estuvo presente durante el tratamiento con el H_2O_2 , $n = 2$.

VII. Discusión

El estrés oxidante es uno de los principales factores que intervienen en el daño y la pérdida neuronal, eventos importantes en los trastornos neurodegenerativos. El H_2O_2 es una ERO que induce estrés oxidante. Varios reportes muestran las consecuencias toxicológicas del tratamiento con H_2O_2 , como la degeneración de las neuritas y la muerte celular (Fukui et al., 2011; Fatokun et al., 2007; Koh et al., 2003). Por esa razón el H_2O_2 representa un modelo interesante para el estudio del estrés oxidante y para investigar los mecanismos de neuroprotección. En el presente estudio se demostró que el H_2O_2 estimula la generación de ERO y que conduce a la muerte celular neuronal (Figuras 2 y 3).

Más allá de sus propiedades antiproliferativas y pro-apoptóticas, curiosamente los inhibidores del proteasoma podrían ser también capaces de ofrecer neuroprotección. La inhibición del proteasoma regula a la alza la expresión de GPx, GST, superóxido dismutasa-1 (SOD-1), hemo oxigenasa-1 (HO-1), induce un aumento en la expresión del ARNm de la subunidad catalítica de la glutamato cisteína ligasa (GCL) e, importantemente, inducen una elevación en la actividad Nrf2 en diferentes modelos (Yamamoto et al., 2007; Sekhar et al., 2000; Meiners et al., 2006; Kraft et al., 2006; Sahni et al., 2008). Sin embargo, los eventos de toxicidad están asociados con la inhibición generalizada de la degradación de proteínas. Con el fin de disminuir el efecto citotóxico de los inhibidores del proteasoma se han buscado moléculas con mayor especificidad, tales como los inhibidores de la nedilación. El inhibidor MLN4924 es el primero de su clase y debido a que inhibe la nedilación de las culinas, el MLN4924 estabiliza una variedad de proteínas diana del proteasoma con más especificidad que los inhibidores clásicos del proteasoma (Soucy et al., 2009a, 2009b, 2010). Aunque este inhibidor se creó inicialmente como un fármaco con potencial antitumoral, el MLN4924 permite la exploración farmacológica de la función de Nedd8 en diversos tipos celulares.

En la mayoría de los estudios sobre la neuroprotección se ha intentado reconocer fármacos con propiedades antioxidantes y con importancia terapéutica, que debido a que inducen cambios en los niveles de las enzimas antioxidantes se ha implicado principalmente, a la vía Keap1/Nrf2/ARE. Sin embargo, en este estudio, investigamos si

la inhibición de la vía de nedilación podría ser una buena estrategia para aumentar los niveles de Nrf2 para proteger de insultos basados en mecanismos de estrés oxidante y del daño celular subsecuente en NGC.

Debido a que el inhibidor MLN4924 se ha utilizado solamente en líneas celulares de cáncer y no se han descrito los efectos sobre la fisiología celular normal, era importante determinar si el inhibidor causaba una reducción en la viabilidad celular de NGC. Por lo tanto, se realizó un ensayo de viabilidad celular con MLN4924 a diferentes concentraciones durante 24 h con el objetivo de conocer los posibles efectos secundarios del inhibidor de la NAE en las NGC. Es importante mencionar que, las concentraciones del inhibidor se escogieron de acuerdo a las ya descritas en terapias contra el cáncer y que son capaces de inhibir eficientemente la nedilación de diversas proteínas blanco de Nedd8. Como se observa en la Figura 2B, cuando las células se trataron con el inhibidor MLN4924 no se presentó una disminución en la viabilidad. Estos resultados son de suma importancia ya que demuestran que concentraciones nano-molares del inhibidor de la nedilación no son capaces de inducir daño *per se* a las NGC. Lo mismo se ha encontrado para los inhibidores del proteasoma, donde concentraciones en el rango micromolar llegan a ser tóxicas para las células, sin embargo no lo son a concentraciones menores (Dreger et al., 2010; Meiners et al., 2006; Sahni et al., 2008), lo que puede residir principalmente en esta modulación de la degradación y acumulación proteica.

Debido a que uno de los mecanismos principales de acción del inhibidor MLN4924 en las células cancerosas es generar apoptosis dependiente de ERO (Swords et al., 2010; Nawrocki et al., 2013), se decidió realizar un ensayo de generación de ERO en las NGC. Interesantemente se encontró que el inhibidor es capaz de generar ERO de manera tiempo dependiente, pero que disminuye drásticamente a las 6 h de tratamiento (Figura 5). Este dato sugiere que el inhibidor, al generar la acumulación de los sustratos de culinas, también genera un cambio redox en la célula, lo que podría inducir una respuesta antioxidante *per se* predisponiendo la respuesta de la célula a un estímulo oxidante. Un hecho aún más interesante es el que se presenta en la Figura 8, en este ensayo de generación de ERO se observa que el inhibidor atenuó significativamente los niveles de ERO producidos por el H₂O₂, sugiriendo que el efecto de protección observado en las Figuras 6 y 7 por parte del inhibidor, tanto en la preincubación como durante el reto tóxico, está relacionado con su capacidad de abatir

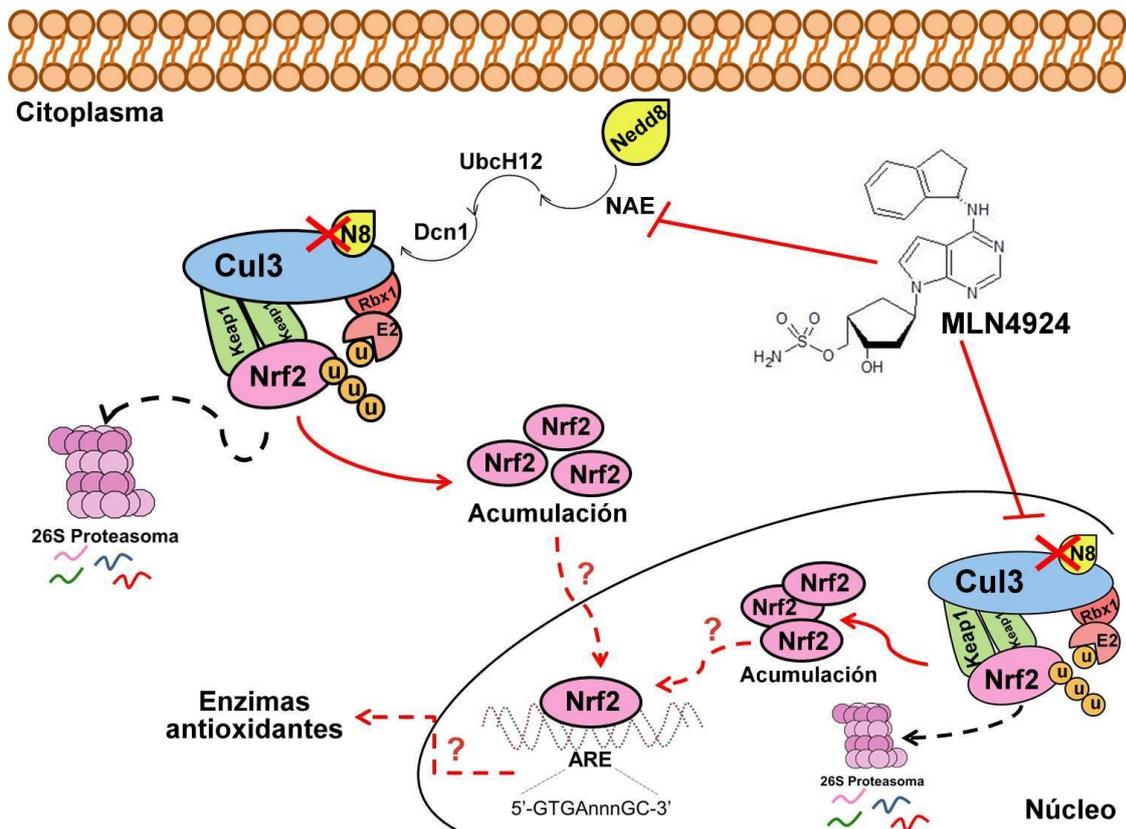
el aumento de ERO. El mecanismo de eliminación de estas ERO no se le atribuye a una acción directa, sin embargo, sí probablemente a la acumulación del factor de transcripción Nrf2, cuyos niveles basales se afectarían al ser blanco directo de Cul3. Un experimento clave para saber si estas ERO generadas por el inhibidor son necesarias para la protección de las NGC del daño por H₂O₂, sería la incubación con un antioxidante directo altamente eficiente para eliminar estas ERO como el ácido ascórbico. Dicho antioxidante no afectaría los niveles basales de Nrf2 y así se determinaría si de esto depende la citoprotección o existe otro mecanismo involucrado, como lo es la estabilidad de Nrf2.

Como se mencionó, una vez analizado el efecto del H₂O₂ cuando las NGC se habían preincubado con el inhibidor de la nedilación, se decidió realizar una curva de viabilidad cuando dicho inhibidor se encontrara presente durante el reto tóxico (Fig. 6). Este experimento se diseñó con el objetivo de evidenciar si se podía alcanzar una mayor protección contra el H₂O₂, de esta forma se eligieron las mismas concentraciones de H₂O₂ (10-25 µM) debido a que en la curva de reducción de MTT (Figura 2A) disminuye significativamente la viabilidad celular. En este ensayo se pudo observar que, efectivamente, el inhibidor MLN4924 presente durante el reto tóxico previene la disminución de la viabilidad provocada por el H₂O₂, sin embargo esta prevención no es mayor que la observada en los experimentos en los cuales el inhibidor sólo se agrega 1 h antes del reto tóxico (pre incubación). No obstante, se decidió trabajar con esta condición (inhibidor MLN4924 durante el reto tóxico), para los experimentos posteriores, con el objetivo de asegurar que el tiempo de incubación y efectividad del inhibidor fuera eficiente.

En este trabajo se decidió investigar cómo se modificaban los niveles de Nrf2 cuando las NGC se trataron con el inhibidor MLN4924. En la Figura 9a se observa que el inhibidor aumenta significativamente los niveles de Nrf2 tanto en núcleo como en citoplasma. Este aumento de Nrf2 podría participar en la citoprotección ante el daño causado por el H₂O₂ (Figuras 6-8). Debido a que la nedilación es un proceso importante para la actividad de las culinas (Boh et al., 2011), y el MLN4924 es un inhibidor de la nedilación, es probable que los sustratos directos de las culinas se afectaran en las NGC; como se ha comprobado en otros modelos (Soucy et al., 2009). Diversas evidencias indican que las neuronas son particularmente sensibles al H₂O₂ (Hoytetal., 1997; Whittemore et al., 1995; Desagher et al., 1996) y en este experimento se observó

interesantemente que en condiciones basales, la localización celular de Nrf2 parece ser principalmente nuclear, y el H₂O₂ disminuye los niveles de Nrf2 en el núcleo de las NGC; tal vez como parte de uno de sus mecanismos de daño celular (Narasimhan et al., 2014; Marinho et al., 2014). Sin embargo, se observó que el MLN4924 aumenta los niveles de Nrf2 en el núcleo de las NGC incluso cuando son tratadas con H₂O₂ (Figura 9b).

En este trabajo se propone que este aumento en los niveles basales de Nrf2 posiblemente se debe a que el MLN4924 evita la nedilación de Cul3; y por lo tanto la ubiquitinación de Nrf2 (Esquema 4). De esta manera, similar a lo que sucede cuando se utilizan inhibidores de proteasoma (Yamamoto et al., 2007; Sekhar et al., 2000; Meiners et al., 2006; Kraft et al., 2006; Sahni et al., 2008), el aumento de Nrf2 inducido por el MLN4924 podría inducir la respuesta antioxidante mediada por Nrf2. Esta hipótesis debe ser comprobada; por un lado, realizando experimentos que permitan analizar la nedilación de la culina 3 y, por otra parte, analizando si el aumento de Nrf2 observado promueve la transcripción de las enzimas antioxidantes y con ello la citoprotección observada contra el H₂O₂. En resumen, con los resultados obtenidos hasta ahora, de este trabajo surgen diversas preguntas encaminadas a responder si: la nedilación podría ser un regulador clave en la respuesta antioxidante y cómo la inhibición de la nedilación podría influir en esta respuesta en condiciones de estrés oxidante.



Esquema 4. Mecanismo propuesto que sugiere cómo el inhibidor de la nedilación promueve el aumento de Nrf2 en NGC. La proteína Nrf2 se degrada vía proteasoma y su ubiquitinación está mediada por la ligasa de ubiquitina culina 3. El MLN4924 al inhibir a la enzima activadora de Nedd8 (NAE) evita la actividad ligasa de las culinas, por lo que, probablemente, en NGC induce un aumento en los niveles de Nrf2. El aumento de Nrf2 en núcleo y citoplasma de NGC sugiere que el MLN4924 inhibe la nedilación de culina 3, proteína involucrada en la ubiquitinación de Nrf2 y por lo tanto en su degradación. Se sugiere que el aumento en los niveles de Nrf2 debido al tratamiento con MLN4924, podrían inducir la actividad de Nrf2 y este evento podría estar relacionado con la protección observada en NGC tratadas con H_2O_2 . De esta manera se propone que Nedd8 y Cul3 podrían significar nuevos blancos contra el estrés oxidante. *Rbx1*: proteína con dominio RING; *E2*: enzima de transferencia de ubiquitina; *u*: ubiquitina; *Nrf2*: factor nuclear eritroide 2-relacionado al factor 2; *ARE*: elementos de respuesta antioxidante; *Keap1*: proteína 1 asociada al dominio tipo Kelch-ECH; *Nedd8*: proteína 8 expresada en células precursoras neurales- regulada negativamente en el desarrollo; *Cul3*: culina 3; *NAE*: enzima activadora de Nedd8 (Uba3/APPBP1); *UbcH12*: enzima de transferencia de Nedd8 (E2); *Dcn1*: enzima ligasa de Nedd8 (E3).

VIII. Conclusión

El tratamiento con el MLN4924 en las NGC, atenuó la disminución de la viabilidad celular y el aumento de las ERO inducido por el H₂O₂. Así también, el MLN4924 aumentó los niveles de Nrf2 tanto en el núcleo como en el citoplasma de las NGC, lo que sugiere la participación de Nrf2 en la citoprotección contra el H₂O₂ de las NGC tratadas con el MLN4924.

IX. Perspectivas

Con el propósito de demostrar si la modulación de la nedilación es una vía importante en la regulación de la actividad de Nrf2, se propone evaluar la localización nuclear de Nrf2 por ensayos de inmunofluorescencia, así como la unión de Nrf2 al DNA (a la región ARE) por un ensayo tipo ELISA (TransAM Nrf2 ELISA kit).

Evaluar por ensayos de inmunoprecipitación, si los niveles de nedilación de Cul3 se afectan con el MLN4924.

Evaluar por ensayos de inmunoprecipitación, si los niveles de nedilación de Cul3 se afectan con el estrés oxidante inducido por H₂O₂, para así proponer un nuevo mecanismo de regulación de Nrf2 ante el estrés oxidante independiente de Keap1.

X.Referencias

- Andérica-Romero AC, Escobar L, Padilla-Flores T, Pedraza-Chaverri J. (2014). Insights in cullin 3/WNK4 and its relationship to blood pressure regulation and electrolyte homeostasis. *CellSignal* 26(6):1166-72.
- Andérica-Romero AC, González-Herrera IG, Santamaría A, Pedraza-Chaverri J. (2013). Cullin 3 as a novel target in diverse pathologies. *Redox Biol* 1(1):366-72.
- Andersen, J.K. (2004). Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nature reviews Neuroscience*. 5: S18-S25.
- Aoki I, Higuchi M, Gotoh Y. (2013). NEDDylation controls the target specificity of E2F1 and apoptosis induction. *Oncogene* 32(34):3954-64.
- Barnham KJ, Masters CL, Bush AI. (2004). Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov* 3(3):205-14.
- Battin T. (1997). Assessment of fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total esterase activity in natural stream sediment biofilms. *Sci Tot Env* 198(1):51–60.
- Beck J, Maerki S, Posch M, Metzger T, Persaud A, Scheel H, Hofmann K, Rotin D, Pedrioli P, Swedlow JR, Peter M, Sumara I. (2013). Ubiquitylation-dependent localization of PLK1 in mitosis. *Nat Cell Biol* 15(4):430-9.
- Bedford L, Lowe J, Dick LR, Mayer RJ, Brownell JE.(2011). Ubiquitin-like protein conjugation and the ubiquitin-proteasome system as drug targets. *Nat Rev Drug Discov* 10(1):29-46.
- Berridge MV, Herst PM, Tan AS. (2005).Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction.*Biotechnol Annu Rev* 11:127-52.
- Berridge MV, Tan AS. (1993). Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys* 303(2):474-82.

Boh BK, Smith PG, Hagen T. (2011). Neddylation-induced conformational control regulates cullin RING ligase activity in vivo. *J Mol Biol* 409(2):136-45.

Borden KL, Freemont PS. (1996). The RING finger domain: a recent example of a sequence-structure family. *Curr Opin Struct Biol* 6(3):395-401.

Bosu DR, Kipreos ET. (2008). Cullin-RING ubiquitin ligases: global regulation and activation cycles. *Cell Div* 3:7-11.

Boyden LM, Choi M, Choate KA, Nelson-Williams CJ, Farhi A, Toka HR, Tikhonova IR, Bjornson R, Mane SM, Colussi G, Lebel M, Gordon RD, Semmekrot BA, Poujol A, Välimäki MJ, De Ferrari ME, Sanjad SA, Gutkin M, Karet FE, Tucci JR, et al. (2012). Mutations in kelch-like 3 and cullin 3 cause hypertension and electrolyte abnormalities. *Nature* 482(7383):98-102.

Brownell JE, Sintchak MD, Gavin JM, Liao H, Bruzzese FJ, Bump NJ, Soucy TA, et al. (2010). Substrate-assisted inhibition of ubiquitin-like protein-activating enzymes: the NEDD8 E1 inhibitor MLN4924 forms a NEDD8-AMP mimetic in situ. *Mol Cell* 37(1):102-11.

Budhidarmo R, Nakatani Y, Day CL. (2012). RINGs hold the key to ubiquitin transfer. *Trends Biochem Sci* 37(2):58-65.

Canning P, Cooper CD, Krojer T, Murray JW, Pike AC, Chaikuad A, Keates T, Thangaratnarajah C, Hojzan V, Ayinampudi V, Marsden BD, Gileadi O, Knapp S, von Delft F, Bullock AN. (2013). Structural basis for Cul3 protein assembly with the BTB-Kelch family of E3 ubiquitin ligases. *J Biol Chem* 288(11):7803-14.

Chen Y, Neve RL, Liu H. (2012). Neddylation dysfunction in Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med* 16(11):2583-91.

Copple IM, Goldring CE, Kitteringham NR, Park BK. (2008). The Nrf2-Keap1 defence pathway: role in protection against drug-induced toxicity. *Toxicology* 246(1):24-33.

Cullinan SB, Gordan JD, Jin J, Harper JW, Diehl JA. (2004). The Keap1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase: oxidative stress sensing by a Cul3-Keap1 ligase. *Mol Cell Biol* 24(19):8477-86.

Davies KJ.(2000). Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life* 50(4-5):279-89.

Desagher S, Glowinski J, Premont J. (1996). Astrocytes protect neurons from hydrogen peroxide toxicity. *J Neurosci* 16(8):2553-62.

Dexter DT, Jenner P. (2013). Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. *Free Radic Biol Med* 62:132-44.

Dhakshinamoorthy S, Long DJ 2nd, Jaiswal AK.(2000). Antioxidant regulation of genes encoding enzymes that detoxify xenobiotics and carcinogens. *Curr Top Cell Regul*36:201-16.

Dreger H, Westphal K, Wilck N, Baumann G, Stangl V, Stangl K, MeinersS.(2010). Protection of vascular cells from oxidative stress by proteasome inhibition depends on Nrf2. *Cardiovasc Res* 85(2):395-403.

Duda DM, Borg LA, Scott DC, Hunt HW, Hammel M, Schulman BA.(2008). Structural insights into NEDD8 activation of cullin-RING ligases: conformational control of conjugation. *Cell* 134(6):995-1006.

Duda DM, Scott DC, Calabrese MF, Zimmerman ES, Zheng N, Schulman BA.(2011). Structural regulation of cullin-RING ubiquitin ligase complexes. *Curr Opin Struct Biol.* 21(2):257-64.

Egglar AL, Small E, Hannink M, Mesecar AD.(2009). Cul3-mediated Nrf2 ubiquitination and antioxidant response element (ARE) activation are dependent on the partial molar volume at position 151 of Keap1. *Biochem J* 422(1):171-80.

Fatokun AA, Stone TW, Smith RA. (2007). Cell death in rat cerebellar granule neurons induced by hydrogen peroxide in vitro: mechanisms and protection by adenosine receptor ligands. *Brain Res* 1132(1):193-202.

Ferro A, Carvalho AL, Teixeira-Castro A, Almeida C, Tomé RJ, Cortes L, Rodrigues AJ, Logarinho E, Sequeiros J, Macedo-Ribeiro S, Maciel P. (2007). NEDD8: a new ataxin-3 interactor. *Biochim Biophys Acta*1773(11):1619-27.

Freemont PS, Hanson IM, Trowsdale J. (1991). A novel cysteine-rich sequence motif. *Cell* 64 (3):483–4.

Fukui K, Takatsu H, Koike T, Urano S. (2011). Hydrogen peroxide induces neurite degeneration: Prevention by tocotrienols. *Free Radic Res* 45(6):681-91.

Furukawa M, He YJ, Borchers C, Xiong Y.(2003). Targeting of protein ubiquitination by BTB-Cullin 3-Roc1 ubiquitin ligases. *Nat Cell Biol* 5(11):1001-7.

Furukawa M, Xiong Y.(2005). BTB protein Keap1 targets antioxidant transcription factor Nrf2 for ubiquitination by the Cullin 3-Roc1 ligase. *Mol Cell Biol* 25(1):162-71.

Gao F, Cheng J, Shi T, Yeh ET.(2006). Neddylation of a breast cancer-associated protein recruits a class III histone deacetylase that represses NFkappaB-dependent transcription. *Nat Cell Biol* 8(10):1171-7.

Goswami A, Dikshit P, Mishra A, Mulherkar S, Nukina N, Jana NR. (2006). Oxidative stress promotes mutant huntingtin aggregation and mutant huntingtin-dependent cell death by mimicking proteasomal malfunction. *Biochem Biophys Res Commun* 342(1):184-90.

Halliwell B. (1992). Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 59(5):1609-23.

Halliwell, B.(2006).Oxidative stress and neurodegeneration:where are we now?. *Journal of Neurochemistry*. 97:1634-1658.

Halliwell B.(2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 141(2):312-22.

Harper JW. (2004). Neddylation of the guardian; Mdm2 catalyzed conjugation of Nedd8 to p53. *Cell* 118(1):2-4.

Hayward DG, Clarke RB, Faragher AJ, Pillai MR, Hagan IM, Fry AM. (2004). The centrosomal kinase Nek2 displays elevated levels of protein expression in human breast cancer. *Cancer Res* 64(20):7370-6.

Herrmann J, Lerman LO, Lerman A. (2007). Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in protein regulation. *Circ Res*. 100(9):1276-91.

Hochstrasser M. (1992). Ubiquitin and intracellular protein degradation. *Curr Opin Cell Biol* 4(6):1024-31.

Hoyt KR, Gallagher AJ, Hastings TG, Reynolds IJ. (1997). Characterization of hydrogen peroxide toxicity in cultured rat forebrain neurons. *Neurochem Res* 22(3):333-40.

Hua Z, Vierstra RD. (2011). The cullin-RING ubiquitin-protein ligases. *Annu Rev Plant Biol* 62:299-334.

Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD, Yamamoto M. (1999). Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev* 13(1):76-86.

Jensen PH, Hager J, Nielsen MS, Hojrup P, Gliemann J, Jakes R. (1999). Alpha-synuclein binds to Tau and stimulates the protein kinase A-catalyzed tau phosphorylation of serine residues 262 and 356. *J Biol Chem* 274:25481-89.

Ji AX, Privé GG. (2013). Crystal structure of KLHL3 in complex with Cullin3. *PLoS One* 8(4):e60445.

Jung T, Catalgol B, Grune T. (2009). The proteasomal system. *Mol Aspects Med* 30(4):191-296.

Kalyanaraman B, Dranka BP, Hardy M, Michalski R, Zielonka J. (2014). HPLC-based monitoring of products formed from hydroethidine-based fluorogenic probes--the ultimate approach for intra- and extracellular superoxide detection. *Biochim Biophys Acta* 1840(2):739-44.

Kalyanaraman B. (2011). Oxidative chemistry of fluorescent dyes: implications in the detection of reactive oxygen and nitrogen species. *Biochem Soc Trans* 39(5):1221-5.

Kamitani T, Kito K, Nguyen HP, Yeh ET. (1997). Characterization of NEDD8, a developmentally down-regulated ubiquitin-like protein. *J Biol Chem* 272(45):28557-62.

Kaspar JW, Jaiswal AK. (2010). An autoregulatory loop between Nrf2 and Cul3-Rbx1 controls their cellular abundance. *J Biol Chem* 285(28):21349-58.

Kaspar JW, Niture SK, Jaiswal AK. (2009). Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 47(9):1304-9.

Kobayashi A, Kang MI, Okawa H, Ohtsuji M, Zenke Y, Chiba T, Igarashi K, Yamamoto M. (2004). Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol Cell Biol* 24(16):7130-9.

Koh SB, Ban JY, Lee BY, Seong YH. (2003). Protective effects of fangchinoline and tetrandrine on hydrogen peroxide-induced oxidative neuronal cell damage in cultured rat cerebellar granule cells. *Planta Med* 69(6):506-12.

Komander D. (2009). The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochem Soc Trans* 37(Pt 5):937-53.

Königsberg Fainstein M (2007). Nrf2: La historia de un nuevo factor de transcripción que responde a estrés oxidativo. *Revista de Educación Bioquímica* 26(1):18-25.

Korolainen MA, Goldsteins G, Nyman TA, Alafuzoff I, Koistinaho J. (2006). Oxidative modification of protein in the frontal cortex of Alzheimer's disease brain. *Neurobiol Aging* 27(1):42-53.

Kossatz U, Breuhahn K, Wolf B, Hardtke-Wolenski M, Wilkens L, Steinemann D, Singer S, Brass F, Kubicka S, Schlegelberger B, Schirmacher P, Manns MP, Singer JD, Malek NP. (2010). The cyclin E regulator cullin 3 prevents mouse hepatic progenitor cells from becoming tumor-initiating cells. *J Clin Invest* 120(11):3820-33.

Kraft DC, Deocaris CC, Wadhwa R, Rattan SI. (2006). Preincubation with the proteasome inhibitor MG-132 enhances proteasome activity via the Nrf2 transcription factor in aging human skin fibroblasts. *Ann N Y Acad Sci* 1067:420-4.

Lim MS, Elenitoba-Johnson KS. (2004). Ubiquitin ligases in malignant lymphoma. *Leuk Lymphoma* 45(7):1329-39.

Lo SC, Hannink M. (2006). CAND1-mediated substrate adaptor recycling is required for efficient repression of Nrf2 by Keap1. *Mol Cell Biol* 26(4):1235-44.

Loignon M, Miao W, Hu L, Bier A, Bismar TA, Scrivens PJ, Mann K, Basik M, Bouchard A, Fiset PO, Batist Z, Batist G. (2009). Cul3 overexpression depletes Nrf2 in breast cancer and is associated with sensitivity to carcinogens, to oxidative stress, and to chemotherapy. *Mol Cancer Ther* 8(8):2432-40.

Luke-Glaser S, Pintard L, Lu C, Mains PE, Peter M.(2005). The BTB protein MEL-26 promotes cytokinesis in *C. elegans* by a CUL-3-independent mechanism. *CurrBiol*15(18):1605-15.

Marín I. (2009). Diversification of the cullin family. *BMC Evol Biol* 9:267.

Marinho HS, Real C, Cyrne L, Soares H, Antunes F. (2014).Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors.*Redox Biol* 23;2:535-62.

McEvoy JD, Kossatz U, Malek N, Singer JD. (2007). Constitutive turnover of cyclin E by Cul3 maintains quiescence. *Mol Cell Biol* 27(10):3651-66.

Meiners S, Ludwig A, Lorenz M, Dreger H, Baumann G, Stangl V, StanglK.(2006). Nontoxic proteasome inhibition activates a protective antioxidant defense response in endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 40(12):2232-41.

Meraldi P, Honda R, Nigg EA.(2004). Aurora kinases link chromosome segregation and cell division to cancer susceptibility. *Curr Opin Genet Dev* 14(1):29-36.

Metzger MB, Hristova VA, Weissman AM.(2012). HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance. *J Cell Sci* 125(Pt 3):531-7.

Miller JR, Moon RT. (1996). Signal transduction through beta-catenin and specification of cell fate during embryogenesis. *Genes Dev* 10(20):2527-39.

Moghe S, Jiang F, Miura Y, Cerny RL, Tsai MY, Furukawa M. (2012). The CUL3-KLHL18 ligase regulates mitotic entry and ubiquitylates Aurora-A. *Biol Open* 1(2):82-91.

Mori F, Nishie M, Piao YS, Kito K, Kamitani T, Takahashi H, Wakabayashi K. (2005). Accumulation of NEDD8 in neuronal and glial inclusions of neurodegenerative disorders. *Neuropathol Appl Neurobiol* 31(1):53-61.

Motohashi H, Yamamoto M. (2004). Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol Med* 10(11):549-57.

Narasimhan M, Riar AK, Rathinam ML, Vedpathak D, Henderson G, Mahimainathan L. (2014). Hydrogen peroxide responsive miR153 targets Nrf2/ARE cytoprotection in paraquat induced dopaminergic neurotoxicity. *Toxicol Lett* 228(3):179-91.

Nawrocki ST, Kelly KR, Smith PG, Espitia CM, Possemato A, Beausoleil SA, Milhollen M, Blakemore S, Thomas M, Berger A, Carew JS. (2013). Disrupting protein NEDDylation with MLN4924 is a novel strategy to target cisplatin resistance in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 19(13):3577-90.

Niture SK, Jaiswal AK.(2009). Prothymosin-alpha mediates nuclear import of the Irf2/Cul3 Rbx1 complex to degrade nuclear Nrf2. *J Biol Chem* 284(20):13856-68.

Niture SK, Kaspar JW, Shen J, Jaiswal AK.(2010). Nrf2 signaling and cell survival. *Toxicol Appl Pharmacol* 244(1):37-42.

Niture SK, Khatri R, Jaiswal AK. (2014). Regulation of Nrf2-an update. *Free Radic Biol Med* 66:36-44.

Ohta A, Schumacher FR, Mehellou Y, Johnson C, Knebel A, Macartney TJ, Wood NT, Alessi DR, Kurz T. (2013). The CUL3-KLHL3 E3 ligase complex mutated in Gordon's hypertension syndrome interacts with and ubiquitylates WNK isoforms: disease-causing mutations in KLHL3 and WNK4 disrupt interaction. *Biochem J* 451(1):111-22.

Okawa H, Motohashi H, Kobayashi A, Aburatani H, Kensler TW, Yamamoto M. (2006). Hepatocyte-specific deletion of the *keap1* gene activates Nrf2 and confers potent resistance against acute drug toxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 339(1):79-88.

Olanow CW, Arendash GW. (1994). Metals and free radicals in neurodegeneration. *Curr Opin Neurol* 7(6):548-58.

Padmanabhan B, Tong KI, Ohta T, Nakamura Y, Scharlock M, Ohtsuji M, Kang MI, Kobayashi A, Yokoyama S, Yamamoto M. (2006). Structural basis for defects of Keap1 activity provoked by its point mutations in lung cancer. *Mol Cell* 21(5):689-700.

Pan ZQ, Kentsis A, Dias DC, Yamoah K, Wu K. (2004). Nedd8 on cullin: building an expressway to protein destruction. *Oncogene* 23(11):1985-97.

Parry G, Estelle M.(2004). Regulation of cullin-based ubiquitin ligases by the Nedd8/RUB ubiquitin-like proteins. *Semin Cell Dev Biol* 15(2):221-9.

Peinado, M.A. et al. (2000). Envejecimiento y neurodegeneración: bases moleculares y celulares. *Rev Neurol* 31 (11):1054-1065.

Peters JM, Franke WW, Kleinschmidt JA. (1994). Distinct 19 S and 20 S subcomplexes of the 26 S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm. *J Biol Chem* 269(10):7709-18.

Petroski MD, Deshaies RJ. (2005). Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(1):9-20.

Pintard L, Willems A, Peter M.(2004). Cullin-based ubiquitin ligases: Cul3-BTB complexes join the family. *EMBO J* 23(8):1681-7.

Pintard L, Willis JH, Willems A, Johnson JL, Srayko M, Kurz T, Glaser S, Mains PE, Tyers M, Bowerman B, Peter M. (2003). The BTB protein MEL-26 is a substrate-specific adaptor of the CUL-3 ubiquitin-ligase. *Nature* 425(6955):311-6.

Prosperi E. (1990). Intracellular turnover of fluorescein diacetate. Influence of membrane ionic gradients on fluorescein efflux. *Histochem J* 22(4):227-33.

Ranganathan S, Bowser R. (2003). Alterations in G(1) to S phase cell-cycle regulators during amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol* 162(3):823-35.

Rotman B, Papermaster B.W. (1966). Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 55(1): 134–141.

Ruilope LM, Bakris GL. (2011). Renal function and target organ damage in hypertension. *Eur Heart J* 32(13):1599-604.

Ryu JH, Li SH, Park HS, Park JW, Lee B, Chun YS.(2011). Hypoxia-inducible factor α subunit stabilization by NEDD8 conjugation is reactive oxygen species-dependent. *J Biol Chem* 286(9):6963-70.

Sahni SK, Rydkina E, Sahni A. (2008). The proteasome inhibitor MG132 induces nuclear translocation of erythroid transcription factor Nrf2 and cyclooxygenase-2 expression in human vascular endothelial cells. *Thromb Res* 122(6):820-5.

Sarikas A, Hartmann T, Pan ZQ. (2011). The cullin protein family. *Genome Biol* 12(4):220.

Sayre LM, Smith MA, Perry G. (2001). Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. *Curr Med Chem* 8:721-38.

Sekhar KR, Rachakonda G, Freeman ML. (2010).Cysteine-based regulation of the CUL3 adaptor protein Keap1. *ToxicolApplPharmacol* 244(1):21-6.

Sekhar KR, Soltaninassab SR, Borrelli MJ, Xu ZQ, Meredith MJ, Domann FE, Freeman ML.(2000). Inhibition of the 26S proteasome induces expression of GLCLC, the catalytic subunit for gamma-glutamylcysteinesynthetase. *Biochem Biophys Res Commun* 270(1):311-7.

Shan X, Lin CL. (2006). Quantification of oxidized RNAs in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 27(5):657-62.

Shibata S, Zhang J, Puthumana J, Stone KL, Lifton RP.(2013). Kelch-like 3 and Cullin 3 regulate electrolyte homeostasis via ubiquitination and degradation of WNK4. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(19):7838-43.

Singer JD, Gurian-West M, Clurman B, Roberts JM. (1999). Cullin-3 targets cyclin E for ubiquitination and controls S phase in mammalian cells. *Genes Dev* 13(18):2375-87.

Singh A, Misra V, Thimmulappa RK, Lee H, Ames S, Hoque MO, Herman JG, Baylín SB, Sidransky D, Gabrielson E, Brock MV, Biswal S. (2006).Dysfunctional KEAP1-NRF2 interaction in non-small-cell lung cancer. *PLoS Med* 3(10):e420.

Soucy TA, Dick LR, Smith PG, Milhollen MA, Brownell JE. (2010). The NEDD8 Conjugation Pathway and Its Relevance in Cancer Biology and Therapy. *Genes Cancer* 1(7):708-16.

Soucy TA, Smith PG, Milhollen MA, Berger AJ, Gavin JM, Adhikari S, Brownell JE, Burke KE, Cardin DP, Critchley S, Cullis CA, Doucette A, Garnsey JJ, Gaulin JL, Gershman RE, Lublinsky AR, McDonald A, et al. (2009b). An inhibitor of NEDD8-activating enzyme as a new approach to treat cancer. *Nature* 458(7239):732-6.

Soucy TA, Smith PG, Rolfe M. (2009a). Targeting NEDD8-activated cullin-RING ligases for the treatment of cancer. *Clin Cancer Res* 15(12):3912-6.

Stack EC, Matson WR, Ferrante RJ. (2008). Evidence of oxidant damage in Huntington's disease: translational strategies using antioxidants. *Ann N Y Acad Sci* 1147:79-92.

Stewart D, Killeen E, Naquin R, Alam S, Alam J.(2003). Degradation of transcription factor Nrf2 via the ubiquitin-proteasome pathway and stabilization by cadmium. *J Biol Chem* 278(4):2396-402.

Stogios PJ, Downs GS, Jauhal JJ, Nandra SK, Privé GG.(2005). Sequence and structural analysis of BTB domain proteins. *Genome Biol* 6(10):R82.

Strebhardt K, Ullrich A.(2006). Targeting polo-like kinase 1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 6(4):321-30.

Sultana R, Perluigi M, Butterfield DA. (2006). Protein oxidation and lipid peroxidation in brain of subjects with Alzheimer's disease: insights into mechanism of neurodegeneration from redox proteomics. *Antioxid Redox Signal* 8(11-12):2021-37.

Sumantran VN. (2011). Cellular chemosensitivity assays: an overview. *Methods Mol Biol* 731:219-36.

Swords RT, Kelly KR, Smith PG, Garnsey JJ, Mahalingam D, Medina E, Oberheuser K, Padmanabhan S, O'Dwyer M, Nawrocki ST, Giles FJ, Carew JS. (2010). Inhibition of NEDD8-activating enzyme: a novel approach for the treatment of acute myeloid leukemia. *Blood* 115(18):3796-800.

Takeda A, Hasegawa T, Matsuzaki-Kobayashi M, Sugeno N, Kikuchi A, Itoyama Y, Furukawa K. (2006). Mechanisms of neuronal death in synucleinopathy. *J Biomed Biotechnol* 2006(3):19365.

Tamagno E, Robino G, Obbili A, Bardini P, Aragno M, Parola M, Danni O. (2003). H₂O₂ and 4-hydroxynonenal mediate amyloid beta-induced neuronal apoptosis by activating JNKs and p38MAPK. *Exp Neurol* 180(2):144-55.

Thompson SJ, Loftus LT, Ashley MD, Meller R.(2008). Ubiquitin-proteasome system as a modulator of cell fate. *Curr Opin Pharmacol* 8(1):90-5.

Toth JI, Yang L, Dahl R, Petroski MD. (2012). A gatekeeper residue for NEDD8-activating enzyme inhibition by MLN4924. *Cell Rep* 1(4):309-16.

Ulrich HD.(2002). Natural substrates of the proteasome and their recognition by the ubiquitin system. *Curr Top Microbiol Immunol* 268:137-74.

Ulukaya E, Ozdikicioglu F, Oral AY, Demirci M. (2008). The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested. *Toxicol In Vitro* 22(1):232-9.

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160(1):1-40.

Wakabayashi N, Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Kang MI, Kobayashi A, Yamamoto M, Kensler TW, Talalay P. (2004). Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(7):2040-5.

Wang W, Bu B, Xie M, Zhang M, Yu Z, Tao D. (2009). Neural cell cycle dysregulation and central nervous system diseases. *Prog Neurobiol* 89(1):1-17.

Wang XJ, Sun Z, Villeneuve NF, Zhang S, Zhao F, Li Y, Chen W, Yi X, Zheng W, Wondrak GT, Wong PK, Zhang DD. (2008). Nrf2 enhances resistance of cancer cells to chemotherapeutic drugs, the dark side of Nrf2. *Carcinogenesis* 29(6):1235-43.

Watson IR, Irwin MS, Ohh M. (2011). NEDD8 pathways in cancer, Sine Quibus Non. *Cancer Cell* 19(2):168-76.

Wei T, Ni Y, Hou J, Chen C, Zhao B, Xin W. (2000). Hydrogen peroxide-induced oxidative damage and apoptosis in cerebellar granule cells: protection by Ginkgobiloba extract. *Pharmacol Res* 41(4):427-33.

Whittemore ER, Loo DT, Watt JA, Cotman CW. (1995). A detailed analysis of hydrogen peroxide-induced cell death in primary neuronal culture. *Neuroscience* 67(4):921-32.

Wong BR, Parlati F, Qu K, Demo S, Pray T, Huang J, Payan DG, Bennett MK. (2003). Drug discovery in the ubiquitin regulatory pathway. *Drug Discov Today* 8(16):746-54.

Wu JT, Lin HC, Hu YC, Chien CT. (2005). Neddylation and deneddylation regulate Cul1 and Cul3 protein accumulation. *Nat Cell Biol* 7(10):1014-20.

Xirodimas DP. (2008). Novel substrates and functions for the ubiquitin-like molecule NEDD8. *Biochem Soc Trans* 36(Pt 5):802-6.

Xu L, Wei Y, Reboul J, Vaglio P, Shin TH, Vidal M, Elledge SJ, Harper JW. (2003). BTB proteins are substrate-specific adaptors in an SCF-like modular ubiquitin ligase containing CUL-3. *Nature* 425(6955):316-21.

Yamamoto N, Sawada H, Izumi Y, Kume T, Katsuki H, Shimohama S, Akaike A. (2007). Proteasome inhibition induces glutathione synthesis and protects cells from oxidative stress: relevance to Parkinson disease. *J Biol Chem* 282(7):4364-72.

Yan MH, Wang X, Zhu X. (2013). Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. *Free Radic Biol Med* 62:90-101.

Yang Y, Mufson EJ, Herrup K. (2003). Neuronal cell death is preceded by cell cycle events at all stages of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 23(7):2557-63.

Zhao H, Joseph J, Fales HM, Sokoloski EA, Levine RL, Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B. (2005). Detection and characterization of the product of hydroethidine and intracellular superoxide by HPLC and limitations of fluorescence. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(16):5727-32.

Zhao H, Kalivendi S, Zhang H, Joseph J, Nithipatikom K, Vásquez-Vivar J, Kalyanaraman B. (2003). Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. *Free Radic Biol Med* 34(11):1359-68.

Zielonka J, Kalyanaraman B (2010). Hydroethidine- and MitoSOX-derived red fluorescence is not a reliable indicator of intracellular superoxide formation: another inconvenient truth. *Free Radic Biol Med* 48(8):983-1001.