

Tesis Doctoral

# Estudio de la eritropoyetina como agente neuroprotector

Pregi, Nicolás

2008

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Pregi, Nicolás. (2008). Estudio de la eritropoyetina como agente neuroprotector. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Pregi, Nicolás. "Estudio de la eritropoyetina como agente neuroprotector". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2008.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

# Estudio de la Eritropoyetina como Agente Neuroprotector

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica

Nicolás Pregi

Directora de Tesis: Alcira Nesse

Lugar de Trabajo: Laboratorio de Fisiología Celular de la Eritropoyetina

Buenos Aires, 2008

# Estudio de la Eritropoyetina como Agente Neuroprotector

## **Resumen**

La eritropoyetina (Epo) es una hormona cuya función más conocida es su participación en el proceso de eritropoyesis, aunque, cada vez adquieren más trascendencia otras funciones. En particular, a través de una acción antiapoptótica, aseguraría la supervivencia para que las células eritroides puedan cumplir con su programa de diferenciación. Una actividad similar cumpliría en otros tejidos. Así, el efecto de Epo a nivel de sistema nervioso central tendría un efecto neurotrófico y neuroprotector, previniendo la muerte de las neuronas ante un estímulo hipóxico o de *shock*.

Aunque el mecanismo por el cual la Epo ejercería el efecto neuroprotector no se conoce con exactitud, han sido implicados distintos mecanismos de activación celular.

En el presente trabajo de tesis buscamos dilucidar algunos de los caminos de señalización de la actividad antiapoptótica atribuida a la Epo. Para ello, se estudió la acción de la hormona en modelos de apoptosis en una línea celular de origen neuronal, así como también algunas de sus potenciales vías de acción, a nivel de procesos que involucran la inactivación de caspasas, la modulación de factores de la familia Bcl-2 y de receptores de muerte y caminos mediados por JAK/STAT y PI3K/Akt.

En este estudio se evaluó, inicialmente, una potencial acción protectora de la Epo en la línea celular SH-SY5Y inducida a diferenciación con staurosporina (STP), sustancia que, además, constituye un potente agente proapoptótico. El pretratamiento de las células con Epo previno el desarrollo de células apoptóticas por mecanismos mediados por la regulación positiva de la expresión de receptores de Epo (REpo) y la inducción de Bcl-X<sub>L</sub>.

La Epo ha sido también postulada como factor antiinflamatorio, ya que existen evidencias que le adjudican un efecto de neutralización de los efectos de algunas citoquinas proinflamatorias. En base a estos hallazgos, y una vez demostrada la acción antiapoptótica de la Epo en nuestro modelo celular, enfocamos la siguiente etapa a describir una potencial acción protectora frente al daño celular inducido por la citoquina proinflamatoria TNF- $\alpha$ . Observamos un efecto proapoptótico de la citoquina con resultados cuali y cuantitativos coincidentes entre la aparición de células apoptóticas, la condensación de cromatina, la degradación del ADN, así como el aumento de la actividad de las caspasas 8 y 3 y la degradación de PARP. La sensibilidad de las células a la acción del TNF- $\alpha$  se encontró relacionada con un aumento de la expresión del receptor 1 de TNF.

Cuando las células fueron incubadas en presencia de Epo previo a la inducción de apoptosis por TNF- $\alpha$ , se observó un efecto protector similar al encontrado en ensayos con STP. La Epo impidió la modulación positiva de los receptores de muerte e inhibió la activación de caspasas por mecanismos que involucran caminos de señalización mediados por JAK/STAT y PI3K, e inducen aumento de Bcl-2 y activación de NF- $\kappa$ B. La activación de este último también fue inducida por acción de TNF- $\alpha$ , aunque este efecto no alcanzó para impedir el efecto proapoptótico de la citoquina.

En conclusión, en el presente trabajo se describen mecanismos relacionados con el efecto antiapoptótico de la Epo frente a la muerte celular programada de células de origen neuronal inducida por STP y por TNF- $\alpha$ . Además, se detectó posible *cross-talk* entre caminos de señalización mediadores de la activación de NF- $\kappa$ B que involucran tanto a receptores de muerte como la activación por Epo/REpo.

Los resultados sugieren que la sensibilidad celular a la apoptosis inducida por receptores de muerte puede ser regulada por diversos factores y que modificaciones del balance llevarían a supervivencia o muerte celular.

El estudio realizado sustenta la capacidad de la Epo en su acción como factor antiinflamatorio, lo que podría marcar un rol muy importante como agente neuroprotector.

### **Palabras claves**

Eritropoyetina - apoptosis – TNF- $\alpha$  - SH-SY5Y - PI3K - NF- $\kappa$ B

# Study of Erythropoietin as a Neuroprotective Agent

## **Summary**

Since apoptosis appears to be related to neurodegenerative processes, neuroprotection has been involved in investigation of therapeutic approaches focused upon pharmacological agents to prevent neuronal programmed cell death. In this regard, erythropoietin (Epo) seems to play a critical role. Initially, the present work was focused on the study of Epo protective effects upon human neuroblastoma SH-SY5Y cells subjected to differentiation by staurosporine. Under this condition, profuse neurite outgrowth due to cell differentiation was associated to programmed cell death induced by staurosporine (STP). A previous treatment with recombinant human Epo prevented apoptosis and this effect proved to be accompanied by an increased expression of the specific receptor for Epo (REpo) and the induction of Bcl-X<sub>L</sub>.

It has been reported that Epo is capable of dealing with cellular inflammation by inhibition of several proinflammatory cytokines. Therefore, it was attractive to investigate the Epo potential antiapoptotic ability in the presence of these cytokines. We looked further into the possibility that cell death would be also triggered by the inflammatory cytokine TNF- $\alpha$ , a potent cytokine that exerts pleiotropic functions related to immunity, inflammation, and apoptosis. We have identified apoptosis as the type of cell death induced by TNF- $\alpha$ . Congruent results were found among qualitative and quantitative data, such as those detecting chromatin condensation and DNA fragmentation, as well as activation of caspases 8 and 3, and PARP degradation.

Similar Epo protective effect as that observed in assays of apoptosis induced by STP was also detected when SH-SY5Y cells were preincubated with Epo before cultured in the presence of TNF- $\alpha$ .

In order to gain further insight into the mechanisms involved in this antiapoptotic effect of Epo, modulation of death receptors and expression of transcription factors have been evaluated. A significant Epo-prevention of the TNFR1 expression upregulation induced by TNF- $\alpha$  coincided with an attenuated deleterious effect of the proinflammatory cytokine. This means that the sensitivity shown by SH-SY5Y cells to TNF- $\alpha$  may be due to the increase in TNFR1 expression after cell incubation with the cytokine. Therefore, at least one mechanism leading to the Epo neuroprotective effect may be related to prevention of the increase in number sites of this receptor. On the other hand, JAK/STAT and PI3K signalling pathways were found to be involved in the Epo protective action on SH-SY5Y cells induced to apoptosis. As regards the regulation of antiapoptotic factors induced by Epo neuroprotection, we detected upregulation of Bcl-2 and nuclear translocation of NF- $\kappa$ B.

It is known that the proinflammatory cytokine TNF plays a key role in a wide variety of physiological processes, and that it is capable of activating two pathways simultaneously, leading to both the induction of apoptosis and the activation of NF- $\kappa$ B. We found increased nuclear localization of NF- $\kappa$ B not only due to cell activation by Epo but also caused by the presence of TNF- $\alpha$ . Moreover, additive nuclear levels of NF- $\kappa$ B were observed when cell cultures were developed in the presence of both

factors, Epo and TNF- $\alpha$ . Nevertheless, the protective effect of NF- $\kappa$ B was not enough to impede the TNF- $\alpha$ -induced apoptosis of the SH-SY5Y cell line.

In conclusion, we have described mechanisms related to the antiapoptotic effect of Epo against STP- and TNF- $\alpha$ -induced cell death as well as cross-talk between death receptor and Epo/EpoR signalling pathways. The results let us suggest that cell sensitivity to death receptor-induced apoptosis can be regulated by several factors and their balance might decide between survival and death of the cell. That is why, in our experimental design, the incubation of SH-SY5Y cells with TNF- $\alpha$  leads to apoptosis in spite of the cytokine ability to induce NF- $\kappa$ B nuclear translocation. The high expression of TNF receptor 1 and the lack of contribution of the Bcl-2 family members may explain cell sensitivity to TNF- $\alpha$ . On the other hand, cell activation by Epo becomes resistant to cell death through mechanisms that prevent upregulation of death receptors, block caspase activation and induce high expression of protective factors, such as Bcl-2 and NF- $\kappa$ B.

This study underlined the Epo capacity as an anti-inflammatory factor which may play a significant role in stimulating neuroprotection.

### **Keywords**

Erythropoietin - apoptosis – TNF- $\alpha$  - SH-SY5Y - PI3K - NF- $\kappa$ B

A *Andre*, mi cómplice, mi alegría, mi amor, quien siempre  
me acompaña en todas las cosas que hago.

A *Larita*, el solcito de mi vida que me da fuerzas para mover montañas.

*Las amo a las dos.*

*"Las revoluciones científicas más importantes todas incluyen, como  
única característica en común, el destronamiento de la arrogancia  
humana de un pedestal tras otro de convicciones previas sobre  
nuestro lugar en el centro del Cosmos".*

*Stephen Jay Gould*



## *Agradecimientos*

A *Alcira*, quien me permitió ser parte del laboratorio. Por brindarme su entera confianza, por enseñarme con su integridad.

A *Cali*, quien me guió. Por enseñarme que hacer ciencia no es sólo realizar un experimento.

A *Daniela*, *Gladys* y *Mariana*, mis compañeras del labo, con quienes compartí las buenas y las malas, y los cafecitos de cada día.

Todas *Ellas* hicieron posible esta tesis.

A *Shirley*, *Dai* y *Maru* por la buena onda y todo lo que ellas me han enseñado y ayudado.

A *Mario*, *Lu* y *Vale* por compartir esos buenos momentos, además de algunos ricos mates.

A toda mi familia, *mis viejos*, a *Alda*, a *Vir*, y a *Lu*, *mis abuelitos* y *mi tío*, por haber forjado la persona que soy.

A *Roberto*, *Ana* y *Mariana*, por toda la confianza que depositaron en mí y por toda la ayuda que me han dado todo este tiempo.

Finalmente agradezco a todas las personas que intervinieron de alguna manera en la realización de este trabajo, ya sea con su aporte científico o, simplemente, y lo más importante, con sus enseñanzas y ejemplos.

Agradezco al Departamento de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires y a CONICET por permitir llevar a cabo mi trabajo de investigación.

*Niço Pregi*

## **Abreviaturas**

**AcDEVD-pNA** - Acetil-Asp-Glu-Val-Asp-p-nitroanilida  
**AIF** - Factor inductor de apoptosis.  
**Apaf-1** - Factor activador de apoptosis-1.  
**ATCC** - American Type Culture Collection  
**Bad** - Promotor de muerte asociado a Bcl-X<sub>L</sub>/Bcl-2.  
**Bak** - Bcl-2 antagonista/killer.  
**Bax** - Proteína x asociada a Bcl-2.  
**Bcl-2** - Célula B del linfoma 2, del inglés *B-cell lymphoma 2*.  
**Bcl-X<sub>L</sub>** - Forma larga del Bcl-X, anti-apoptótico.  
**Bid** - Dominio de muerte para la interacción BH3, del inglés *BH-3 Interacting Domain Death*.  
**Bik** - Del inglés *Bcl-2 interacting killer*.  
**BrEt** - Bromuro de etidio.  
**BSA** -Albumina sérica bovina.  
**DD** - Dominio de muerte (*Death Domain*).  
**DED** - Dominio efector de muerte (*Death Effector Domain*).  
**DEPC** – dietil-piromcarbonato  
**DMSO** - Dimetil sulfóxido  
**dNTPs** - Desoxinucleótido trifosfato.  
**DTT** - Ditioneitol.  
**ECL** - Sustrato quimioluminiscente  
**EDTA** - Ácido etilén diaminotetraacético.  
**EGTA** - Acido etilenoglicol-bi-(-aminoetiléter)-N,N-tetraacético  
**EMEM** - "Earle's Salts Modified Eagle Medium"  
**FADD** - Dominio de muerte asociado a Fas.  
**FAS** - CD95/APO-1. Miembro de la familia de receptores TNF- $\alpha$  .  
**FLIP/FLICE** - Proteína inhibidora de FLICE/proteína ICE similar a caspasa 8.  
**GAPDH** - Gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenasa  
**Hoechst N°33258** - Trihidroclorhidrato de (2'-[4-Hidroxifenil]-5-[4-metil-1-pipetrazinil]-2,5'-bi-1H benzimidazol)  
**IAP** - Proteína inhibidora de apoptosis.  
**ICE** - Proteína convertora de interleuquina.  
**IP** - Ioduro de propidio.  
**I $\kappa$ B**- Inhibidor del Factor nuclear  $\kappa$ B  
**MAPK** -Quinasas de proteínas activadas por mitógenos.  
**MTT** - Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, sal de tetrazolio.  
**NF- $\kappa$ B** - Factor nuclear del locus kappa de las inmunoglobulinas en células B.  
**NO** - Óxido nítrico.  
**NOS** - Óxido nítrico sintasa.  
**PARP** - Poly-ADP-Ribose-Polymerase.  
**PBS** - *Buffer* salino fosfato.  
**PCR** - Reacción en cadena de la polimerasa.  
**PI3K** – Fosfatidilinositol-3-quinasa.  
**PKC** - Proteína Quinasa C.  
**PMSF** -Fluoruro fenilmetilsulfónico.  
**SDS** - Dodecil Sulfato Sódico.  
**SFB** - Suero fetal bovino  
**STAT5** - *Signal transducer and activator of transcription 5*  
**STP** - Staurosporina  
**TBS** - Buffer Tris salino  
**TBS-T** - Buffer Tris salino Tween  
**TNFR** - Receptor del factor de necrosis tumoral.  
**TRADD** - Proteína con dominio de muerte asociada a TNFR1.  
**TRAF** - Factor asociado al receptor TNF.

## Índice

<b>RESUMEN .....</b>	<b>I</b>
<b>PALABRAS CLAVES .....</b>	<b>II</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>III</b>
<b>KEYWORDS .....</b>	<b>IV</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>- 8 -</b>
<b>ÍNDICE .....</b>	<b>- 9 -</b>
<b><u>INTRODUCCION</u> .....</b>	<b>- 12 -</b>
<b>Eritropoyetina .....</b>	<b>- 13 -</b>
<b>Historia de la eritropoyetina .....</b>	<b>- 13 -</b>
<b>Características estructurales de la eritropoyetina .....</b>	<b>- 14 -</b>
<b>Biosíntesis de la eritropoyetina.....</b>	<b>- 15 -</b>
<b>Función de la eritropoyetina .....</b>	<b>- 16 -</b>
<b>Receptor de eritropoyetina .....</b>	<b>- 17 -</b>
<b>La familia de receptores de tirosina-quinasa .....</b>	<b>- 18 -</b>
<b>Estructura y función de las Janus quinasa. ....</b>	<b>- 18 -</b>
<b>Mecanismo de activación de la vía JAK-STAT .....</b>	<b>- 19 -</b>
<b>Estructura y función de las STATs.....</b>	<b>- 20 -</b>
<b>Señalización celular a través de las proteína-quinasa .....</b>	<b>- 21 -</b>
<b>La vía PI3K/PKB.....</b>	<b>- 21 -</b>
<b>Muerte celular .....</b>	<b>- 22 -</b>
<b>El fenómeno de apoptosis .....</b>	<b>- 23 -</b>
<b>Mecanismos de inducción de apoptosis .....</b>	<b>- 24 -</b>
Vía intrínseca .....	- 24 -
Vía extrínseca .....	- 25 -
<b>Participación de caspasas .....</b>	<b>- 26 -</b>
<b>Participación de factores de la familia Bcl-2.....</b>	<b>- 27 -</b>
<b>Inductores de apoptosis.....</b>	<b>- 28 -</b>
<b>Evidencias de la acción antiapoptótica de la eritropoyetina en el sistema nervioso .....</b>	<b>- 29 -</b>
<b>Procesos inflamatorios.....</b>	<b>- 30 -</b>
<b>Citoquinas .....</b>	<b>- 31 -</b>
<b>Factor de necrosis tumoral.....</b>	<b>- 31 -</b>
<b>Receptores de TNF-<math>\alpha</math> .....</b>	<b>- 33 -</b>
<b>Interferencia de la acción de eritropoyetina por mecanismos inflamatorios .....</b>	<b>- 34 -</b>
Acción de citoquinas proinflamatorias sobre los mecanismos mediados por eritropoyetina .....	- 34 -
Interacción de citoquinas proinflamatorias y eritropoyetina en el sistema nervioso .....	- 35 -
<b>Uso terapéutico de la eritropoyetina.....</b>	<b>- 35 -</b>

<b>Neuroprotección</b> .....	<b>- 37 -</b>
<b>Eritropoyetina recombinante y sistema nervioso central</b> .....	<b>- 37 -</b>
<b><u>OBJETIVOS</u></b> .....	<b>- 39 -</b>
<b><u>MATERIALES</u></b> .....	<b>- 42 -</b>
<b>I. Aparatos</b> .....	<b>- 43 -</b>
<b>II. Reactivos</b> .....	<b>- 43 -</b>
<b>III. Medios de cultivo</b> .....	<b>- 44 -</b>
i. Medio de cultivo base.....	- 44 -
ii. Medio de cultivo completo (EMEM:HAM-F12:SFB:antibióticos).....	- 44 -
<b>IV. Esterilización de materiales y soluciones</b> .....	<b>- 44 -</b>
<b><u>METODOLOGÍA</u></b> .....	<b>- 45 -</b>
<b>I. Línea celular</b> .....	<b>- 46 -</b>
i. Mantenimiento de cultivos celulares.....	- 46 -
ii. Procedimiento de congelación .....	- 46 -
iii. Procedimiento de descongelación .....	- 47 -
<b>II. Viabilidad y recuento celular</b> .....	<b>- 47 -</b>
<b>III. Observación de cambios morfológicos por microscopía óptica</b> .....	<b>- 47 -</b>
<b>IV. Análisis del desarrollo de neuritas</b> .....	<b>- 47 -</b>
<b>V. Ensayo de MTT</b> .....	<b>- 48 -</b>
<b>VI. Determinación de apoptosis</b> .....	<b>- 48 -</b>
i. Detección de fragmentación de ADN.....	- 48 -
ii. Recuento diferencial de células teñidas con colorante Hoechst .....	- 49 -
iii. Ensayo colorimétrico de medición de la actividad de caspasa 8 .....	- 49 -
iv. Ensayo colorimétrico de medición de la actividad de caspasa 3 .....	- 49 -
v. Detección de clivaje de PARP .....	- 50 -
<b>VII. Análisis de la expresión génica por RT-PCR y <i>Real Time</i>-PCR</b> .....	<b>- 50 -</b>
i. Extracción de ARN.....	- 50 -
ii. Obtención de ADN copia.....	- 51 -
iii. Diseño de <i>primers</i> .....	- 51 -
iv. Amplificación de los fragmentos de ADNc por PCR .....	- 53 -
v. Análisis de los productos de amplificación .....	- 53 -
vi. Precauciones para mantener la calidad del procedimiento.....	- 53 -
vii. Desarrollo electroforético y obtención de imágenes .....	- 54 -
viii. <i>Real Time</i> -PCR.....	- 54 -
<b>VIII. Extractos celulares y fraccionamiento subcelular</b> .....	<b>- 54 -</b>
i. Lisis celular.....	- 54 -
ii. Fraccionamiento subcelular.....	- 54 -
iii. Inmunoprecipitación.....	- 55 -
iv. Cuantificación de proteínas .....	- 55 -
<b>IX. Fraccionamiento y desarrollo electroforético</b> .....	<b>- 55 -</b>
i. SDS-PAGE de proteínas.....	- 55 -
ii. Electrotransferencia y <i>Western blotting</i> .....	- 55 -
iii. <i>Stripping</i> .....	- 56 -
<b>X. Microscopía confocal</b> .....	<b>- 56 -</b>
<b>XI. Microscopía electrónica de barrido</b> .....	<b>- 57 -</b>
i. Preparación de las muestras .....	- 57 -
<b>XII. Estadística</b> .....	<b>- 57 -</b>

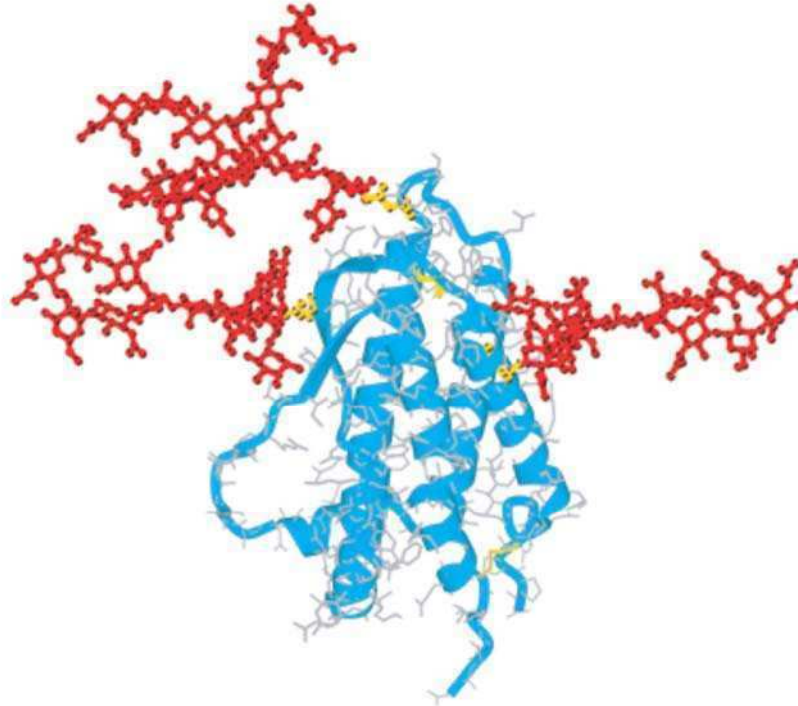
<b>XIII. Descarte del material biológico y residuos peligrosos</b> .....	<b>- 57 -</b>
<b><u>RESULTADOS</u></b> .....	<b>- 59 -</b>
<b>ACCIÓN ANTIAPOPTÓTICA DE LA ERITROPOYETINA EN CÉLULAS SH-SY5Y INDUCIDAS A APOPTOSIS POR STAUROSPORINA</b> .....	<b>- 60 -</b>
<b>I. Modelo celular</b> .....	<b>- 60 -</b>
<b>II. Inducción de apoptosis mediante staurosporina</b> .....	<b>- 60 -</b>
<b>III. Cinética de inducción de apoptosis con staurosporina</b> .....	<b>- 62 -</b>
<b>IV. Expresión del receptor de eritropoyetina</b> .....	<b>- 63 -</b>
<b>V. Efecto antiapoptótico de la eritropoyetina</b> .....	<b>- 66 -</b>
<b>VI. Acción de la eritropoyetina sobre cambios morfológicos inducidos por staurosporina</b> .....	<b>- 68 -</b>
<b>VII. Estudio de mecanismos involucrados en el efecto neuroprotector de la eritropoyetina</b> .....	<b>- 70 -</b>
<b>VIII. Estudio de la expresión de miembros de la familia de Bcl-2</b> .....	<b>- 72 -</b>
<b>IX. Estudio de los cambios morfológicos inducidos por staurosporina</b> .....	<b>- 74 -</b>
<b>ACCIÓN ANTIAPOPTÓTICA DE LA ERITROPOYETINA EN CÉLULAS SH-SY5Y INDUCIDAS A APOPTOSIS POR TNF-<math>\alpha</math></b> .....	<b>- 77 -</b>
<b>X. Estudio de inducción de apoptosis por TNF-<math>\alpha</math></b> .....	<b>- 77 -</b>
<b>XI. Efecto de la eritropoyetina sobre la viabilidad de células SH-SY5Y</b> .....	<b>- 79 -</b>
<b>XII. Efecto antiapoptótico de la eritropoyetina frente al daño celular inducido por TNF-<math>\alpha</math></b> .....	<b>- 80 -</b>
<b>XIII. Mecanismos involucrados en la acción antiapoptótica de la eritropoyetina</b> .....	<b>- 82 -</b>
<b>XIV. Regulación de la expresión de receptores de TNF-<math>\alpha</math></b> .....	<b>- 85 -</b>
<b>XV. Regulación de los miembros de la familia de Bcl-2</b> .....	<b>- 87 -</b>
<b>XVI. Modulación de la expresión de c-Flip</b> .....	<b>- 90 -</b>
<b>XVII. Activación de la vía de NF-<math>\kappa</math>B</b> .....	<b>- 91 -</b>
<b>XVIII. Activación de las vías de NF-<math>\kappa</math>B y STAT5 por efecto de eritropoyetina</b> .....	<b>- 93 -</b>
<b>XIX. Activación la vía de NF-<math>\kappa</math>B por TNF-<math>\alpha</math> y eritropoyetina</b> .....	<b>- 95 -</b>
<b>XX. Estudio de la regulación del receptor de eritropoyetina por TNF-<math>\alpha</math></b> .....	<b>- 98 -</b>
<b><u>DISCUSIÓN</u></b> .....	<b>- 101 -</b>
<b><u>CONCLUSIONES FINALES</u></b> .....	<b>- 109 -</b>
<b><u>DIFUSIÓN</u></b> .....	<b>- 112 -</b>
<b><u>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u></b> .....	<b>- 114 -</b>

---

## **INTRODUCCION**

## Eritropoyetina

La eritropoyetina (Epo) es una hormona glicoproteica cuya función más conocida es su participación en el proceso de eritropoyesis. Sin embargo, cada vez adquieren más importancia otras funciones de la Epo, en particular a aquellas relacionadas con la supervivencia celular.



**Estructura tridimensional de la Eritropoyetina**

## Historia de la eritropoyetina

En 1863, el médico francés Denis Jourdanet reconoció indirectamente la relación entre la menor presión parcial de oxígeno en sangre y la elevación del número de eritrocitos cuando realizaba determinaciones de hematocrito a personas que habían permanecido mucho tiempo viviendo en las alturas de los Alpes. Jourdanet constató que la sangre de estas personas era más viscosa que la de sus pacientes "normales". Friedrich Miescher describió, en 1893, la formación de eritrocitos como resultado de una disminución de oxígeno en la médula ósea. Sobre esta base, hubo intentos para tratar la anemia por medio de la inducción de hipoxia.

En 1906, el francés Paul Carnot y su colaboradora Catherine Deflandre plantearon por primera vez la hipótesis de que un factor humoral podía regular la formación de la sangre (Carnot y Deflandre, 1906). Su hipótesis se basaba en experimentos con suero sanguíneo de conejos anémicos, cuyos glóbulos rojos aumentaban de forma considerable tras inyectarle suero de conejos sanos. Sin embargo, los intentos de numerosos investigadores por reproducir los resultados de Carnot y Deflandre no tuvieron éxito. Sólo con el empleo de fenilhidracina, una sustancia química hemolítica

que induce anemia, otros investigadores, como por ejemplo en 1911 Camillo Gibelli de la Universidad de Génova, pudieron mantener la hipótesis de Carnot. Otros intentos para corroborar la hipótesis del factor humoral involucraron experimentos en los cuales la formación de sangre podía forzarse en animales normales mediante el suero de animales que eran mantenidos en condiciones de hipoxia. En este sentido, Georges Sandor, del Instituto Pasteur, obtuvo un éxito considerable en los años 30. Finalmente, en 1948, dos nefrólogos finlandeses, Eva Bonsdorff y Eeva Jalavisto le dieron el nombre de eritropoyetina (Epo) a este factor (Bonsdorff y Jalavisto, 1948).

Como verdadero "descubridor" de la Epo suele considerarse a Allan Jacob Erslev, quién publicó, en 1953, los primeros artículos científicos en los que se probaba sin duda alguna la existencia de la Epo (Erslev, 1953). Eugene Goldwasser fue otra figura clave en la investigación de la Epo. En 1954, él y su grupo de investigación de la Universidad de Chicago confirmaban los trabajos de Erslev con resultados propios. Goldwasser y su colaborador Leon Orris Jacobson pudieron demostrar en 1957 que la Epo se forma en el riñón (Jacobson y Goldwasser, 1957), y en 1977 Miyake y colaboradores aislaron por primera vez Epo de la orina humana (Miyake *et al.*, 1977).

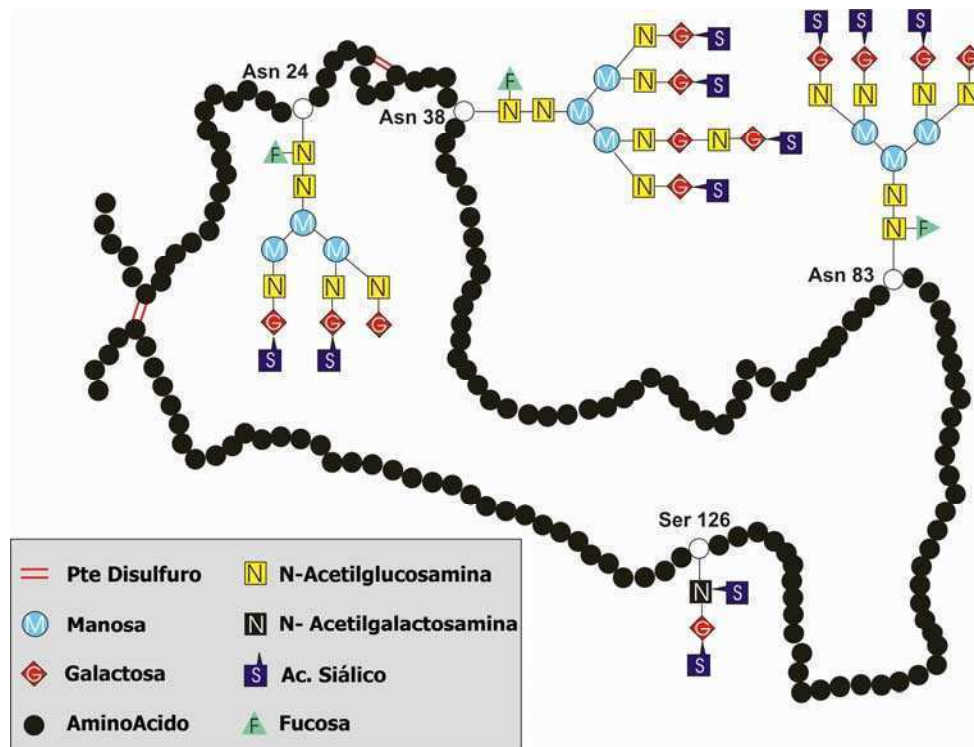
En 1983, Fu-Kuen Lin, un empleado de Amgen, identificó el gen de la Epo humana. En 1984, Sylvia Lee-Huang, de la Universidad de Nueva York, informó por primera vez la clonación y expresión de Epo recombinante humana (rhuEpo) en la bacteria *Escherichia coli* (Lee-Huang, 1984); lo que luego fue logrado también en células de mamífero (células CHO) (Lin *et al.*, 1985). De esta forma, se hizo posible la producción de rhuEpo en grandes cantidades.

### **Características estructurales de la eritropoyetina**

El gen de la Epo en el humano se encuentra en el cromosoma 7 (posición 7q21-7q22). Consta de 5,4 kb, 5 exones y 4 intrones y codifica una proteína de 193 aminoácidos denominada proeritropoyetina. Mediante una modificación posterior, son clivados un péptido de 27 residuos aminoácídicos del extremo N terminal, y un residuo de asparagina del extremo C terminal, quedando la proteína madura formada por 165 aminoácidos con un peso molecular de aproximadamente 34 kDa. La estructura terciaria de la Epo está formada por cuatro hélices  $\alpha$  antiparalelas. El contenido de hidratos de carbono, que constituye aproximadamente 40% de la masa molecular, consiste en un O-glicosídico (Ser 126) y tres N-glicosídicos (Asn 24, Asn 38 y Asn 83). Las cadenas laterales están formadas por los monosacáridos manosa, galactosa, fucosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina y N-acetilneuramínico.

Contrariamente a los aminoácidos constantes de la molécula de Epo, las estructuras de azúcares son variables. En este sentido se habla de microheterogeneidad de la molécula, la cual se presenta no sólo en la molécula natural sino también en la rhuEpo. Esta heterogeneidad está determinada, por una parte, por secuencias variables de monosacáridos en las cadenas laterales, y por otra parte, por una cantidad variable de ácido N-acetilneuramínico. Este último, también conocido por el nombre común de ácido siálico, es decisivo para la actividad biológica de las glicoproteínas, ya que, cuanto mayor es el contenido de ácido siálico más prolongada es la vida media de la hormona en sangre.





### Estructura de la Eritropoyetina

#### Biosíntesis de la eritropoyetina

La producción de Epo es estimulada por la reducción de la tensión de oxígeno en los tejidos (hipoxia tisular), la cual es sensada en el riñón por células intersticiales peritubulares. La activación del factor de transcripción inducido por hipoxia (HIF) media la activación y transcripción del gen de la hormona. El factor HIF-1 incluye la subunidad HIF-1 $\beta$ , expresada constitutivamente, y la subunidad HIF-1 $\alpha$ , regulada por oxígeno. La estabilidad y actividad de esta última es regulada por modificaciones postraduccionales, tales como hidroxilación, ubiquitinación, acetilación y fosforilación. En normoxia, se produce la hidroxilación de dos residuos prolina y la acetilación de un residuo lisina en el dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODDD) del HIF-1 $\alpha$ , lo cual conduce a la asociación de esta subunidad con el complejo pVHL E3. Ello causa la degradación de HIF-1 $\alpha$  vía ubiquitina-proteasoma. En hipoxia, en cambio, la subunidad HIF-1 $\alpha$  se enlaza a la subunidad 1 $\beta$  formando el heterodímero HIF-1, el cual se estabiliza debido a que escapa a la hidroxilación, ubiquitinación y degradación. El HIF-1 se une a elementos de respuesta a hipoxia (HRE) e interacciona con coactivadores, lo que resulta en la formación de un importante complejo de iniciación de la transcripción (TIC). Este mecanismo conduce, finalmente, a la producción de proteínas que median la respuesta fisiológica a la hipoxia (Ke y Costa, 2006).

El principal sitio de producción de Epo (85-90%) en el humano adulto es el riñón y tiene lugar en el endotelio de los capilares situados alrededor de los canales nefríticos, mientras que el 10-15% se forma en los hepatocitos. Es por esto que en patologías que cursan con insuficiencia renal disminuyen los niveles de Epo circulante y por eso se desarrolla una anemia a la que se denomina "de origen renal".

La expresión de Epo ha sido también detectada, en condiciones de hipoxia, en astrocitos y neuronas (Noguchi *et al.*, 2007).

### **Función de la eritropoyetina**

La Epo pertenece filogenéticamente a la familia de las citoquinas, entre las que se encuentran también somatotrofina, prolactina, interleuquinas 2-7 y los llamados "Factores Estimulantes de Colonias" (G-CSF, M-CSF y GM-CSF).

La Epo alcanza la médula ósea, sitio de desarrollo de la eritropoyesis, donde estimula a células progenitoras cuyo objetivo es lograr su transformación en eritrocitos.

La función de la eritropoyesis es mantener el balance de eritrocitos, los cuales se generan diariamente en número aproximado de doscientos mil millones. En el proceso de eritropoyesis, la Epo por unión al receptor de Epo (REpo), actúa sobre los precursores tempranos BFU-E (*Burst Forming Unit-Erythroid*), y, especialmente sobre las células más maduras CFU-E (*Colony Forming Unit-Erythroid*). El número de receptores varía en las distintas células del linaje eritroide, desde las BFU-E hasta los normoblastos inmaduros, siendo mayor en las CFU-E. En estadios posteriores, la expresión de REpo decrece a medida que las células eritroides se diferencian y maduran. Los eritrocitos maduros no expresan receptores de Epo. Desde ambos estadios de progenitores eritroides (BFU-E y CFU-E) se promueve tanto la proliferación como la diferenciación celular (Testa, 2004).

Distintas evidencias sustentan la hipótesis de que la Epo no sería responsable del compromiso del linaje eritroide sino que, a través de una acción antiapoptótica, aseguraría la supervivencia para que las células puedan cumplir con su programa de diferenciación (Mulcahy, 2001).

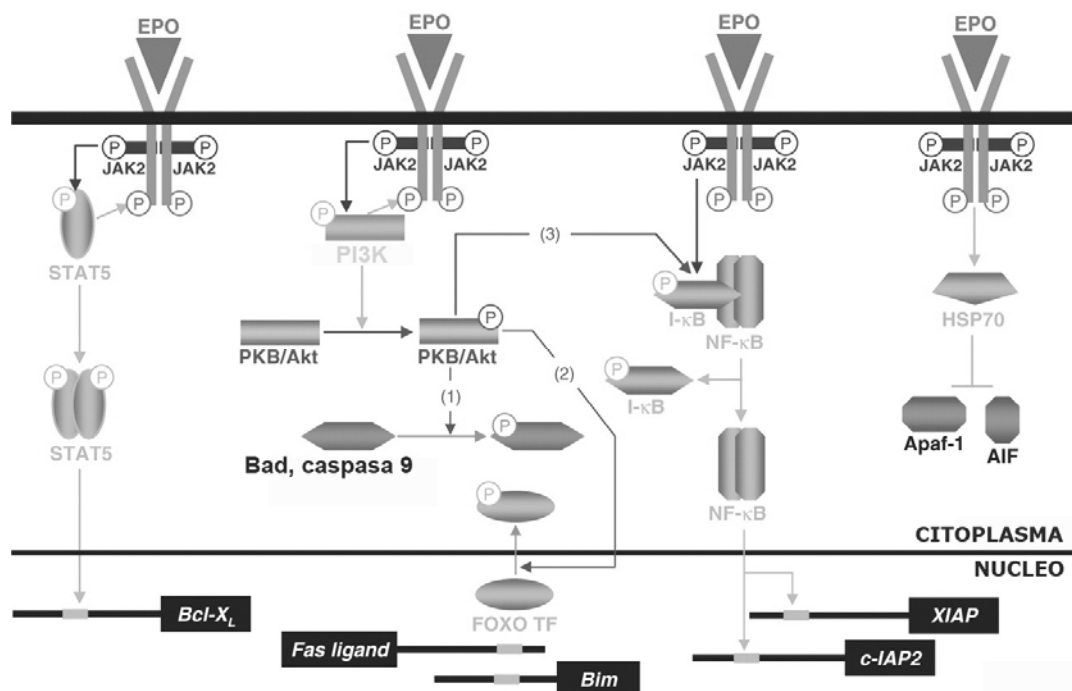
En los últimos años se ha demostrado que la función de la Epo en el organismo no está limitada a la formación de nuevos eritrocitos. El receptor de Epo se ha encontrado en diferentes tipos de células somáticas como neuronas, astrocitos, células de la microglía y células del músculo cardíaco. La misma hormona ha sido localizada en sitios específicos de las neuronas, especialmente en el hipocampo, una región del cerebro muy afectada cuando se produce falta de oxígeno. Se han observado interacciones entre la Epo y su receptor en quimiotaxis, angiogénesis, activación intracelular de calcio y en la inhibición de la muerte celular.

Como ha sido indicado previamente, la principal función de la Epo es el mantenimiento de la capacidad de transporte de oxígeno, pero a la luz de los hallazgos mencionados, últimamente se le adjudica funcionalidad en otros tejidos. Así, el efecto de Epo a nivel de sistema nervioso central tiene un efecto neurotrófico y neuroprotector, previniendo la muerte de las neuronas ante un estímulo hipóxico o de shock.

El hallazgo de un efecto de la Epo sobre el endotelio permite sugerir una contribución adicional a las acciones neuroprotectora y cardioprotectora atribuidas a la Epo. En efecto, la respuesta endotelial a la Epo puede modificar la producción de factores que regulan el flujo sanguíneo, supervivencia de las células endoteliales, movilización de progenitores endoteliales y angiogénesis (Noguchi *et al.*, 2007). La función más conocida de la Epo relacionada con los procesos de formación de energía por vía aeróbica, tan importante para el mantenimiento de la vida y del bienestar ha dado lugar a un gran desarrollo en el conocimiento de la hormona y permitido su síntesis mediante técnicas recombinantes. Aún así, todos los esfuerzos realizados para conocer en profundidad los procesos de síntesis y regulación, así como los efectos de la Epo en distintos tejidos no han tenido en todos los casos, resultados definitivos. En particular, el rol paracrino de la Epo en el cerebro y en el útero todavía no ha sido totalmente aclarado.

### Receptor de eritropoyetina

La activación celular por Epo se inicia por su unión al receptor específico REpo. Este receptor pertenece a la superfamilia de receptores de citoquinas, receptores de tirosina-quinasa cuyas características estructurales se describen más adelante. El REpo, una proteína cuyo tamaño ha sido reportado entre 66 y 78 kDa, presenta dos sitios de unión a Epo, uno de alta afinidad ( $K_D \sim 1$  nM) y otro de baja afinidad ( $K_D \sim 2$   $\mu$ M). El receptor cambia su conformación por la unión del ligando. El propio REpo no posee actividad quinasa pero la unión de Epo induce un homodímero del receptor lo que activa una quinasa acoplada al REpo, vía transfosforilación. Además, distintos residuos de tirosina enlazados al REpo se fosforilan y sirven como estación de acoplamiento para varias proteínas, las que a su vez, activan diferentes cascadas de señalización, tal como se muestra en la siguiente figura.



## La familia de receptores de tirosina-quinasa

La principal característica de estos receptores es que carecen de actividad enzimática, pero están estrechamente asociados a proteínas con actividad tirosina-quinasa. Dentro de este grupo se incluyen los receptores de antígenos de las células T y B del sistema inmune, las integrinas y la denominada superfamilia de receptores de citoquinas. Esta última involucra no sólo a receptores de citoquinas sino también a algunos receptores de hormonas.

Los receptores de citoquinas son proteínas transmembrana, de cadena sencilla, aunque durante el proceso de transmisión de la señal, la unión del ligando da lugar a la formación de complejos funcionales (homodímeros, heterodímeros o heterooligómeros). Los receptores de citoquinas se dividen, a su vez, en dos subfamilias: los receptores tipo I, también conocidos como familia de receptores hematopoyéticos, y los receptores tipo II.

Los receptores tipo I, entre los que se encuentra el REpo, tienen un elevado grado de homología en su dominio extracelular, presentando todos ellos una serie de residuos de cisteína muy conservados y un motivo WSXWS. Por el contrario, el dominio intracelular está menos conservado, aunque todos los receptores tipo I presentan 2 regiones denominadas box 1 y box 2 que son esenciales para el anclaje de las Janus quinasa (ver más adelante). La mayor parte de los miembros de esta familia de receptores forman heterocomplejos en los que una de las subunidades es común y la otra, específica.

Los receptores tipo II se caracterizan por presentar dos dominios fibronectina en su región extracelular, pero carecen de la secuencia WSXWX y de los residuos de cisteína que caracterizan a los receptores tipo I. Se pueden distinguir dos grupos de receptores, cortos y largos, en función de la longitud de su dominio intracelular. Generalmente, los complejos funcionales son heterodímeros en los que participan una subunidad corta y una subunidad larga. Muchas de las cadenas pueden formar parte de más de un complejo.

El mecanismo de señalización de los receptores de citoquinas es relativamente sencillo y depende, principalmente, de la activación de dos familias de proteínas intracelulares, las Janus quinasa (JAKS) y las STATs (*signal transducers and activators of transcription*). A la vía de señalización de estos receptores se la conoce, habitualmente, como la vía JAK-STAT. Sin embargo, los receptores de citoquinas pueden activar también otras vías de señalización.

### Estructura y función de las Janus quinasa.

Las JAKs son una familia de proteínas con actividad tirosina-quinasa, que reciben este nombre en honor a Jano, el dios romano de las transiciones. En mamíferos, la familia de las JAKs está constituida por cuatro miembros denominados JAK1, JAK2, JAK3 y Tyk2, los que presentan un elevado grado de homología, y funciones en gran medida redundantes. La expresión de JAK1, JAK2 y Tyk2 es ubicua, mientras que JAK3 se expresa únicamente en células hemáticas de estirpe mieloide. Desde el punto de vista estructural, las JAKs se caracterizan por poseer una serie de dominios conservados denominados JH (*JAK homology*). El dominio JH1 es el que presenta la actividad tirosina-quinasa,

mientras que el dominio JH2 o dominio pseudoquinasa ejerce una función reguladora de dicha actividad. Las JAKs carecen de dominios SH3, pero presentan en su región JH3 secuencias con homología con los dominios SH2, por lo que esa zona podría ser la encargada de unir residuos de fosfotirosina. Los dominios JH3-JH7 forman el denominado dominio FERM, responsable de la asociación con el receptor.

Muchos de los datos existentes sobre la función específica que desempeña cada una de las JAKs surgen del estudio del fenotipo de ratones *knockout*. Así se encontró que JAK1 se une a la subunidad específica de los receptores de citoquinas que se combinan con la subunidad común  $\gamma_c$ . Por tanto, los ratones *knockout* para JAK1 presentan una deficiente respuesta a múltiples interleuquinas. Los ratones *knockout* para JAK2 mueren durante el periodo embrionario, debido a un severo fallo en la hematopoyesis debido, probablemente, a la importancia de esta proteína en la señalización del REpo.

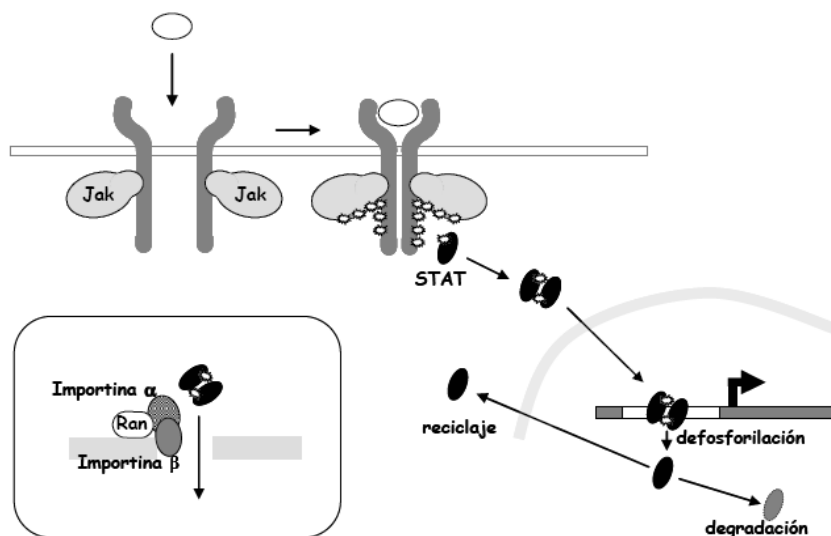


**Estructura de las JAKs**

**Mecanismo de activación de la vía JAK-STAT**

La activación de esta vía es iniciada por la unión de un ligando a su receptor, como, por ejemplo, por la unión de Epo al REpo. Las JAKs están constitutivamente asociadas a las regiones box 1 y box 2 del dominio intracelular del REpo, de forma que el cambio conformacional que se produce en el receptor tras la unión de Epo hace que las JAKs se aproximen, lo que permite su transactivación, es decir, la fosforilación recíproca en residuos tirosina.

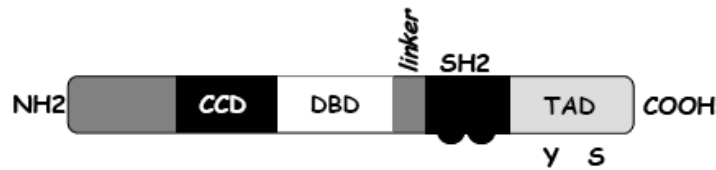
Una vez activadas, las JAKs fosforilan tanto al receptor (en su dominio intracelular) como a las STATs.



**Mecanismo de activación de la vía JAK-STAT**

## Estructura y función de las STATs

Las STATs son una familia de factores de transcripción constituida por 7 miembros denominados STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b y STAT6.



CCD: *coiled-coil domain*    DBD: *DNA binding domain*    TAD: *transactivation domain*

### Estructura de STAT

Aunque los diferentes factores STAT presentan un menor grado de homología entre sí que las JAKs, es posible distinguir en todas ellas dominios conservados.

- dominio N-terminal. Es, probablemente, el encargado de regular la translocación nuclear, además de favorecer la interacción de las STATs con otras proteínas y con el DNA.
- dominio CCD (*coiled-coil domain*). Interviene en la interacción de las STATs con otras proteínas y, probablemente, también en la unión de STAT al receptor de citoquinas.
- dominio DBD (*DNA binding domain*). Es el encargado de reconocer las secuencias específicas de DNA a las que se unen las STATs.
- dominio de unión (*linker*). Su función es conectar el DBD con el dominio SH2.
- dominio SH2. Este dominio es el más conservado y, por su capacidad de reconocer residuos de fosfotirosina, resulta fundamental para el reclutamiento de las STATs por los receptores de citoquinas y para la unión con las JAKs. Además, la interacción entre dominios SH2 es la responsable de la dimerización de las STATs.
- dominio TAD (*transactivation domain*). Es el dominio encargado de regular la transcripción.

Al igual que lo que ocurre con las JAKs, mucha de la información sobre la función de las distintas STATs procede del estudio de ratones *knockout*. Por ejemplo, mediante la generación de ratones *knockout* condicionales se ha podido comprobar que STAT3 es importante en la regulación de la respuesta inflamatoria, en el proceso de cicatrización de las heridas y en el desarrollo mamario. También se pudo demostrar que el principal efecto de la ausencia de STAT4 es una deficiente respuesta a la interleuquina-12, por lo que los ratones deficientes en esta proteína presentan un desarrollo disminuido de linfocitos T helper tipo I. Entre los distintos miembros de la familia de factores STAT, STAT5 activa mayoritariamente una cascada de señalización que finalmente activa genes de supervivencia. Hasta el momento, poco se sabe acerca del papel de STAT5 en la isquemia y reperfusión cerebral (Zhang *et al.*, 2007).

## Señalización celular a través de las proteína-quinasas

A finales de los años cincuenta, Edwin Krebs y Edmond Fischer describieron la primera secuencia reversible de fosforilaciones proteicas en una cascada de transducción de señales, en su caso la señalización glucogenolítica inducida por adrenalina (Fischer y Krebs, 1966). A partir de ese momento se ha observado cómo la fosforilación proteica, por activación de una o más proteína-quinasa, controla los mecanismos de señalización celular, habiéndose descrito ya más de 100 proteína-quinasa diferentes en las células de mamíferos (Hunter, 1995; Robinson *et al.*, 2000).

Muchas hormonas proteicas, llamadas factores de crecimiento, estimulan la proliferación y la diferenciación de sus células diana al unirse a receptores de membrana con actividad tirosina-quinasa. Esta activación inicia una cascada de señalización celular, compuesta fundamentalmente por proteína-quinasa, que conduce a la modulación de la expresión de determinados genes. Además de activar señales mitogénicas, los factores de crecimiento estimulan señales antiapoptóticas o de supervivencia celular. Así, van a regular el equilibrio existente entre proliferación y muerte celular. Aunque ya se han descrito muchos de los mecanismos involucrados en la proliferación celular, todavía queda bastante por conocerse sobre las rutas de señalización que conducen a la supervivencia celular (Ushio-Fukai *et al.*, 1999).

### La vía PI3K/PKB

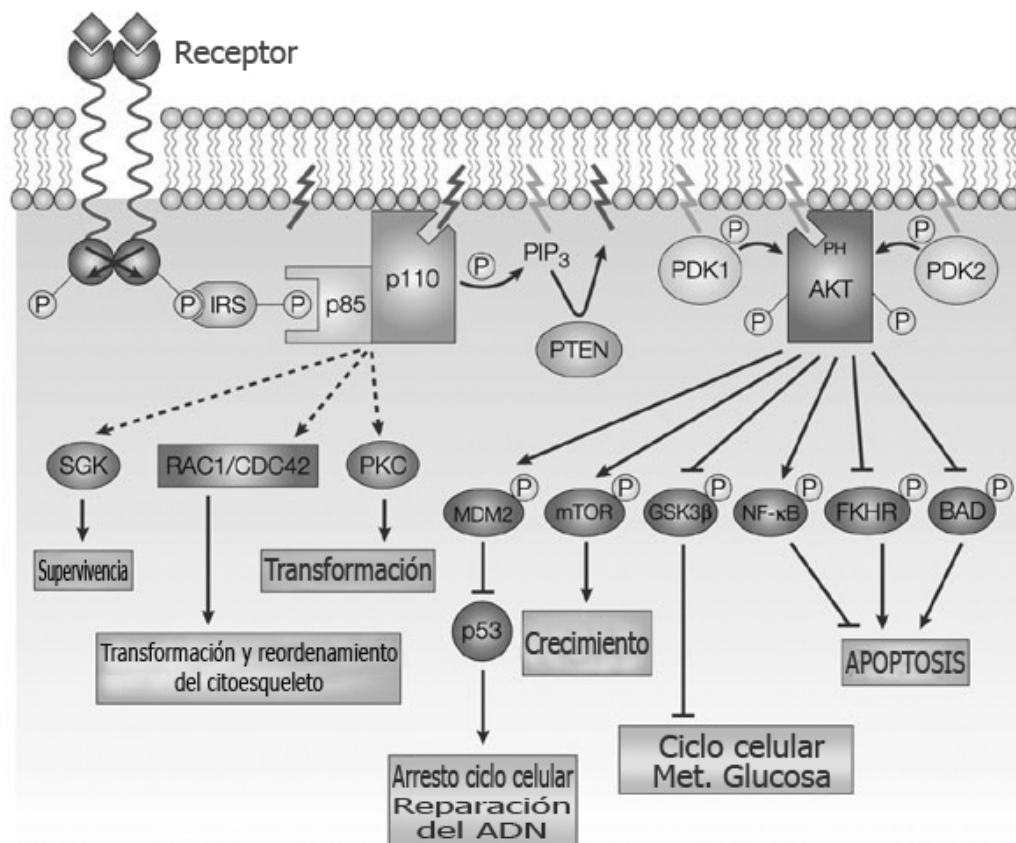
La transferencia de señales desde la membrana plasmática al núcleo constituye un complejo proceso que depende, entre otros componentes, de moléculas de señalización inositol-lípidos.

La Epo regula la producción de glóbulos rojos principalmente por prevención de la apoptosis de los progenitores eritroides y dicho proceso es mediado por la activación de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) (Zhande y Karsan, 2007), la cual emerge como un importante constituyente de caminos de señalización críticos.

La vía de señalización de PI3K media gran cantidad de respuestas celulares, incluyendo neuronas, tras su activación por factores de crecimiento peptídicos o por hormonas. La desregulación de esta vía está relacionada con enfermedades como cáncer o diabetes en humanos, y su importancia en la biología de la célula se ha puesto de manifiesto por el hecho de intervenir en la muerte y en la supervivencia celular, así como en otras funciones celulares fundamentales, tales como el crecimiento, la motilidad, la diferenciación y funciones hormonales (Marte y Downward, 1997).

La activación de PI3K conduce a la producción, en pocos segundos, de fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP3), molécula a la que pueden unirse quinasas que poseen dominio PH (*pleckstrin homology*). Estos dominios se encuentran en varias proteínas, tales como PDK1 (*3'-phosphoinositide-dependent kinase 1*) y Akt/PKB (*protein kinase B*), ambas con un rol central en los efectos de transformación derivados de la actividad de PI3K. Varios efectos biológicos de PI3K son mediados por la fosforilación de Akt/PKB. Su amplio abanico de acciones se debe a que activa múltiples vías de transducción secundarias. La activación de PKB por PI3K y la subsiguiente inducción de la degradación

por fosforilación de la proteína proapoptótica Bad fue un mecanismo propuesto para la acción antiapoptótica de la vía PI3K/PKB (Datta *et al.*, 1997; del Peso *et al.*, 1997). Sin embargo, también se ha visto (Scheid y Duronio, 1998) que la señal de supervivencia de la PI3K puede ser independiente de la fosforilación de Bad, de ahí que se sugiera que la PI3K pueda actuar sobre diversos componentes de la cascada apoptótica. De hecho, además del factor Bad, diversos componentes celulares implicados en la apoptosis, tales como los factores de transcripción Forkhead (FKHR) (Brunet *et al.*, 1999), GSK3 (Cross *et al.*, 1995) y la caspasa 9 (Rommel *et al.*, 1999) son inactivados por fosforilación por PKB.



**Esquema de la vía de señalización PI3K/AKT**

## Muerte celular

Hasta ahora hemos hecho referencia a mecanismos o procesos que promueven la diferenciación y el crecimiento de células y tejidos. Sin embargo, un mecanismo muy importante en el desarrollo es la muerte celular.

La muerte de células individuales dentro de un tejido fue observada por primera vez en estudios sobre el desarrollo en vertebrados, hace ya más de 40 años (Saunders, 1966). A principios de los años 70, Kerr, Wyllie y Curie encontraron que se podían observar dos tipos diferentes de muerte celular: la bien



caracterizada necrosis, y una nueva forma, morfológicamente distinta, a la que llamaron apoptosis (Kerr *et al.*, 1972; Wyllie *et al.*, 1981).

La muerte por necrosis es violenta y se caracteriza por la tumefacción del citoplasma, la ruptura de las membranas celulares y la desintegración de los componentes subcelulares y nucleares. Al contrario, la apoptosis viene definida por una serie ordenada de eventos que tienen lugar en un período de tiempo mayor. Sin embargo, no es posible conocer este período *a priori*, ya que el tiempo requerido para que una célula entre en apoptosis está definido, generalmente, tanto por el estímulo apoptótico como por el tipo celular (Kidd, 1998).

### **El fenómeno de apoptosis**

La apoptosis constituye una muerte celular programada. Desde el punto de vista biológico, la apoptosis es un mecanismo que permite a los metazoos controlar el número de células en los tejidos y eliminar células individuales que comprometen la supervivencia del animal. Se ha descubierto que las células poseen en su membrana plasmática un tipo particular de receptores, denominados receptores de muerte. Estos receptores detectan la presencia de señales de muerte en el medio extracelular y, como respuesta, inician inmediatamente la puesta en marcha de la maquinaria apoptótica intrínseca, sistema enzimático con promotores e inhibidores.

La apoptosis es un proceso activo que conlleva, por parte de la célula, a la síntesis de nuevo ARNm, así como también de nuevas proteínas que participan en este proceso.

Durante el proceso de apoptosis, la célula se vuelve más compacta y aparecen invaginaciones en la membrana citoplasmática. Por su parte, la cromatina nuclear empieza a condensarse y, finalmente, el ADN acaba fragmentándose. Típicamente, la célula se muestra heteropícnótica, es decir, condensada y con un núcleo fragmentado y de pequeño tamaño. Las invaginaciones de la membrana dan lugar a formaciones en las que quedan reclusos restos del citoplasma y de las distintas organelas celulares. Dejan de funcionar las enzimas que normalmente translocan la fosfatidilserina hacia la cara interna de la membrana, exponiendo, así, a este fosfolípido en la cara externa. Finalmente la célula se convierte en una miríada de fragmentos llamados cuerpos apoptóticos, cada uno de cuales se encuentra envuelto en la propia membrana citoplasmática. Estos cuerpos apoptóticos son fagocitados por las células del sistema inmunológico que los rodean y que los reconocen como extraños debido a la exposición de fosfatidilserina en la membrana plasmática (Hail *et al.*, 2006). De esta manera, se evita cualquier tipo de respuesta inflamatoria por parte del organismo.

En el caso del sistema nervioso, y en particular en las neuronas, la apoptosis constituye un tipo de muerte programada responsable de la eliminación fisiológica de poblaciones celulares que durante el desarrollo embrionario no han establecido las conexiones adecuadas, o bien no disponen de los suficientes factores tróficos para poder realizar sus funciones (Wyllie, 1998). Este proceso determina el tamaño y la forma del sistema nervioso de los vertebrados (Kuan *et al.*, 2000). Se estima que más de la mitad de las neuronas del sistema nervioso central de los vertebrados mueren durante el desarrollo embrionario, o bien, en la temprana maduración postnatal vía muerte celular programada

(Oppenheim, 1991; Raff *et al.*, 1993). Durante la vida del adulto, la muerte celular programada cumple un rol fundamental en diversos procesos fisiológicos como son la remodelación de los tejidos y la ejecución y regulación de la respuesta inmunitaria.

Las consecuencias de una incorrecta respuesta apoptótica son graves: la incapacidad de las células de iniciar la apoptosis en respuesta al daño sufrido por el ADN está implicada en el desarrollo y en la progresión del cáncer, mientras que se ha visto que una inapropiada activación del fenómeno apoptótico puede contribuir al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como la de Alzheimer (Barinaga, 1993), Parkinson o esclerosis múltiple. Por lo tanto, no es de extrañar que el proceso apoptótico esté controlado muy rigurosamente por distintas vías de señalización. Además existen una serie de factores que interconectan entre sí estas diferentes rutas de señalización, permitiendo una rápida respuesta a los estímulos, tanto intra como extracelulares (Pawlowski y Kraft, 2000).

### **Mecanismos de inducción de apoptosis**

La apoptosis puede inducirse por una multiplicidad de efectores: ausencia de factores de crecimiento, hormonas peptídicas específicas, cambios en la concentración de calcio, presencia de fármacos o daños, tanto en el ADN como en la mitocondria. Aunque cada uno de ellos va a actuar en un punto específico de las vías apoptóticas de transducción, todos ellos implican un daño celular que podemos considerar "irreparable", y al que la célula responde con el inicio del proceso apoptótico.

Se han descrito dos vías generales que conducen a la muerte apoptótica. La llamada vía endógena o intrínseca se activa por estímulos provenientes del interior celular desencadenando señales apoptóticas que concurren en la mitocondria. En el caso de la vía exógena o extrínseca, los estímulos apoptóticos provienen del exterior celular y se transmiten a través de los llamados receptores de muerte.

#### **Vía intrínseca**

En los comienzos de la descripción molecular de la apoptosis, no se creía que la mitocondria pudiera jugar un papel relevante. Sin embargo, Monaghan y colaboradores en 1992 y, más tarde, Krajewski y colaboradores mostraron que la periferia de la mitocondria era la localización preferencial del factor antiapoptótico Bcl-2 (Krajewski *et al.*, 1993; Monaghan *et al.*, 1992). Las primeras hipótesis apuntaban a que los radicales libres de oxígeno, generados por la actividad de la cadena respiratoria de electrones, podían generar un estímulo apoptótico, y que Bcl-2 podría funcionar como molécula antioxidante. Actualmente, se conoce que la mitocondria contiene todo un "arsenal" de moléculas que determinan si la célula sigue un proceso irreversible de muerte o no. El elemento clave de la vía mitocondrial es la permeabilización de la membrana externa mitocondrial. En los eventos moleculares que activan el proceso de permeabilización participan miembros de la familia de Bcl-2. Las proteínas proapoptóticas Bax y Bak parecen ser determinantes en la formación de aperturas en la membrana externa mitocondrial (Danial y Korsmeyer, 2004). En condiciones normales, Bak es una proteína transmembrana situada en la membrana mitocondrial externa, mientras que Bax puede encontrarse

en el citosol y en la periferia de la mitocondria. Este factor se mantiene inactivo gracias a la interacción con otros factores que lo mantienen retenido en el citosol. Cuando se produce la activación, Bax se transloca a la mitocondria, se integra en la membrana mitocondrial externa y, oligomeriza junto con Bak formando poros que darán lugar a la permeabilización de la membrana externa mitocondrial. Tras la permeabilización, proteínas del espacio intermembrana son liberadas al citosol. Una de ellas es el transportador de electrones citocromo c. Aparte de su participación en la fosforilación oxidativa, al liberarse de la mitocondria, citocromo c se une a monómeros del factor activador de proteasas APAF-1 (*apoptotic protease activating factor-1*). La interacción con citocromo c permite un cambio conformacional en APAF-1, mediado por ATP, lo que permite su oligomerización para dar lugar al llamado apoptosoma. El apoptosoma se une entonces a la procaspasa 9, la que por oligomerización da lugar a la forma activa (Boatright *et al.*, 2003; Li *et al.*, 1997). La caspasa 9 activa puede actuar sobre caspasas ejecutoras como las caspasas 3 y 7, las cuales activándose proteolizan sustratos vitales para la célula y dan lugar a la subsiguiente muerte celular. La activación de las caspasas, en este punto, puede ser regulada por proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs). La función de las IAPs es regulada a su vez por interacción con inhibidores como por ejemplo Smac/DIABLO o Omi/HtrA2 que compiten con las caspasas para unirse a las IAPs. El proceso de muerte celular puede seguir un camino independiente de caspasas en situaciones en las que existe un déficit genético de caspasas o bien, han sido inhibidas farmacológicamente (Chipuk y Green, 2005).

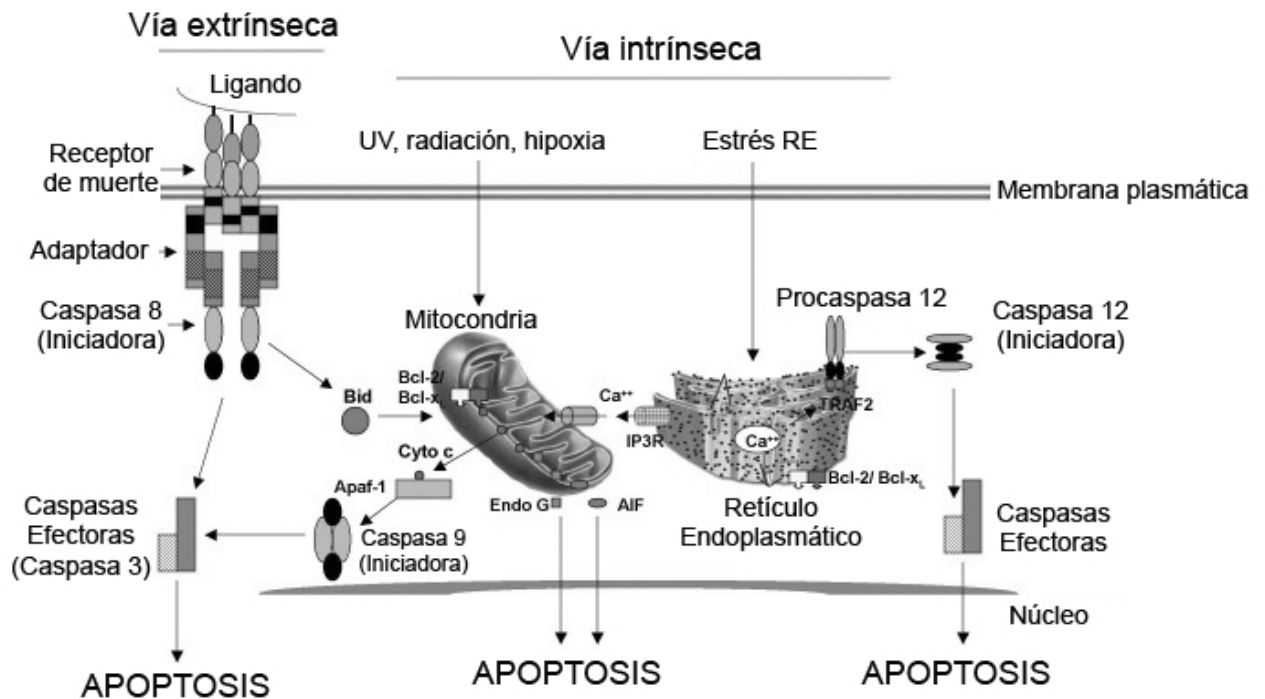
### **Vía extrínseca**

La integridad de una célula está constantemente regulada por sensores internos y señales de supervivencia provenientes de su entorno. En el momento en que la célula pierde el contacto con su entorno o bien detecta daños internos irreparables, entra en apoptosis. Una célula que recibe señales contradictorias entre la promoción o la detención del ciclo celular también entrará en apoptosis (Evan y Littlewood, 1998). Este tipo de apoptosis "instructiva" es especialmente importante en el sistema inmune y es donde ha sido mejor caracterizada. Sin embargo, y como se explicará más adelante, este proceso ha adquirido una importancia muy relevante en otros sistemas, como el sistema nervioso, tanto durante el desarrollo como ante situaciones patológicas. Los receptores de muerte son los encargados de transmitir las señales apoptóticas iniciadas por los "ligandos de muerte" (Ashkenazi y Dixit, 1998).

Aunque en algunos sistemas celulares concretos las vías extrínseca e intrínseca pueden actuar independientemente, en la mayoría de las células existe una delicada coordinación e interacción entre ambas vías (Khosravi-Far y Esposti, 2004).

Los receptores de muerte pertenecen a una superfamilia de receptores relacionados con fenómenos de proliferación, diferenciación y apoptosis llamada la Superfamilia del Factor de Necrosis Tumoral. Como se muestra en la figura, la vía extrínseca de la apoptosis se inicia con la interacción específica de un ligando con su receptor (FAS, receptor de FAS) y la subsiguiente activación de una proteasa.

Esta proteasa induce la liberación del citocromo c desde la mitocondria, el cual activará a su vez a una serie de proteasas cuya acción acabará destruyendo todas las estructuras celulares.



### Mecanismos de apoptosis

#### Participación de caspasas

Las caspasas son una familia de cisteína proteasas que actúan sobre secuencias específicas que contienen residuos de aspártico (cisteína-aspártico proteasas). Las caspasas participan en una cascada de eventos proteolíticos que producen la alteración de la homeostasis celular y afectan al mecanismo de reparación de enzimas, produciendo los cambios morfológicos característicos de la apoptosis (Marks y Berg, 1999). Existen alrededor de 14 miembros en la familia de caspasas, de los cuales 11 se expresan en humanos y se dividen en dos grupos: las iniciadoras y las efectoras o ejecutoras. Las caspasas iniciadoras, entre las que se encuentran las caspasas 8, 9 y 10, están estrechamente relacionadas con los componentes iniciales de las cascadas proapoptóticas. Una vez activadas, estas caspasas activan por proteólisis a las llamadas caspasas efectoras, entre las que se encuentran las caspasas 3, 6 y 7. Éstas, a su vez, proteolizarán a diversas proteínas nucleares y del citoesqueleto, induciendo así el fenómeno de apoptosis (Budihardjo *et al.*, 1999).

Cuando se estimulan los receptores que inducen muerte celular, las proteínas que se encuentran asociadas a ellos acaban produciendo la activación de caspasa 8, la cual tiene actividad proteasa y es la responsable del inicio de la cascada apoptótica típica.

Las caspasas pueden activarse por proteólisis o por oligomerización. De hecho, parece que la caspasa 8 se activa por su asociación con el receptor. La caspasa 3, en cambio, es activada por proteólisis de

su precursor, el zimógeno procaspasa 3, en dos fragmentos de 17 y 12 kDa, los que, al unirse, forman el heterodímero activo.

Durante la apoptosis se producen una serie de cambios en la mitocondria. Éstos se traducen típicamente en cambios en la permeabilidad de su membrana lo que permite la salida del citocromo c desde el interior de la mitocondria hacia el citoplasma donde actuará como cofactor necesario para la activación de la caspasa 9. Este cambio en la señalización, del citoplasma a la mitocondria, es debido a la proteólisis del factor Bid por la caspasa 8. Al liberarse el extremo carboxilo de Bid, este factor se transloca a la membrana mitocondrial causando la salida del citocromo c. Como bien fue mencionado, este último induce la interacción de la proteína citoplasmática Apaf-1 con la caspasa 9, formando el apoptosoma, lo cual induce autoproteólisis y activación de caspasa 9 (Li *et al.*, 1997). La caspasa 9, a su vez, actúa sobre la procaspasa 3, generándose la caspasa 3 activa.

La caspasa 3 interviene en lo que se ha dado en llamar fase efectora de la apoptosis. Esta caspasa va a producir la proteólisis de diversos sustratos, de los cuales los más relevantes son la proteína poli-ADP ribosa-polimerasa (PARP) y el factor de fragmentación del ADN (DFF). La proteína PARP es muy importante para mantener la viabilidad de la célula. De hecho, su proteólisis facilita la disrupción de la célula, por lo que se emplea como marcador del proceso apoptótico (Oliver *et al.*, 1998). Se ha descrito que PARP está implicada en la reparación del ADN, principalmente en respuesta a estímulos ambientales (Satoh y Lindahl, 1992). En cuanto a DFF, es un dímero en el que uno de los monómeros se encuentra inhibiendo la actividad ADNasa del otro (Enari *et al.*, 1998). Al actuar la caspasa 3 sobre el dímero de DFF se libera una subunidad activa que producirá la degradación del ADN (Liu *et al.*, 1997).

## **Participación de factores de la familia Bcl-2**

Anteriormente, hemos mencionado a los factores Bax, Bak y Bid los cuales pertenecen a la familia Bcl-2, cuyos miembros participan tanto en la inducción de la apoptosis como en su inhibición (Yim *et al.*, 2000).

La familia de proteínas Bcl-2 (*B-cell leukemia/lymphoma-2*) está compuesta por tres subgrupos principales en base a la arquitectura de sus dominios. Los miembros antiapoptóticos de la familia, como Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-W, Mcl-1, Bfl-1/A1, poseen cuatro motivos conservados denominados dominios de homología Bcl-2 (BH). Estas proteínas están asociadas con la membrana externa de la mitocondria y mantienen la integridad de la misma, impidiendo la liberación de citocromo c. Otro subgrupo incluye proteínas que sólo poseen el dominio BH3 y que actúan como centinelas. Bajo condiciones normales, estas proteínas son inactivas pero cuando son activadas, actúan como activadoras del tercer grupo de miembros proapoptóticos de la familia. Este subgrupo incluye los factores Bax, Bak, Bok, los cuales poseen al menos los dominios BH1 y BH2. Durante la apoptosis, estas proteínas se asocian a la membrana externa mitocondrial causando alteración de su integridad.

Las proteínas que forman parte de la familia de Bcl-2 son las encargadas de la decisión de estimular o reprimir, a través de su heterodimerización, la vía mitocondrial de apoptosis y la muerte de las células

neuronales (Lukiw y Bazan, 2006). La caspasa 3, una de las proteínas efectoras de la apoptosis, es activada o no dependiendo del equilibrio entre los miembros proapoptóticos y antiapoptóticos de la familia de proteínas Bcl-2, principalmente como consecuencia de la liberación del citocromo c desde la mitocondria al citoplasma y la activación posterior del apoptosoma (Marcheselli *et al.*, 2003).

Bcl-2, la proteína que da el nombre a esta familia, es un inhibidor de la apoptosis. En su extremo carboxilo contiene una secuencia de anclaje a membranas que se une a la membrana externa mitocondrial y a las membranas nucleares y de retículo endoplasmático. Impide la liberación del citocromo c, lo que sugiere que puede interaccionar de alguna forma con Bid (Korsmeyer *et al.*, 2000). La expresión de Bcl-2 impide la apoptosis producida por una gran variedad de estímulos por lo que se piensa que esta proteína estaría actuando en una de las últimas fases de un mecanismo común de apoptosis (Reed y Paternostro, 1999; Ruvolo *et al.*, 2001).

El factor Bcl-X es uno de los miembros de la familia Bcl-2 y se expresa como dos isoformas generadas por *splicing* alternativo, una larga, Bcl-X<sub>L</sub> y otra corta Bcl-X<sub>S</sub>. La forma larga, antiapoptótica, presenta los tres dominios BH, presentes en esta familia, mientras que la forma corta, proapoptótica, sólo presenta los dominios BH4 y BH3. Bcl-X<sub>L</sub> es un potente inhibidor de la muerte celular porque previene la liberación del citocromo c, que es un activador de la vía de las caspasas. Eso se lleva a cabo mediante la heterodimerización con Bax, Bak y Bcl-2. En cambio, Bcl-X<sub>S</sub> es un activador de la apoptosis (Gutierrez-Castellanos *et al.*, 2004).

El patrón de expresión de los homólogos de Bcl-2 en los distintos tejidos parece estar bien determinado, algunos se encuentran ampliamente distribuidos mientras que otros se encuentran limitados. Los homólogos de Bcl-2 regulan la apoptosis de una manera tejido-específica (Hsu y Hsueh, 2000).

Bcl-X<sub>L</sub> parece más eficiente que Bcl-2 inhibiendo la pérdida del potencial de membrana de la mitocondria (Kim, 2005). Así pues, el ratón *knockout* para Bcl-2 es viable aunque durante el desarrollo postnatal sufre una degeneración de las motoneuronas así como de las neuronas sensoriales (Michaelidis *et al.*, 1996). En cambio, el ratón deficiente en Bcl-X<sub>L</sub> es letal ya que muere en el día 13 del desarrollo embrionario (Motoyama *et al.*, 1995).

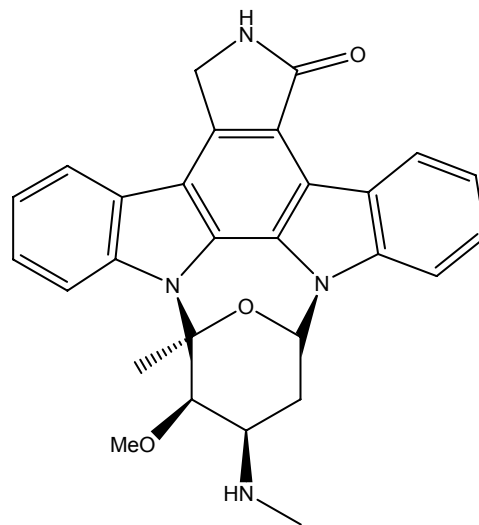
Frente a estímulos de muerte, el desarrollo o prevención de la apoptosis va a depender del balance intracelular entre los distintos miembros de la familia Bcl-2.

## **Inductores de apoptosis**

El mecanismo de muerte celular es el resultado del balance entre las señales activadoras de supervivencia y de muerte y está regulado por factores genéticos y ambientales. Entre los factores ambientales, se destaca la acción de sustancias hormonales y la influencia de células vecinas a las afectadas por el proceso de muerte.

Los factores que favorecen la muerte celular son de naturaleza variada. Entre ellos, se pueden destacar las citoquinas proinflamatorias, el estrés oxidativo, o efectores citotóxicos, así como el daño irreversible en el material genético.

En numerosos estudios experimentales *in vitro* se han empleado distintos inductores de apoptosis. Uno de los más ampliamente utilizados sobre células de origen neuronal es la staurosporina (STP), un potente inhibidor de la proteína quinasa C (PKC) y, en menor medida, de la proteína quinasa A. La STP es un producto natural originalmente aislado en 1977 de la bacteria *Streptomyces staurosporeus* (Omura *et al.*, 1977). La estructura química y la configuración estereoquímica absoluta fueron dilucidadas mediante análisis por cristalografía de rayos X (Funato *et al.*, 1994). Actualmente la STP es sintetizada químicamente en su totalidad. Se considera que la estructura química de la STP está compuesta por dos unidades: una molécula de azúcar modificado, la cual posee un único arreglo estereoquímico de sus átomos y una segunda unidad compuesta de un grupo heterocíclico del tipo indol carbazol.



**Estructura química de staurosporina**

Como se ha mencionado, la STP produce su efecto biológico mediante la interacción, o unión con distintas proteína-quinasas. Normalmente las quinasas tienen unida otra molécula, la adenosina trifosfato (ATP). Debido a la gran afinidad que posee por la molécula de ATP, la STP inhibe la unión de ésta a la quinasa.

### **Evidencias de la acción antiapoptótica de la eritropoyetina en el sistema nervioso**

En el contexto actual, en que cada vez más evidencias apoyan la hipótesis de que la Epo actúa fundamentalmente como soporte de la viabilidad celular, la activación del REpo desencadenaría la transducción de señales antiapoptóticas.

Ya han pasado diez años desde que se demostró que la Epo presenta actividad neurotrófica, situándola como una molécula multifuncional a nivel autocrino y paracrino (Juul *et al.*, 1998; Marti *et al.*, 1996). Entre los efectos denominados no-eritropoyéticos de la Epo se incluye su rol crítico en el desarrollo, mantenimiento, protección y reparación del sistema nervioso. Se ha demostrado que la

Epo es un factor autocrino-paracrino, capaz de regular la producción de células progenitoras neuronales a partir de células neuronales Stem (Shingo *et al.*, 2001).

La acción protectora de la hormona fue confirmada en cultivos de células neuronales frente a agresiones tales como privación de suero o de factores de crecimiento (Siren *et al.*, 2001). Aunque el mecanismo por el cual la Epo ejercería un efecto neuroprotector no se conoce con exactitud, han sido implicados como posibles mecanismos: la activación de la cascada de señalización que promueve el crecimiento celular por fosforilación de proteínas específicas (Siren *et al.*, 2001), la atenuación de la movilización de ion calcio y la disminución de la producción de óxido nítrico.

En la muerte celular por isquemia, el efecto antiapoptótico de la Epo estaría mediado por activación de la vía de PI3K y la posterior activación por fosforilación de Akt/PKB, la cual finalmente fosforila al factor proapoptótico Bad provocando su inactivación (Ruscher *et al.*, 2002). Otros trabajos en la misma línea de daño neuronal sugieren que la acción de la Epo estaría dada por una acción dual, tanto a nivel antiapoptótico, como a nivel de inducción de angiogénesis en dicho tejido (Marti *et al.*, 2000).

En modelos de hipoxia se ha demostrado que el tratamiento previo con Epo produce un efecto neuroprotector, y los daños producidos por el infarto cerebral son reducidos drásticamente (Siren *et al.*, 2001). En estos modelos se propone que la producción de Epo por parte de los astrocitos generaría un efecto de tolerancia a la hipoxia, como así también frente a otros agentes estresantes. En estos sistemas se sugiere que la neuroprotección generada por Epo se debe a la activación y expresión de la proteína Bcl-X<sub>L</sub>, miembro antiapoptótico de la familia de Bcl-2 (Wen *et al.*, 2002).

En los distintos modelos, donde se utilizan diferentes formas de generar el daño capaz de desencadenar o de inducir muerte celular programada, se ha observado la activación de distintos factores y por lo tanto, la apoptosis inducida se presenta con características variadas. El efecto neuroprotector de la Epo, a través de su unión al receptor, generaría la activación de distintas vías y la reversión de la muerte celular estaría mediada por distintos efectores o inhibidores de la muerte celular programada dependiendo de la causa del daño.

## **Procesos inflamatorios**

La inflamación (del latín *inflammatio*: encender, hacer fuego) es la forma de manifestarse de muchas enfermedades. Se trata de una respuesta inespecífica frente a las agresiones del medio, y está generada por agentes inflamatorios. La respuesta inflamatoria ocurre en tejidos conectivos vascularizados y surge con el fin defensivo de aislar y destruir al agente dañino, así como de reparar el tejido u órgano dañado. La inflamación se denomina en medicina con el sufijo -itis (faringitis, laringitis). El mayor problema que surge de la inflamación es que la defensa se dirige tanto hacia agentes dañinos como a los no dañinos, de manera que puede provocar lesión en tejidos u órganos sanos.

Los procesos inflamatorios, frecuentemente asociados a anemia de enfermedades crónicas (ACD, *anemia of chronic disease*), constituyen una causa importante de morbilidad y mortalidad. Se ha



propuesto que citoquinas inflamatorias, cuya producción podría aumentar en médula ósea y otros órganos de pacientes con ACD, tales como insuficiencia renal, artritis reumatoidea y cáncer, serían las responsables de efectos directos o indirectos sobre células eritroides. Por otra parte, el efecto proapoptótico de las citoquinas podría ser contrabalanceado por una acción antiapoptótica de la Epo (Elliott *et al.*, 2004; Koury *et al.*, 2002). Esta hipótesis se basa en que los mecanismos mediados por Epo y por citoquinas involucran factores comunes, algunos de los cuales, como NF- $\kappa$ B, intervienen en la regulación tanto de la eritropoyesis como de la respuesta inflamatoria (Krebs y Hilton, 2000; Zhang *et al.*, 1998).

## Citoquinas

Las citoquinas son polipéptidos solubles que ejercen control sobre funciones de diferentes tipos celulares, incluyendo crecimiento y diferenciación. Las citoquinas son liberadas al medio y al torrente sanguíneo para inducir respuestas locales o remotas, regulando las funciones de las células que las producen o las de otros tipos celulares. Actúan principalmente sobre receptores de membrana que activan caminos de señalización intracelulares mediante los cuales se induce la transcripción de genes *target* que se relacionan con la respuesta celular a la alteración del ambiente. Bajo condiciones fisiológicas, la expresión de citoquinas es baja pero puede ser regulada positivamente bajo condiciones patológicas, particularmente, en aquéllas que involucran inflamación.

Las citoquinas son los agentes responsables de la comunicación intercelular, ya que inducen la activación de receptores específicos de membrana, regulan funciones de proliferación y diferenciación celular y están involucradas en quimiotaxis, crecimiento celular y modulación de la secreción de inmunoglobulinas. Son producidas, fundamentalmente, por linfocitos y macrófagos activados, aunque también pueden ser producidas por leucocitos polimorfonucleares, células endoteliales y células epiteliales y del tejido conjuntivo. Según la célula que las produzca se denominan linfoquinas (linfocito), monoquinas (monocitos) o interleuquinas (células hematopoyéticas). Su acción fundamental está relacionada con la regulación del mecanismo de la inflamación.

Una característica importante de las citoquinas es su pleiotropía, de lo cual resulta la activación de caminos de señalización similares por parte de distintas moléculas, así como la activación de múltiples caminos por una sola molécula.

Las interleuquinas IL-1, IL-6 y el factor de necrosis tumoral TNF- $\alpha$  son consideradas citoquinas proinflamatorias aunque no siempre sus efectos son perjudiciales para los tejidos. La interleuquina IL-10 es una citoquina antiinflamatoria que fue asociada con efectos beneficiosos para el cerebro dañado.

## Factor de necrosis tumoral

La teoría de la respuesta antitumoral del sistema inmune fue descrita hace 100 años por el médico William B. Coley. En 1968, Gale Granger y colaboradores, de la Universidad de California, Irvine, informó sobre un factor citotóxico producido por los linfocitos y lo llamó "linfotóxina" (LT) (Kolb y

Granger, 1968). Más tarde, en 1975, Lloyd Old en el Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, Nueva York, informó de otro factor citotóxico producido por los macrófagos, y lo bautizó "factor de necrosis tumoral" (TNF) (Carswell *et al.*, 1975). Ambos factores fueron caracterizados sobre la base de su capacidad de matar células de fibrosarcoma L929 de ratón. Cuando se clonaron los ADNc de TNF y LT, en 1984 (Pennica *et al.*, 1984), se observó que eran muy similares. La unión del TNF a su receptor y su desplazamiento como LT confirmó la homología funcional entre los dos factores. La homología secuencial y funcional de TNF y LT dio lugar a la denominación de TNF- $\alpha$  al TNF, y de TNF- $\beta$  al LT. Posteriormente, fue reconocido que el TNF- $\alpha$  es la proteína típica, miembro de una gran familia de citoquinas, la familia de TNF.

El factor de necrosis tumoral, sustancia química que es liberada por células del sistema inmune, es una citoquina que tiene la capacidad de inducir tanto apoptosis como supervivencia celular, dependiendo de factores del entorno y de señales reguladoras que experimenta la célula en diferentes situaciones.

El TNF- $\alpha$  es miembro de un grupo de citoquinas que estimulan la fase aguda de la reacción inflamatoria. Se ha encontrado su participación en la inflamación y en la destrucción articular secundarias a artritis reumatoidea, así como en otras patologías.

El gen del TNF- $\alpha$  fue clonado en 1985 (Old, 1985), y se encuentra en el cromosoma 6 humano (6p21.3), se extiende a 3 Kb y presenta 4 exones. El último exón codifica para más de 80% de la proteína secretada (Nedwin *et al.*, 1985).

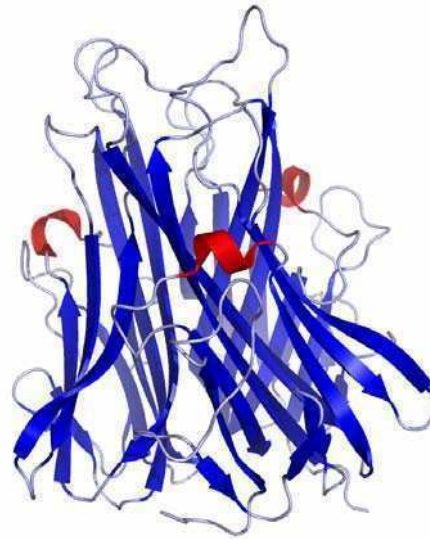
Este factor es producido principalmente como un precursor de 212 aminoácidos y con características de proteína transmembrana tipo 2 homotrimérica (Kriegler *et al.*, 1988; Tang *et al.*, 1996). A partir de esta proteína integral de membrana se libera la forma soluble homotrimérica del TNF- $\alpha$  mediante el clivaje producido por una metaloproteínasa denominada TACE (*TNF alpha converting enzyme*) (Black *et al.*, 1997). El TNF- $\alpha$  de 17 kDa (185 aminoácidos de longitud) se encuentra formado por dos hojas- $\beta$  antiparalelas con hojas- $\beta$  en sentido opuesto, formando una estructura  $\beta$  (*jelly roll*), típica de la familia del TNF.

El TNF- $\alpha$  ejerce distintas funciones en diferentes órganos; entre ellas, la activación de la producción de otros mediadores como las interleuquinas IL-1 e IL-6. La liberación de TNF- $\alpha$  produce activación local del endotelio vascular, liberación de óxido nítrico con vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular, lo cual conduce al reclutamiento de las células inflamatorias, inmunoglobulinas y proteínas del complemento, provocando la activación de linfocitos T y B. También aumenta la activación y adhesión plaquetaria y, probablemente, la inducción de oclusión vascular sea la causa de la necrosis tumoral, de donde proviene su nombre.

Aunque localmente los efectos del TNF- $\alpha$  son beneficiosos, sus efectos son desastrosos cuando TNF- $\alpha$  actúa en todo el organismo, provocando síndromes como *shock* séptico o coagulación intravascular diseminada.

Es posible la inhibición de TNF- $\alpha$  con anticuerpos monoclonales y la de su receptor celular, con infliximab (Remicade®), etanercept (Enbrel®), o adalimumab (Humira®), los cuales son usados en

tratamientos modernos de varias enfermedades autoinmunes como artritis reumatoidea, enfermedad de Crohn y psoriasis.



**Estructura del TNF- $\alpha$**

Las funciones del TNF- $\alpha$  se deben a su unión a dos receptores celulares que se localizan en diferentes células aunque también han sido hallados en estado soluble en el suero y en el líquido sinovial.

### **Receptores de TNF- $\alpha$**

Existen dos receptores para TNF- $\alpha$ , el receptor TNFR1 (también denominado CD120a; p55/60) y el receptor TNFR2 (CD120b; p75/80). TNFR1 y TNFR2 son receptores de muerte, familia que también incluye FAS y receptores de TRAIL.

TNFR1 se encuentra expresado constitutivamente en la mayoría de los tejidos, y puede ser activado tanto por la forma soluble homotrímica del TNF- $\alpha$  como por la forma unida a la membrana celular, mientras que TNFR2 se encuentra expresado, principalmente, en células del sistema inmune y responde mayoritariamente a la forma trimérica de TNF- $\alpha$  que se encuentra unida a la membrana plasmática.

La estimulación de estos receptores conduce a la formación de un complejo multimolecular llamado DISC (*death-inducing signaling complex*), formado por la asociación de moléculas adaptadoras a los dominios citoplasmáticos de los receptores de muerte. Estas moléculas adaptadoras, como TRADD (*Tumor necrosis factor receptor-associated death domain*) y FADD (*FAS-associated death domain*), reclutan a la procaspasa 8, la cual posee dominios de muerte en tandem (DEDs), para permitir su autoclivaje y consecuente activación.

Al igual que la procaspasa 8, FADD también posee dominios DEDs, a través de los cuales ambas proteínas interactúan para formar el complejo DISC.

La procaspasa 8 es clivada en tres pasos consecutivos para convertirse en caspasa 8 activada. De esta manera, se genera un heterotetrámero formado por dos subunidades p10 y dos p18. Los prodominios

de procaspasa 8 permanecen unidos al DISC mientras que los componentes del heterotetrámero que constituyen la caspasa 8 activa se separan del complejo para desencadenar la cascada de caspasas (Peter y Krammer, 2003). La activación de caspasa 8, iniciadora de apoptosis, remueve los prodominios de procaspasa 3 (ejecutora) activándola, lo cual, a su vez, clivará a distintas proteínas, entre las que se encuentra PARP, proteína nuclear que protege al ADN de su degradación.

Micheau y Tschopp propusieron que, para el desencadenamiento de la señalización apoptótica, se requiere la formación de dos complejos macromoleculares. El primer complejo se forma rápidamente en la membrana plasmática, concretamente en los *lipid rafts* (Legler *et al.*, 2003), y está compuesto de TNFR1, TRADD, RIP, TRAF2 (*TNFR-associated factor*) y cIAP1. Este complejo activa la señalización por NF- $\kappa$ B, pero no es capaz de inducir apoptosis. La unión de RIP, que permite la activación de vías de supervivencia a través de la activación de NF- $\kappa$ B, es crucial para el reclutamiento del complejo IKK, que está compuesto de dos subunidades catalíticas IKK $\alpha$  y IKK $\beta$  y la subunidad reguladora IKK $\gamma$  (NEMO). Entonces, NF- $\kappa$ B queda libre para bloquear señales apoptóticas, induciendo el incremento de expresión de proteínas antiapoptóticas como cIAP1, cIAP2, TRAF1, TRAF2 o FLIP (Fulda y Debatin, 2004). Por otro lado, NF- $\kappa$ B puede ejercer actividad antiapoptótica suprimiendo la actividad constitutiva de la vía Jun-quinasa (JNK) (Tang *et al.*, 2001). Un segundo complejo, que no contiene TNFR1, pero que incluye FADD, procaspasa 8 y procaspasa 10, se forma en el citoplasma. La formación de este complejo II induce apoptosis, dado que el complejo I no ha sido capaz de promover eficientemente la expresión de genes antiapoptóticos como FLIP (Micheau y Tschopp, 2003).

## **Interferencia de la acción de eritropoyetina por mecanismos inflamatorios**

### **Acción de citoquinas proinflamatorias sobre los mecanismos mediados por eritropoyetina**

Existen evidencias que adjudican a las citoquinas proinflamatorias un rol causal en la inhibición de la eritropoyesis provocando anemia de la enfermedad crónica. Sin embargo, el mecanismo por el cual actuarían, así como su rol en la resistencia a la terapia con rhuEPO está muy poco aclarado. Un estudio realizado en el año 2002 (Papadaki *et al.*, 2002) permitió asociar la anemia de enfermedad crónica de pacientes con artritis reumatoidea con un aumento de la apoptosis de células eritroides en médula ósea, signos que mejoraron después de un tratamiento con anti-TNF- $\alpha$  (Macdougall, 1995). La inflamación crónica modificaría el proceso de eritropoyesis mediante la producción exacerbada de citoquinas inflamatorias, tales como IL-1, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (Macdougall y Cooper, 2002). Estas asociaciones son probables si se tiene en cuenta que algunos factores, como el factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) están involucrados tanto en el proceso inflamatorio como en la eritropoyesis (Zhang *et al.*, 1998). En efecto, por un lado, este factor es rápidamente activado por condiciones de estrés celular, incluyendo lipopolisacáridos (LPS), citoquinas y factores de crecimiento. Por otro lado, en células de la línea eritroide humana TF-1, se detectó una posible acción regulatoria de NF- $\kappa$ B sobre genes involucrados en el proceso eritropoyético (Zhang *et al.*, 1998). Tanto Epo como citoquinas pro-

inflamatorias, promueven la expresión de proteínas SOCS, las cuales, a su vez, regulan negativamente la eritropoyesis así como la respuesta inflamatoria (Krebs y Hilton, 2000). Por último, el efecto proinflamatorio de citoquinas como el IFN- $\gamma$ , involucra la activación del sistema JAK-STAT acoplado a su receptor en forma similar al mecanismo desencadenado por Epo.

### **Interacción de citoquinas proinflamatorias y eritropoyetina en el sistema nervioso**

En astrocitos humanos se detectó una disminución de la expresión de Epo por acción de IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$ . El hallazgo simultáneo de un aumento en la expresión del REpo en neuronas debido al factor TNF- $\alpha$  fue interpretado por los autores como un mecanismo compensatorio por el cual las neuronas contrarrestarían la disminución de la producción de Epo en astrocitos causada por citoquinas proinflamatorias (Nagai *et al.*, 2001). Las citoquinas mencionadas indujeron también una disminución de la expresión del REpo en astrocitos mientras que tal expresión no fue afectada en células de la microglía. En conjunto, los resultados sugieren un rol regulatorio de las citoquinas mediadoras del proceso inflamatorio sobre la expresión de Epo y REpo en diferentes tipos celulares del sistema nervioso central (Nagai *et al.*, 2001).

Por otro lado, se sugiere que Epo podría mostrar un efecto neuroprotector a través de la inhibición de ciertos procesos o mecanismos involucrados en la inflamación de tejidos del sistema nervioso luego del daño producido por un agente estresante. Este efecto antiinflamatorio de Epo podría ser regulado a través de la activación del NF- $\kappa$ B, el cual es uno de los principales reguladores de genes relacionados con la inflamación (Baeuerle y Baltimore, 1996). Los procesos inflamatorios son regulados entre otros por la producción de óxido nítrico (NO) mediante la activación de la óxido nítrico sintetasa (NOS), la cual es regulada por medio de NF- $\kappa$ B. Epo regula los niveles de NO, lo cual podría sugerir una forma de regulación conjunta, la que finalmente produciría un efecto antiinflamatorio. La activación del REpo por unión con su ligando parecería también estar relacionada con la activación de NF- $\kappa$ B (Digicaylioglu y Lipton, 2001).

### **Uso terapéutico de la eritropoyetina**

La eritropoyetina humana recombinante fue desarrollada, inicialmente, para ser empleada en el tratamiento de la anemia secundaria a su déficit que caracteriza a las personas con enfermedad renal terminal. En estos pacientes su administración produce una estimulación de la formación de glóbulos rojos, lo cual evita o disminuye notablemente la necesidad de transfusiones sanguíneas, mejorando la calidad de vida, la tolerancia al ejercicio físico y la mejora de los aspectos psicológicos. En 1987, Eschbach reportó los resultados combinados de la fase I y II de pruebas con rhuEpo en pacientes renales en los cuales la anemia fue corregida (Eschbach *et al.*, 1987). Es así, como en 1989, la rhuEpo fue aprobada para su uso en pacientes con falla renal crónica.

Un estudio reciente analizó distintos aspectos de la vida del paciente con cáncer para valorar la diferencia en la calidad de vida de pacientes sometidos a tratamientos con rhuEpo. En el mismo se evaluaron la situación energética, la actividad diaria y la percepción global de la calidad de vida. Se

demonstró la notable mejora global de la calidad de vida de los pacientes tratados con rhuEpo sobre aquellos que no recibían el tratamiento (Henke *et al.*, 2003; Leitgeb *et al.*, 1994; Leyland-Jones, 2003).

Actualmente, se está evaluando la terapia con Epo para el tratamiento del síndrome de fatiga crónica, el síndrome mielodisplásico, la anemia aplásica, la osteomielofibrosis y las infecciones por HIV.

En la actualidad, el tratamiento con rhuEpo tiene reconocida eficacia para el manejo de la anemia y sus síntomas en pacientes renales, hematológicos y oncológicos. No obstante, hay que considerar algunos aspectos que impiden lograr los resultados esperados. Debido a la falta de hierro en algunos pacientes con anemia, el tratamiento con rhuEpo no siempre resulta exitoso, y aún no está clara la dosis y el período de administración de hierro a esos pacientes. Por otra parte, los tratamientos prolongados conducen a la aparición de efectos secundarios de la rhuEpo, tales como aumento de la viscosidad de la sangre e hipertensión sistémica. A ello hay que agregar el porcentaje de tratamientos ineficaces, debido a resistencia a la rhuEpo, especialmente, en pacientes cuyas patologías de base son acompañadas por procesos inflamatorios.

Las preparaciones originales de Epo recombinante (epoetina- $\alpha$  y  $\beta$ ) realizadas por ingeniería genética en células de ovario de hámster chino (CHO) transfectadas con el gen de Epo humano han sido utilizadas rutinariamente en la medicina clínica durante 20 años. Como las patentes de estos productos han caducado recientemente en la Unión Europea y en otros lugares, otros fabricantes comenzaron a producir otras preparaciones de eritropoyetina denominadas Biosimilares o Derivados Biológicos que ya se encuentran en el mercado. Los Biosimilares todavía tendrán que demostrar que son seguros y eficaces (Combe *et al.*, 2005; Schellekens, 2008). La Epoetina omega, un preparado de Epo recombinante humana producido en células de riñón de hámster (BHK), se ha aplicado en ensayos clínicos en algunos países fuera de la Unión Europea y los EE.UU. (Bren *et al.*, 2002; Sikole *et al.*, 2002). Se debe tener en cuenta que la estructura de los N-glicanos de la eritropoyetina producida en células CHO y la producida en células BHK difiere (Kawasaki *et al.*, 2001; Skibeli *et al.*, 2001). Otro producto nuevo es la Epoetina recombinante delta, que es producida por la activación de genes en células de fibrosarcoma humano (Línea HT-1080) en las que se transfectó un fragmento de ADN que activa el promotor de Epo (Spinowitz y Pratt, 2006).

El uso de terapia génica con Epo es una alternativa atractiva para la administración de drogas eritropoyéticas en pacientes anémicos (Bohl *et al.*, 1997; Naffakh *et al.*, 1995). Aquí, el principal problema es el de adaptar la producción de Epo a la concentración de hemoglobina en sangre. Rinsch y colaboradores fueron los primeros que, mediante ingeniería de líneas celulares, produjeron un sistema de liberación de Epo en humanos en función de la  $pO_2$  utilizando un vector conteniendo el ADNc de Epo dirigido por el promotor de la fosfoglicerato-quinasa que responde a hipoxia (Rinsch *et al.*, 1997). Lippin y colaboradores han realizado recientemente un estudio de terapia génica con Epo en pacientes con falla renal crónica. El gen de Epo humano se expresó bajo el control del promotor de Citomegalovirus (CMV). El nivel sérico de Epo aumentó a niveles terapéuticos desde el día 1 después de la implantación, alcanzando un máximo durante la primera semana de seguimiento. El aumento de

la concentración de Epo dio lugar a un transitorio aumento del recuento de reticulocitos. Según los autores implantación de estos sistemas de transducción con genes humanos podría constituir una herramienta útil para expresar proteínas terapéuticas en suero (Lippin *et al.*, 2005).

## **Neuroprotección**

La neuroprotección es una estrategia de tratamiento para enfermedades del sistema nervioso central de diferentes orígenes fisiopatológicos, tales como infarto, trauma, enfermedades neuroinflamatorias y neurodegenerativas. Su objetivo final es prevenir u oponerse a la pérdida neuronal (Siren y Ehrenreich, 2001). Hasta el momento, han sido muchos los agentes neuroprotectores que han tenido resultados muy prometedores en estudios con modelos animales de daño neurológico, y sin embargo los resultados de los ensayos clínicos se muestran decepcionantes, pues ninguno ha mostrado beneficios inequívocos en estudios de fase III, además de la toxicidad manifiesta en humanos (Siren y Ehrenreich, 2001). La excepción ha sido el activador tisular del plasminógeno, aunque tiene una utilidad limitada, por lo que todavía se continúa en la búsqueda de terapias aplicables de una forma más general para el tratamiento de la isquemia aguda y el infarto hemorrágico (Ovbiagele *et al.*, 2003). Actualmente, varios grupos de investigadores trabajan con la eritropoyetina humana recombinante como un novedoso agente neuroprotector.

## **Eritropoyetina recombinante y sistema nervioso central**

Se ha comprobado que la Epo y su receptor se expresan en el tejido cerebral, además de que su expresión aumenta durante la isquemia cerebral, hipoxia y anemia, lo que sugiere su participación en un sistema neuroprotector endógeno en el cerebro de mamíferos (Marti *et al.*, 2000). La efectividad de la Epo como neuroprotector ha sido probada en modelos de daño del sistema nervioso en ratón, rata, gerbo y conejo, incluyendo isquemia cerebral focal y global, donde se ha visto que reduce la muerte neuronal (Bernaudin *et al.*, 1999; Brines *et al.*, 2000; Calapai *et al.*, 2000; Catania *et al.*, 2002; Erbayraktar *et al.*, 2003; Sadamoto *et al.*, 1998; Sakanaka *et al.*, 1998; Siren y Ehrenreich, 2001; Siren *et al.*, 2001). Aunque todavía se investiga el mecanismo neuroprotector de la Epo, se ha planteado que potencia mecanismos antiapoptóticos y antioxidantes, base de su acción neurotrófica, antiinflamatoria, angiogénica y moduladora de la actividad neuronal (Ehrenreich *et al.*, 2004).

En la literatura se ha tratado también el tema de la entrada de la molécula al sistema nervioso central. Algunos autores indican que la Epo, con un tamaño molecular de alrededor de 30 kDa, supera el umbral para el transporte mediado por lípidos a través de la barrera hematoencefálica. El hallazgo de niveles elevados de Epo en el líquido cefaloraquídeo que no se correlacionan con los niveles en suero, aún bajo condiciones de integridad de la barrera hematoencefálica, subraya la importancia de la síntesis de Epo en el sistema nervioso central. Otros autores han empleado la vía sistémica en animales, pues hay evidencias de que la Epo atraviesa la barrera hematoencefálica y protege de manera efectiva el daño isquémico cerebral (Brines *et al.*, 2000). Recientemente se realizó un ensayo clínico, en el que se administraron altas dosis de Epo por vía endovenosa como tratamiento agudo en

la isquemia cerebral. En los resultados se obtuvo un mejoramiento significativo de los pacientes infartados (Ehrenreich *et al.*, 2002). En estudios experimentales, se ha reportado el uso de inyecciones intracerebroventriculares de Epo, con las que se ha obtenido una reducción del infarto en ratones con isquemia cerebral focal (Bernaudin *et al.*, 1999; Sadamoto *et al.*, 1998; Sakanaka *et al.*, 1998), aunque se comprende lo impracticable del método en la clínica.

La evidencia acerca de la capacidad de la Epo de atravesar la barrera hematoencefálica podría ser de importancia en cuanto a futuras terapias con Epo administrada en forma sistémica. Sin embargo, el uso de esa vía implica la necesidad de múltiples dosis elevadas de Epo para poder alcanzar los tejidos del sistema nervioso central (Wiessner *et al.*, 2001). Esto llevaría a un aumento no deseado de la masa de células eritroides o eritrocitosis, adicionando un factor de riesgo al organismo por complicaciones en el sistema circulatorio (hemoconcentración con poliglobulia) y fallo cardíaco (trombosis). Podemos mencionar que una situación similar ocurre con el uso, más bien el abuso de rhuEpo con propósitos de *dopping*. Los riesgos mencionados, aún más graves en individuos que no necesitan aumentar su masa de glóbulos rojos, justifican su prohibición.

Sin embargo, las cualidades citoprotectoras en ensayos con cultivos celulares y con animales hacen de la Epo una candidata interesante para el tratamiento de enfermedades neurológicas agudas y también para enfermedades neurodegenerativas.

El creciente número de investigaciones demuestra la importancia de la Epo desde el punto de vista de su acción farmacológica en un campo cada vez más amplio.



## **OBJETIVOS**

## **Objetivo general e hipótesis**

El rol biológico de la eritropoyetina se expandió a partir del hallazgo de la expresión de receptores de la hormona en otros tejidos, incluyendo el nervioso, y de la descripción de un potencial efecto neuroprotector. Más aún, en modelos preclínicos de daño isquémico neuronal, renal, cardíaco y retinal se ha descrito la protección tisular por Epo.

La inhibición de la apoptosis parece ser esencial para los efectos protectores de la Epo, habiéndose identificado diferentes vías de señalización responsables de esos efectos antiapoptóticos.

Por otra parte, se ha postulado que el efecto proapoptótico de citoquinas proinflamatorias podría ser contrabalanceado por la Epo, lo cual sugiere que los caminos de señalización mediados por Epo y por citoquinas involucran factores comunes.

El objetivo general de este proyecto consiste en avanzar en el conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares que median la acción antiapoptótica de la eritropoyetina y la interacción de los mismos con vías de señalización que involucran factores proinflamatorios.

El trabajo se basa en la siguiente hipótesis:

La eritropoyetina posee actividades antiapoptótica y antiinflamatoria, las cuales son afectadas por mediadores de respuesta inflamatoria que activan señales comunes.

## **Objetivos específicos**

Mediante un modelo de muerte celular programada en células de origen neuronal, se intentó responder las siguientes preguntas:

- ✓ ¿Es la staurosporina un inductor de apoptosis en células SH-SY5Y?
- ✓ ¿Expresan las células SH-SY5Y el receptor de eritropoyetina?
- ✓ ¿Es la eritropoyetina capaz de proteger de la apoptosis inducida por staurosporina a las células SH-SY5Y?
- ✓ ¿Cuáles son las vías activadas por eritropoyetina que participan de la acción antiapoptótica de la misma?
- ✓ ¿Regula eritropoyetina la expresión de los miembros de la familia Bcl-2?
- ✓ ¿Es el TNF- $\alpha$  capaz de inducir apoptosis en las células SH-SY5Y?
- ✓ ¿Es la eritropoyetina capaz de mantener la viabilidad de las células SH-SY5Y frente al daño inducido por TNF- $\alpha$ ?
- ✓ ¿Puede la eritropoyetina inducir un efecto antiapoptótico en las células SH-SY5Y tratadas con TNF- $\alpha$ ?
- ✓ ¿Es la eritropoyetina capaz de regular la expresión de los receptores de TNF- $\alpha$ ?

- ✓ ¿El efecto neuroprotector de eritropoyetina es mediado por la regulación de algunos factores de la familia de Bcl-2?
- ✓ ¿Es la eritropoyetina capaz de activar al factor NF- $\kappa$ B en las células SH-SY5Y?
- ✓ ¿La activación de STAT5 sigue la misma cinética que la de NF- $\kappa$ B?
- ✓ ¿Comparten eritropoyetina y TNF- $\alpha$  vías de transducción de señales?

## **MATERIALES**

## **Materiales**

### **I. Aparatos**

Espectrofotómetro UV/Vis Bechman DB.

Fuente de alimentación para electroforesis BioRad Powerpac 300.

Centrífuga refrigerada Hermle Z323K y centrífuga Eppendorff MiniSpin.

Incubador de CO<sub>2</sub> REVCO ULTIMA.

Cámara de bioseguridad y campana de flujo laminar Nuair Class Type II.

Microscopio óptico Nikon YS100.

Microscopio óptico invertido Zeiss Axiovert 135.

Microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E600 con equipo de fotografía digital Nikon CoolPix5000.

Microscopio Láser Confocal Olympus Fluoview.

Microscopio Electrónico de barrido Philips SEM 515.

Termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient.

Temociclador de tiempo real MJ Research Opticon 2.

Equipo transiluminador Hoeffler Macro Vue - UV20 con sistema de fotografía digital Kodak DC240.

Equipo de purificación de agua Millipore Simplicity 185.

Lector de Microplacas BioRad 680.

### **II. Reactivos**

Todos los reactivos empleados fueron de grado analítico. Los medios de cultivo E-MEM y Ham F12 y el SFB fueron obtenidos de GibcoBRL; los antibióticos penicilina y estreptomina (PAA Laboratories GmbH), a GEN S.A. Proteinasa K, reactivo Trizol (GibcoBRL), anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor 488 y los *primers* específicos para REpo, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-2, c-Flip, TNFR1, TNFR2 y GAPDH fueron adquiridos a Invitrogen Life Technologies y el marcador de pares de bases a Biodynamics. El anticuerpo monoclonal anti-REpo fue obtenido de R&D systems, el anticuerpo monoclonal anti-PARP y los anticuerpos policlonales anti-Bcl-2 y anti Bcl-X, de BD Biosciences, los anticuerpos monoclonales anti-NF-κB, anti-STAT5 y anti-histona H3, de Santa Cruz Biotechnology y el anticuerpo monoclonal anti-Actina de Sigma-Aldrich. Staurosporina, EDTA, Nonidet P40, LY294002, L-glutamina, paraformaldehído, fenilmetilsulfonil fluoride (PMSF), aprotinina, leupeptina, pepstatina A, colorante Hoechst 33258, dimetilsulfóxido y RNAasa libre de DNAasa fueron adquiridos a Sigma-Aldrich; bromuro de etidio (BrEt), a Mallinckrodt y la agarosa, a Promega. El reactivo DEPC, Taq polimerasa, dNTPs, los *kits Ready-To-Go-T-Primed First-Strand* y de quimioluminiscencia (ECL) y las membranas de nitrocelulosa Hybond fueron obtenidas de Amersham Biosciences. La eritropoyetina recombinante humana (rHuEpo, Hemax) fue gentilmente donada por Biosidus Argentina.

Se empleó agua ultra pura con resistividad específica de 18 MΩ (Milli-Q Water System, Millipore, USA) para el lavado del material y para la preparación de los reactivos y medios de cultivo.

### **III. Medios de cultivo**

#### **i. Medio de cultivo base**

EMEM, con sales de Earle y modificación Hepes (Gibco-BRL, Life Technologies). Ham-F12, mezcla de nutrientes esenciales (Gibco-BRL, Life Technologies). Fueron preparados con agua ultra pura, esterilizado por filtrado, fraccionado y conservado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Una vez descongelado, fue conservado a  $4^{\circ}\text{C}$ .

#### **ii. Medio de cultivo completo (EMEM:HAM-F12:SFB:antibióticos)**

Mezcla equivalente de EMEM:Ham-F12 (1:1) suplementada con 10% (v/v) de SFB, 100 U/ml de penicilina (Pen) y 100  $\mu\text{g/ml}$  de estreptomycin (Strep).

Los factores del complemento del SFB fueron inactivados por incubación en baño de agua a  $56^{\circ}\text{C}$  durante 30 min.

### **IV. Esterilización de materiales y soluciones**

El material fue esterilizado por calor seco ( $150^{\circ}\text{C}$ , 90 min), por calor húmedo ( $121^{\circ}\text{C}$ ; 1,5 atm; 30 min) o por radiación gamma, según las características del mismo.

Las soluciones termolábiles fueron esterilizadas por filtración a través de membranas de ésteres de nitrato y acetato de celulosa, con poros de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore), utilizando presión positiva de nitrógeno.

## **METODOLOGÍA**

## **Metodología**

### **I. Línea celular**

Se empleó la línea celular SH-SY5Y (CRL-2266), obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC). Es un clon de neuroblastoma humano proveniente de la sublínea celular SK-N-SH, la cual fue obtenida de un neuroblastoma metastático humano de la cresta neural del sistema nervioso simpático (Raguenez *et al.*, 1999). Presenta morfología de tipo epitelial y crecimiento adherente. Esta línea celular puede ser inducida a diferenciarse mediante el tratamiento con distintos agentes y resulta un modelo interesante y muy utilizado para estudiar mecanismos de funcionamiento de células neuronales.

#### **i. Mantenimiento de cultivos celulares**

La preparación de las soluciones y la manipulación de los cultivos fueron realizadas bajo estrictas condiciones de esterilidad (cámara de bioseguridad de clase II).

Las células SH-SY5Y fueron mantenidas en medio de cultivo completo (ver sección **Materiales**), conteniendo L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomina 100 µg/ml. El medio fue reemplazado cada 3 días. Los cultivos, desarrollados en frascos de 25 cm<sup>2</sup> o en placas de Petri de 35 mm, según las necesidades experimentales, fueron incubados a 37°C, en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> y 100% de humedad.

#### **ii. Procedimiento de congelación**

La preservación de líneas celulares por un período prolongado requiere de temperaturas extremadamente bajas con el fin de disminuir el metabolismo celular. El principal problema que presenta el congelamiento celular es la formación de cristales en el citoplasma que tienden a romper la membrana celular. Para evitar esto, se utilizó dimetil sulfóxido (DMSO) que permite que la temperatura intracelular descienda de manera gradual, evitando, mediante este procedimiento, la formación de cristales en el citosol.

Partiendo de cultivos en estado de confluencia, las células ( $\sim 6 \times 10^6$ ) fueron resuspendidas en 4 ml de medio de cultivo completo. A continuación, se centrifugó a 400 g, durante 10 min y se descartó el medio. Luego de un lavado con PBS estéril, el *pellet* fue resuspendido en medio de congelación (medio de cultivo completo:DMSO; 95:5). Se homogeneizó rápidamente y se colocaron volúmenes de suspensión de, aproximadamente, 1,2 ml en sendos criotubos.

El proceso de congelado se llevó a cabo almacenando los criotubos a -70°C en un contenedor "Mr. Frosty" (Nalgene), el cual permite obtener una velocidad de enfriamiento de 1°C/min, la cual es deseable para una óptima criopreservación. Cuando el sistema alcanzó la temperatura de -70°C, los criotubos fueron transferidos a atmósfera de nitrógeno líquido (-170°C).



### iii. Procedimiento de descongelación

Este procedimiento tiene como finalidad la eliminación del medio de congelación que contiene DMSO, molécula que resulta tóxica para las células en crecimiento.

El criotubo fue descongelado rápidamente en un baño a 37°C. Luego, se trasvasó el volumen total a un frasco de 25 cm<sup>2</sup>, agregándose 10 ml de medio de cultivo fresco, a fin de diluir los factores citotóxicos. Los cultivos se mantuvieron en estufa por 24 h. Tras dicha incubación, se aspiraron los 10 ml de medio y se agregaron 4 ml de medio fresco a las células ya adheridas al frasco. El medio retirado fue centrifugado a 1000 *g* por 5 min a fin de recuperar las células que no lograron adherirse aún. Después de eliminar el sobrenadante, el *pellet* fue resuspendido en 8 ml de medio fresco y, finalmente, dividido en partes iguales en dos frascos de 25 cm<sup>2</sup>.

En cada proceso de descongelación de un criotubo, una vez que el cultivo alcanzó el estado de confluencia, fue dividido en tres frascos para disponer así de material suficiente tanto para la realización de los experimentos como para la obtención de un nuevo *stock*, asegurando de esta forma la continuidad de la línea celular.

## II. Viabilidad y recuento celular

La viabilidad celular fue determinada mediante la prueba de exclusión de colorante supravital, en una dilución de la suspensión celular 1:2 con azul Tripán 2 g/l en PBS. El recuento de células en esta suspensión fue realizado en microscopio óptico con aumento de 400x, utilizando una cámara de Neubauer modificada (Vittori *et al.*, 2005).

## III. Observación de cambios morfológicos por microscopía óptica

Durante el proceso de diferenciación, las células SH-SY5Y desarrollan prolongaciones llamadas neuritas, mientras que el cuerpo celular sufre una disminución de su tamaño (Edsjo *et al.*, 2004).

Según el criterio morfológico, una célula de origen neuronal se diferencia cuando presenta neuritas cuya longitud es equivalente al doble de su soma (Lopez-Carballo *et al.*, 2002).

Conforme a dicho criterio, se realizó el recuento de células diferenciadas y no diferenciadas en imágenes obtenidas con aumento de 200x. Los cambios morfológicos fueron observados por microscopía de contraste de fase en un microscopio invertido (Axiovert 135, Carl Zeiss, Alemania). Se tomaron imágenes digitales (cámara digital Nikon Coolpix 5000) usando aumentos de 200x y 400x.

## IV. Análisis del desarrollo de neuritas

En imágenes observadas con aumento de 200x, se seleccionaron 10 neuritas al azar en cada uno de 5 diferentes campos con el objeto de cuantificar la longitud de las mismas. La medición se realizó empleando el software Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA), con el *Neuron Morpho* como *plugin*, el cual sirve como herramienta de determinación del parámetro ya mencionado.

## V. Ensayo de MTT

Esta metodología fue empleada en el análisis de la viabilidad y la proliferación celular. El colorante amarillo de tetrazolio (MTT) (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) es reducido por las células metabólicamente activas, en particular por la acción de enzimas deshidrogenasas mitocondriales. El producto resultante es el formazán, de color púrpura, que es solubilizado mediante una solución adecuada y cuantificado por espectrofotometría.

Mediante el ensayo de MTT se puede estimar la tasa de proliferación celular y, por consiguiente, puede determinarse la viabilidad de un cultivo cuando distintos eventos llevan a la apoptosis celular.

Para cada tipo celular debe estandarizarse el número inicial de células, puesto que se debe trabajar en la zona donde existe linealidad entre el número de células analizado y la señal de formazán medido.

Básicamente, se realizaron incubaciones de cultivos celulares de 24 h realizados en cajas de Petri de 35 mm por triplicado con los tratamientos indicados. Las células fueron trasvasadas a un tubo tipo Eppendorff al que se agregó el reactivo de MTT en una concentración final de 0,5 mg/ml. Se incubó por 4 h a 37°C y se centrifugó a 5000 *g* durante 10 min. Se agregaron 100  $\mu$ l de una solución 0,04 M de HCl en isopropanol para disolver los cristales formados por la reducción del MTT. Después de homogeneizar, se colocaron 200  $\mu$ l en cada pocillo de una placa. Se procedió a la lectura de absorbancia en un equipo lector de placas con filtro de 570 nm, restándole la lectura de referencia a 655 nm. Se realizaron controles positivos y negativos por triplicado para asegurar la validez del ensayo.

## VI. Determinación de apoptosis

### i. Detección de fragmentación de ADN.

Las células cultivadas ( $3 \times 10^6$  cél/ml) fueron resuspendidas en medio de cultivo y trasvasadas a un tubo de centrifuga. Luego de centrifugación a 1000 *g* durante 5 min a 4°C, se descartó el sobrenadante, se realizaron los lavados correspondientes y el *pellet* fue resuspendido en 0,5 ml de *buffer* de lisis (NaCl 0,1  $\mu$ M; EDTA 25 mM; Tris-HCl 10 mM pH 8,0; Nonidet P40 1% v/v). Después de incubar durante 10 min a temperatura ambiente, se centrifugó por 5 min a 4000 *g*. El sobrenadante obtenido fue tratado con 6  $\mu$ l de solución de RNasa A 100  $\mu$ M libre de DNasa y 13  $\mu$ l de SDS 10%, durante 2 h a 56°C. La solución fue, posteriormente, tratada con 3,6  $\mu$ l de Proteinasa K 50 mg/ml durante 16 h a 37°C para eliminar contaminantes de naturaleza proteica. Finalizada la incubación, el ADN fue precipitado con 75  $\mu$ l de acetato de amonio 10 M y 450  $\mu$ l de etanol absoluto. Luego de 10 min, se centrifugó a 15000 *g* durante 15 min a 6°C para lograr la precipitación del ácido nucleico. Después de haber descartado el sobrenadante, el *pellet* fue resuspendido en 50  $\mu$ l de agua deionizada estéril.

Las muestras (10  $\mu$ l) fueron sometidas a desarrollo electroforético en gel de agarosa 2% con bromuro de etidio (0,5  $\mu$ g/ml), bajo un campo eléctrico de 10 V/cm durante 90 min. Las bandas fueron observadas bajo transiluminador UV y las imágenes fueron digitalizadas.

## ii. Recuento diferencial de células teñidas con colorante Hoechst

El colorante Hoechst es una molécula con capacidad para intercalarse entre las bases del ADN. El ADN teñido con dicho colorante y excitado con luz de longitud de onda apropiada ( $\lambda = 360$  nm) emite fluorescencia de color azul brillante. Se utilizó microscopio de fluorescencia para realizar el recuento diferencial de células apoptóticas, identificándolas por la morfología e intensidad de fluorescencia del núcleo.

Los cultivos de células SH-SY5Y fueron desarrollados sobre cubreobjetos previamente esterilizados por tratamiento con etanol 96° y calor y colocados en placas de Petri estériles de 35 mm de diámetro. Después de una incubación de 24 h a 37°C, en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> y 100% de humedad, las muestras fueron tratadas según los requerimientos del ensayo. Luego de finalizados los tratamientos, las células fueron fijadas durante 20 min con solución de paraformaldehído (4% v/v en PBS). Descartada la solución de fijación, se expuso el preparado al reactivo de Hoechst 33258 (0,05 g/l en PBS) por 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Con el fin de retirar remanentes de dicho colorante, se realizaron tres lavados con PBS, finalizando el procedimiento con el montaje del preparado en sentido invertido sobre un portaobjetos, empleando para ello una solución de glicerol (50% v/v en PBS).

La cuantificación de núcleos apoptóticos fue realizada mediante el recuento de 500 células, empleando microscopía de fluorescencia, bajo filtro de 365 nm. Las imágenes fueron digitalizadas.

## iii. Ensayo colorimétrico de medición de la actividad de caspasa 8

Para la determinación de la actividad de esta enzima, la cual está involucrada en los primeros pasos de la cascada proteolítica de la familia de caspasas, se utilizó un ensayo colorimétrico mediante el cual se pone en evidencia dicha activación por la liberación de la sustancia coloreada para-nitroanilina (pNA). Para esto, se utilizó un compuesto formado por una serie de cuatro aminoácidos (Ile-Glu-Tre-Asp) unido a la molécula de pNA (IETD-pNA). Dicha secuencia de aminoácidos es reconocida en forma específica por la caspasa 8 y es allí donde se produce el clivaje que libera a la sustancia coloreada.

Las células fueron recogidas por centrifugación a 1000 *g* por 5 min a 4°C. El sobrenadante fue eliminado y descartado mientras que el *pellet* fue resuspendido en 100  $\mu$ l de *buffer* de lisis (HEPES 50 mM pH 7,4; CHAPS 5mM), DTT en concentración final de 5 mM y el inhibidor de proteasas PMSF (1mM). Los dos últimos fueron agregados al momento de usar. El lisado celular fue incubado en hielo durante 30 min y luego, centrifugado a 15000 *g* durante 20 min. Para la reacción, se tomaron 50  $\mu$ l del lisado celular, se agregaron 50  $\mu$ l de *buffer* de reacción (20 mM de HEPES pH 7,4; 2 mM de EDTA; 5 mM de DTT; 1% CHAPS; 50% de sacarosa) y 5  $\mu$ l de una solución 20 mM IETD-pNA, el sustrato cromogénico de caspasa 8. Todos los reactivos fueron agregados en cada pocillo de una placa. Se leyó la absorbancia a 405 nm cada 10 min durante 4 h, empleando un lector de microplacas.

## iv. Ensayo colorimétrico de medición de la actividad de caspasa 3

La actividad de caspasa 3 fue determinada en lisados celulares utilizando el sustrato sintético DEVD-pNA (Asp-Glu-Val-Asp-paranitroanilina), tetrapéptido ampliamente utilizado para detectar y cuantificar la actividad de caspasa 3 en células apoptóticas (Nicholson *et al.*, 1995). La caspasa 3 proteoliza el sustrato entre el residuo de ácido aspártico y la molécula de para-nitroanilina. Al liberarse esta última, puede ser detectada mediante un espectrofotómetro. Cada ensayo fue realizado utilizando  $10^7$  células. Se realizaron dos lavados con 1 ml de PBS, centrifugando a 1000 *g* durante 5 min. El *pellet* celular se resuspendió en 100  $\mu$ l de *buffer* de lisis (HEPES 50 mM pH 7,4; CHAPS 5 mM), adicionando DTT en concentración final 5 mM y el inhibidor de proteasas PMSF (1 mM) en el momento de usar. Se incubó durante 30 min en hielo con agitaciones esporádicas mediante vortex. Se centrifugó a 15000 *g* durante 20 min a 4°C. Los lisados celulares (50  $\mu$ l) fueron transferidos a una placa de 96 pocillos y se agregaron 10  $\mu$ l de sustrato Ac-DEVD-pNA 7,8 mM, completando el volumen hasta 100  $\mu$ l con *buffer* de reacción (HEPES 100 mM pH 7,4; EDTA 0,5 mM; DTT 5mM; glicerol 20% v/v). Después de incubar a 37°C por 4 h, se leyó la absorbancia a 415 nm en lector de placas.

#### **v. Detección de clivaje de PARP**

La proteólisis, a diferencia de la mayoría de las modificaciones postraduccionales, es irreversible y altamente específica. PARP (*poly-ADP-ribose-polymerase*) es una proteína nuclear que se activa con el fin de reparar el ADN. Durante la apoptosis, PARP es blanco de inactivación por clivaje mediado por varias proteasas, entre las cuales se encuentran las caspasas. El patrón de bandas de clivaje se utiliza para la identificación de las proteasas involucradas.

La identificación del clivaje de PARP en los distintos tratamientos experimentales fue realizada por *western blotting* empleando el anticuerpo monoclonal primario anti-PARP en dilución 1:500 y el sistema de detección quimioluminiscente ECL.

### **VII. Análisis de la expresión génica por RT-PCR y *Real Time*-PCR**

Mediante RT-PCR y *Real Time*-PCR se analizó la expresión de distintos genes. Como control interno de la reacción y cuantificación se utilizó el producto de amplificación de GAPDH (gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa).

#### **i. Extracción de ARN**

El ARN total de  $5 \times 10^6$  células fue extraído mediante incubación durante 5 min a temperatura ambiente con 0,5 ml de reactivo de fenol e isotiocianato de guanidina (Trizol Reagent, GibcoBRL) de acuerdo al método de Chomczynski (Chomczynski y Sacchi, 1987). Se agregó 0,1 ml de cloroformo y se agitó vigorosamente durante 15 s. Luego de 3 min, se centrifugó a 9500 *g* a 4°C por 15 min. La fase orgánica fue descartada. Se agregaron 0,25 ml de alcohol isopropílico a la fase acuosa y se incubó 10 min a temperatura ambiente. Al finalizar este tiempo, se centrifugó 10 min a 9500 *g*.

El ARN contenido en el *pellet* fue lavado con 0,5 ml de etanol 75% agitando vigorosamente y centrifugando a 7500 *g* durante 5 min. El ARN fue disuelto en 30  $\mu$ l de agua conteniendo 0,1% (v/v) de DEPC, compuesto que destruye ARNasas, e incubado 10 min a 60°C. Una alícuota de esta solución se utilizó para medir las absorbancias a 260 y 280 nm en espectrofotómetro. La concentración de ARN total fue calculada considerando que 1 unidad de densidad óptica corresponde a 40  $\mu$ g/ml de ARN simple cadena (Sambrook y Russell, 2001). La relación de  $A_{260}/A_{280}$  del ARN aislado se encontró entre 1,6 y 1,8. Estos valores concuerdan con los valores de preparaciones puras de ARN. En este paso se estudió la integridad del ARN mediante electroforesis en agarosa 1% (p/v) en *buffer* TEB (Tris 90 mM; EDTA 2 mM; ácido bórico 90 mM; pH 8 en H<sub>2</sub>O-DEPC 0,1%, v/v) y BrEt 0,5 mg/l.

El ARN total (1  $\mu$ g) fue mezclado con 5  $\mu$ l de *buffer* de siembra (azul de bromofenol 0,25% (p/v); sacarosa 40% (p/v) en *buffer* TBE) y sembrado en el gel. La electroforesis se desarrolló a 280 V durante 25 min. La integridad del ARN ribosomal (28S y 16S) fue observada mediante la detección de las bandas en un transiluminador por observación de las señales emitidas por el BrEt intercalado en el ARN.

El ARN total fue fraccionado y conservado a -70°C hasta el momento de su utilización.

## ii. Obtención de ADN copia

El ADNc fue sintetizado a partir del ARN total extraído por transcripción reversa de los ARNm utilizando oligo(dT) como *primer* y la enzima transcriptasa reversa, empleando el *kit* optimizado "Ready To Go T-Primed First-Strand Kit".

La síntesis de ADNc fue realizada a partir de 2,5  $\mu$ g de ARN total, de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

El ADNc fue fraccionado y conservado a -20°C hasta el momento de su utilización.

## iii. Diseño de *primers*

Las secuencias del ARNm fueron obtenidas de la base de datos del *National Center for Biotechnology Information (NCBI Sequence Viewer)*, del *National Institutes of Health, USA*.

Los *primers* utilizados para amplificar la secuencia correspondiente al ARNm del REpo fueron fabricados de acuerdo a Shimizu y colaboradores. Este par de *primers* amplifica dos secuencias de distinta longitud del REpo, una de 718 pares de bases (pb) que amplifica el ARN del receptor completo y otra de 813 pb que amplifica el ARN de un receptor truncado de Epo (Shimizu *et al.*, 1999).

REpo            *sense*: 5' - tctgaagcagaagatctggcc - 3'  
                  *antisense*: 5' - gatcatctgcagcctggtgt - 3'

Se realizaron ensayos en paralelo utilizando GAPDH como control semicuantitativo. Los *primers* para amplificar un fragmento de 240 pb de la secuencia de esta enzima fueron fabricados de acuerdo a McKinney (McKinney y Robbins, 1992).

GAPDH            *sense*: 5' - tgatgacatcaagaagggtggaag - 3'  
                      *antisense*: 5' - tccttgaggccatgtaggccat - 3'

Para realizar la amplificación mediante *Real Time*-PCR se utilizaron los siguientes *primers* para REpo. La secuencia de los mismos fue obtenida de un trabajo realizado por Yokomizo y el amplicón constaba de 181 pb (Yokomizo *et al.*, 2002).

REpo              *sense*: 5' - tggtatctgactctggcatctc - 3'  
                      *antisense*: 5' - tcctgatcatctgcagcc - 3'

La secuencia utilizada para la obtención de los *primers* para la amplificación de los mensajeros de los distintos receptores de TNF- $\alpha$  fue obtenida de Yang. Los amplicones resultantes constaban de 365 pb para el TNFR1 y 376 pb para el TNFR2 (Yang *et al.*, 2002).

TNFR1            *sense*: 5' - tcgatttgctgtaccaagtg - 3'  
                      *antisense*: 5' - gaaaatgaccaggggcaacag - 3'

TNFR2            *sense*: 5' - ccagtgcgttgacagaa - 3'  
                      *antisense*: 5' - ggcttcatcccagcatca - 3'

En el caso de la amplificación para medir la expresión de Bcl-2 y Bcl-X, las secuencias de los *primers* fueron obtenidas de trabajos de Silva y colaboradores. El amplicón resultante era de 367 pb para Bcl-2 y 340 pb para Bcl-X (Benito *et al.*, 1996; Silva *et al.*, 1996).

Bcl-2              *sense*: 5' - agatgtccagccagctgcacctgac - 3'  
                      *antisense*: 5' - agcttgcacaccctgggtgcctatct - 3'

Bcl-X              *sense*: 5' - cgggcattcagtgacctgac - 3'  
                      *antisense*: 5' - tcaggaaccagcgggtgaag - 3'

Finalmente, para la amplificación del gen de c-Flip se utilizaron las secuencias de los *primers* del trabajo de Rippo y colaboradores (Rippo *et al.*, 2004). El amplicón obtenido es de 226 pb.

c-Flip             *sense*: 5' - aattcaaggctcagaagcga - 3'

*antisense*: 5' - ggcaaaactctgctgttcc - 3'

#### **iv. Amplificación de los fragmentos de ADNc por PCR**

Para comenzar la PCR, se preparó una mezcla de reacción en *buffer* Tris-HCl 10 mM pH 8,3; KCl 50 mM; MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, conteniendo Taq polimerasa 25 U/ml; *primers* 0,25 μM y dNTPs 200 μM. Con el fin de optimizar las condiciones de amplificación, se estandarizaron las cantidades de ADNc inicial y temperatura de *annealing* (temperatura en la cual se unen los *primers* a las hebras de ADN). Una vez decididos estos parámetros se realizó una curva de número de ciclos térmicos para evaluar la cantidad óptima de ciclos a utilizar, trabajando de esta forma en una zona donde hay linealidad entre cantidad inicial de mensajero y cantidad de producto final, evitando saturación de la señal.

En cada ensayo de amplificación fue incluido un control negativo, en el cual se excluyó el agregado de ADNc. El objetivo de este control fue comprobar que los diferentes reactivos empleados no se hubieran contaminado con ADN externo.

#### **v. Análisis de los productos de amplificación**

Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa 1,5% (p/v). Cada producto de PCR (10 μl) fue mezclado con 4 μl de *buffer* de siembra (ver VII.i) y sembrado en el gel. En sendas calles, se sembraron un marcador de pares de bases para realizar el control del tamaño de los fragmentos amplificados y un control negativo de PCR. Para la electroforesis se emplearon las condiciones previamente descritas en la sección VII.i.

Los productos de amplificación obtenidos fueron detectados mediante la observación en transiluminador de las señales emitidas por el BrEt intercalado en los productos de PCR. Los geles fueron fotografiados empleando una cámara digital y las fotografías, analizadas utilizando dos programas digitalizadores de imagen: Array Gauge e Image Gauge (Fujifilm).

Los niveles de intensidad de las bandas de los distintos factores analizados fueron normalizados por los valores correspondientes al estándar interno GAPDH (Sambrook y Russell, 2001).

#### **vi. Precauciones para mantener la calidad del procedimiento**

Todos los procedimientos previamente descritos para la técnica de RT-PCR fueron realizados en gabinete de seguridad biológica tipo II y se emplearon guantes descartables con el objeto de evitar la introducción de ADN y ARNasas foráneas.

El material plástico descartable, utilizado para la extracción de ARN, así como para las reacciones de RT-PCR, fue adquirido libre de enzimas que degradan ADN (ADNasas) y ARN (ARNasas).

El material plástico no descartable, así como la cuba electroforética fueron tratados con una solución de NaOH 0,5 M durante 10 min y, posteriormente, enjuagados con H<sub>2</sub>O-DEPC con el objeto de inactivar ARNasas.

Todo el material plástico fue esterilizado por autoclavado.

## vii. Desarrollo electroforético y obtención de imágenes

Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa 1,5% con adición de BrEt. Los geles fueron preparados con *buffer* TBE (Tris-Bórico-EDTA) y desarrollados sumergidos en agua como sistema refrigerante.

Luego del desarrollo electroforético, los productos de PCR fueron visualizados mediante transiluminador UV y fotografiados con equipo de fotografía digital.

## viii. *Real Time-PCR*

El análisis cuantitativo fue realizado utilizando los *primers* descritos en iii, mediante *Real Time-PCR*, una variante de la PCR convencional que se basa en la detección y cuantificación simultánea de la fluorescencia emitida por los productos de PCR que se acumulan durante el proceso de amplificación.

Preparamos una *master mix* conteniendo el colorante fluorescente Sybr Green, que es un colorante que se une al ADN de doble cadena por el surco menor, incrementando su fluorescencia unas cien veces y permitiendo la cuantificación en tiempo real de los productos de PCR.

Se realizaron curvas control de diluciones seriadas utilizando diluciones entre 1:4 y 1:256.

Como control interno se utilizó GAPDH, realizando, también su cuantificación mediante la curva control del mismo.

## VIII. Extractos celulares y fraccionamiento subcelular

### i. Lisis celular

Las células ( $0,5-1 \times 10^7$ ) fueron lisadas con 100  $\mu$ l de *buffer* hipotónico (Tris 50 mM, pH 8; NaCl 150 mM; Tritón X-100 1%) conteniendo inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM; aprotinina 1  $\mu$ g/ml y leupeptina 2  $\mu$ g/ml) y  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  1 mM. Luego de 30 min de incubación a 0°C con agitación esporádica mediante *vortex*, el material insoluble fue removido por centrifugación a 13000 *g* durante 15 min.

### ii. Fraccionamiento subcelular

Después de los tratamientos, los cultivos celulares ( $2 \times 10^6$  células) fueron colocados en hielo, despegados de la botella de cultivo y lavados dos veces con 1,5 ml de PBS frío. Se centrifugó a 1000 *g* durante 5 min y se resuspendió en *buffer* A (HEPES 10 mM pH 7,9; KCl 10 mM; EDTA 0,1 mM; EGTA 0,1 mM; DTT 1 mM; PMSF 0,5 mM) complementado con 0,5% Nonidet P-40. Se centrifugó a 15000 *g* durante 20 min. El sobrenadante, conteniendo la fracción citoplasmática, fue separado y conservado a -20°C. El *pellet* conteniendo la fracción nuclear fue resuspendido en 50  $\mu$ l de *buffer* B (Tris 10 mM pH 7,5; urea 7,0 M; SDS 1%; acetato de sodio 0,3 M; EDTA 20 mM) e incubada a 4°C durante 30 min, agitando esporádicamente. El extracto nuclear fue centrifugado por 15 min a 15000 *g* a 4°C y el sobrenadante conservado en alícuotas a -70°C.



### iii. Inmunoprecipitación

La misma cantidad de células que la utilizada para la lisis celular fue tratada con *buffer* de lisis y posterior agregado de 2 µg/ml de anticuerpo específico durante 1 h a 4°C bajo agitación constante. Al cabo de ese tiempo, se agregaron 20 µl de una suspensión de 1 mg/ml de proteína A agarosa y, luego de una noche de incubación a 4°C con agitación, se colectaron los inmunoprecipitados por centrifugación a 15000 *g*, a 4°C por 15 min y fueron lavados 2 veces en *buffer* hipotónico con inhibidores de proteasas.

### iv. Cuantificación de proteínas

Se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

## IX. Fraccionamiento y desarrollo electroforético

### i. SDS-PAGE de proteínas

Se realizó la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) de los lisados celulares o inmunoprecipitados, empleando el sistema discontinuo de Laemmli (Laemmli, 1970). En geles SDS-PAGE de tamaño de poro adecuado, la diferencia de movilidad electroforética de las proteínas se basa en diferencias entre sus tamaños moleculares, dado que el tratamiento con SDS equipara la densidad de carga superficial de las mismas.

La concentración de monómero (T) en el gel concentrador fue de 4% (acrilamida 39 g/l; bisacrilamida 1 g/l; SDS 1 g/l en Tris-HCl 125 mM; pH 6,8). Como catalizador de la polimerización se empleó N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED  $\delta=0,77\pm0,02$  g/l) 0,3 ml/l y persulfato de amonio 0,37 g/l como iniciador.

El T en el gel separador fue de 8% (acrilamida 78 g/l; bisacrilamida 2,1 g/l; SDS 1 g/l; TEMED 0,3 ml/l; persulfato de amonio 0,37 g/l en Tris-HCl 375 mM; pH 8,8).

Las proteínas fueron solubilizadas en *buffer* de muestra (Tris-HCl 62,5 mM; pH 6,8; conteniendo SDS 2% (p/v); 2-mercaptoetanol 5% (v/v); glicerol 10% (v/v) y azul de bromofenol 0,01 g/l) por calentamiento a ebullición durante 1 min. Una masa de 30-100 µg de proteínas fue sembrada en cada calle y en cada gel fue incluido un marcador de pesos moleculares preteñido.

La electroforesis fue desarrollada a corriente constante de 20 mA durante el proceso de isotacoforesis en el gel concentrador y 25 mA en el gel separador. Para el reconocimiento de las calles se utilizó como técnica de coloración la de rojo Ponceau.

### ii. Electrotransferencia y *Western blotting*

Las proteínas fueron analizadas por SDS-PAGE (T: 8, 10 ó 12 %, dependiendo del tamaño de los productos proteicos a analizar) y, posteriormente, electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa (NC) a 100 V durante 90 min.

Las NC fueron bloqueadas con agente bloqueante ECL 5% en TBS-Tween 20 0,1% (TBS-T) durante 1 h y luego incubadas 1 h con el anticuerpo monoclonal correspondiente diluido en TBS-T. Luego de un lavado en TBS-T durante 15 min y otros dos durante 10 min, las NC fueron incubadas durante la noche con el segundo anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa diluido 1:1.000 en TBS-T y, posteriormente, lavadas de igual forma. Una vez finalizados los lavados, las NC fueron reveladas mediante equipo de revelado DarkBoxII de la marca FujiFilm (Japón), utilizando los reactivos del *kit* ECL para *Western blotting*. Esta técnica utiliza un método de emisión de luz, mediante reactivo Luminol, para detectar antígenos específicos inmovilizados con un anticuerpo conjugado con peroxidasa.

### Tabla de anticuerpos utilizados

Anticuerpo Primario	Dilución	Anticuerpo secundario	Dilución
Anti-REpo	1:100	Anti-mouse -HRP	1:1000
Anti-Bcl-2	1:200	Anti-mouse -HRP	1:1000
Anti-PARP	1:500	Anti-mouse -HRP	1:1000
Anti-Bcl-X	1:200	Anti-rabbit -HRP	1:1000
Anti-STAT5	1:200	Anti-rabbit -HRP	1:1000
Anti-Actina	1:250	Anti-mouse -HRP	1:1000
Anti-NF- $\kappa$ B	1:100	Anti-mouse -HRP	1:1000

### iii. *Stripping*

Después de efectuar el procedimiento anterior, en algunos análisis, las NC fueron reutilizadas nuevamente con el fin de identificar otras proteínas, por ejemplo: proteínas fosforiladas o proteínas de estandarización (actina en el caso de citoplasma e histona 3 en caso del núcleo).

Para remover completamente el primer y segundo anticuerpo, las NC fueron incubadas en *buffer* de *stripping* (2-mercaptoetanol 100 mM; SDS 2%; Tris-HCl 62,5 mM; pH 6,7) a 50°C por 30 min bajo agitación. Posteriormente fueron lavadas 2 veces con TBS-T durante 10 min, a temperatura ambiente. Las NC fueron bloqueadas e incubadas durante la noche a 4°C con el anticuerpo correspondiente. Luego del lavado, fueron incubadas 1 h con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa diluido 1:1000 en TBS-T durante 2 h a temperatura ambiente y posteriormente lavadas.

El revelado por quimioluminiscencia se efectuó como fue detallado en el punto anterior.

## X. Microscopía confocal

Los cultivos celulares fueron desarrollados sobre cubreobjetos de vidrio de 18 mm de lado en cajas de Petri de 35 mm. Luego de obtener cultivos con 50% de confluencia, fueron desarrollados los distintos tratamientos.

Todo el procedimiento siguiente fue realizado manteniendo las cajas de cultivo sobre hielo. Luego de descartar el medio de cultivo, se efectuaron 2 lavados de 10 min con PBS frío. Estos lavados fueron repetidos entre cada paso del procedimiento. Se fijaron las células durante 30 min con alcohol metílico frío. Se realizó el bloqueo con albúmina 3% en PBS durante 1 h. Se procedió a la incubación con el anticuerpo primario durante toda la noche. Al día siguiente, después de los lavados, se agregó el anticuerpo secundario conjugado con fluorocromo Alexa Fluor 488. Se realizó la tinción de los núcleos utilizando el colorante ioduro de propidio.

El preparado fue analizado en microscopio confocal utilizando los láseres apropiados. Las imágenes fueron obtenidas digitalmente. Para corroborar la co-localización se realizó un barrido secuencial.

## **XI. Microscopía electrónica de barrido**

La observación morfológica de las células fue realizada en un microscopio electrónico de barrido, mediante el cual se analizaron imágenes tridimensionales de la superficie celular con una elevada resolución.

### **i. Preparación de las muestras**

Aproximadamente  $1 \times 10^4$  células fueron depositadas sobre un pequeño soporte de vidrio de 7 mm de lado. La muestra fue fijada con glutardialdehído 3% (v/v) en *buffer* fosfato 0,1 M pH 7,4 durante 20 min. A continuación se efectuaron 3 lavados con *buffer* fosfato. Las soluciones de fijación y lavado fueron retiradas por absorción con papel de filtro. Finalmente, las muestras fueron sometidas a un proceso de deshidratación, sumergiéndolas sucesivamente en acetona 25%, 50%, 75%, 80%, 90%, 95% y 100%, repitiendo cada operación tres veces. Para completar el secado de la muestra biológica se efectuó el punto crítico (Balzers CPD 030), proceso que, mediante variaciones de presión y temperatura, reemplaza la acetona por dióxido de carbono gaseoso. Como último tratamiento, la muestra fue cubierta con carbono y metalizada con oro-paladio (Balzers Union SCD 040). Este proceso de metalizado permite la interacción entre el haz de electrones del microscopio y la muestra, la cual emite señales que luego se traducen en pulsos eléctricos. Mientras se efectuaba la observación microscópica se tomaron fotografías de los campos representativos.

## **XII. Estadística**

En las gráficas que se encuentran en esta tesis doctoral, los puntos o barras representan la Media  $\pm$  SEM de, al menos, tres experimentos independientes, cada uno de ellos realizado por duplicado, triplicado o cuadruplicado. La significación estadística de los datos se evaluó mediante el cálculo del valor de  $P$  mediante un test no paramétrico. Para ello utilizamos el programa GraphPad Prism versión 4.0 (GraphPad Software, Inc.). Consideramos valores significativamente distintos del control a aquellos resultados con al menos  $P < 0,05$ .

## **XIII. Descarte del material biológico y residuos peligrosos.**

Las normas del Servicio de Higiene y Seguridad de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales fueron respetadas para el descarte de todo el material empleado, en particular, el que estuvo en contacto con el colorante Hoechst, los geles conteniendo bromuro de etidio o yoduro de propidio y los solventes orgánicos empleados en electroforesis.

Los líquidos biológicos y las células fueron descontaminados mediante el agregado de hipoclorito de sodio 5 % durante 2 h, previo al lavado. El material de descarte (plástico, guantes, geles, etc.) fueron eliminados como residuos peligrosos a través del Servicio de Higiene y Seguridad de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

## **RESULTADOS**

## **ACCIÓN ANTIAPOPTÓTICA DE LA ERITROPOYETINA EN CÉLULAS SH-SY5Y INDUCIDAS A APOPTOSIS POR STAUROSPORINA**

### **I. Modelo celular**

Las células SH-SY5Y son un excelente modelo para el estudio de los mecanismos de muerte celular programada en neuronas. Se trabajó con células indiferenciadas dado que de esta forma se podría tener un modelo mas adecuado frente a los distintos mecanismos de respuestas de las células a factores de crecimiento.

Para estandarizar, el modelo utilizado fue: cultivos de células utilizando el medio completo descrito en Metodología, con cambios de medio cada 2 días, reemplazando completamente el mismo por medio fresco y descartando las células no adheridas. Se realizaron pasajes de células cuando la confluencia de las mismas sobrepasaba el 90% de la superficie de la botella de cultivo. Sólo se utilizaron, para esta tesis, pasajes celulares entre el 26 y el 40, debido a los cambios genéticos acumulados, los que conllevan a un deterioro en la respuesta en pasajes superiores a éstos.

### **II. Inducción de apoptosis mediante staurosporina**

Con el objeto de estudiar *a posteriori* mecanismos antiapoptóticos, el primer paso consistió en estandarizar la inducción de muerte celular programada.

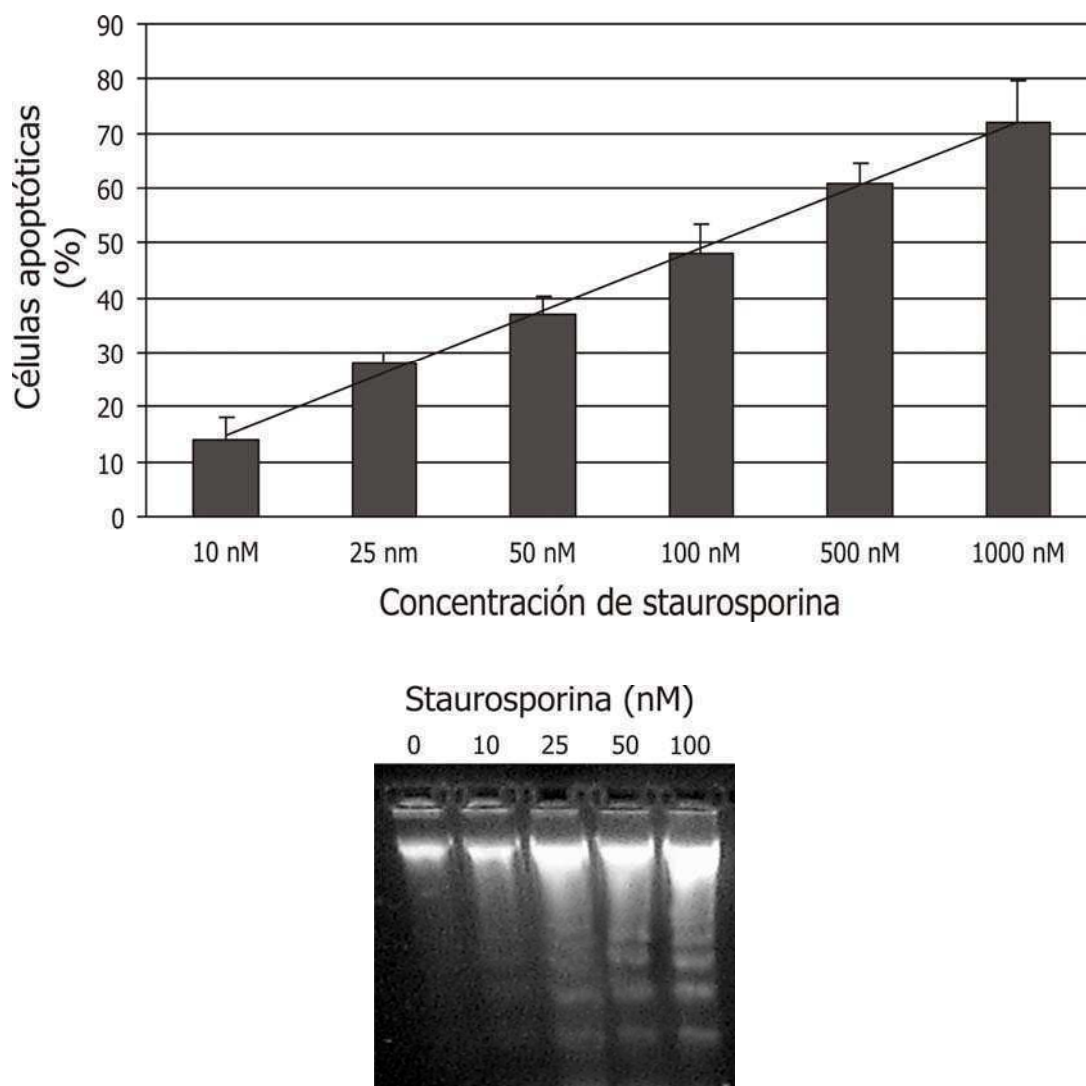
En la primera parte de esta tesis se utilizó como inductor de apoptosis el inhibidor de PKC y PKA, staurosporina (STP). Esta sustancia es un potente inhibidor de quinasas y ha sido descrito como inductor de apoptosis en células de origen neuronal, aún sin conocerse en la actualidad el verdadero mecanismo de acción.

#### ***¿Es la staurosporina un inductor de apoptosis en células SH-SY5Y?***

El estudio de la inducción de apoptosis fue realizada mediante ensayos en los que se emplearon concentraciones del inductor y tiempos de inducción variables. De esta forma, se determinaron las concentraciones y tiempos en los cuales esta droga inducía la apoptosis en la línea SH-SY5Y y se diseñó el modelo de apoptosis celular a utilizar.

La figura 1 muestra la curva de dosis en cuanto al grado de inducción de apoptosis. Utilizamos concentraciones que variaron entre 10 nM y 1000 nM.

El efector proapoptótico fue estudiado mediante la técnica de microscopia de fluorescencia utilizando el colorante Hoechst 33258 y mediante la técnica de *ladder* (ver Metodología).



**Figura 1. Muerte celular programada de células SH-SY5Y inducida por staurosporina.** Las células fueron cultivadas en presencia de concentraciones crecientes de STP. Se midieron los niveles de apoptosis mediante las técnicas de tinción de la cromatina utilizando el colorante específico Hoechst 33258 y observación de la fragmentación del ADN en forma de escala mediante electroforesis en gel de agarosa, conteniendo BrEt. Los resultados demuestran claramente la relación proporcional entre el nivel de apoptosis observado y la concentración de STP.

**La staurosporina es un potente inductor de apoptosis en nuestro modelo celular. Dicho efecto es producido en un rango de concentraciones del inductor desde 10 nM hasta 100 nM, resultando citotóxico a concentraciones más altas de STP.**

Staurosporina es un alcaloide microbiano cuyas características principales han sido mencionadas en la Introducción. Este compuesto ha sido conocido por tener actividad antifúngica y se encontró que inhibe notablemente la proteína quinasa de fosfolípido/Ca dependiente (proteína quinasa C) de cerebro de rata, con un valor de  $IC_{50}$  de 2,7 nM (Tamaoki *et al.*, 1986).

La STP ha sido utilizada como inductor de apoptosis *in vitro* en diferentes tipos de células, pero el mecanismo por el cual desencadena dicho efecto sigue siendo poco conocido, y dependería principalmente del tipo celular. Las enzimas que participan del mismo (Zhang *et al.*, 2004) y las vías de señalización intracelular activadas durante un evento apoptótico desencadenado por STP no han sido aún dilucidadas por completo. Si bien éstas parecen ser comunes a todas las fases de apoptosis inducida por esta droga, se reconocen al menos dos etapas, una caspasa dependiente y la otra independiente de dichas proteasas, cuya importancia relativa varía según el tipo de células (Thuret *et al.*, 2003).

**En nuestro modelo celular se observa un elevado grado de respuesta de las células frente al estrés inducido por STP, en un rango de concentraciones muy apropiado para la realización de estudios de neuroprotección.**

### **III. Cinética de inducción de apoptosis con staurosporina**

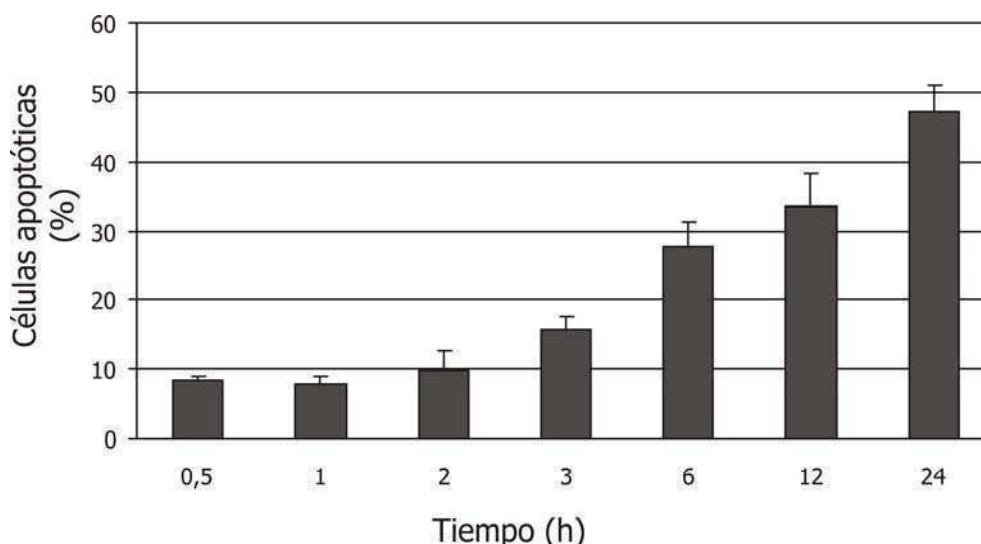
Con el fin de estudiar el tiempo de inducción de apoptosis con STP, se realizaron ensayos analizando la curva de la cinética de dicho inductor.

#### ***¿Cuanto tiempo es necesario incubar con staurosporina para producir apoptosis en las células SH-SY5Y?***

Una parte importante relacionada con la investigación del modelo de inducción de apoptosis es la referida a los tiempos de preincubación del cultivo celular con el agente a estudiar. Esto se debe a que los procesos apoptóticos solo pueden ser evidenciados en cierta ventana temporal, con lo cual el conocimiento del tiempo de inducción es uno de los parámetros más importantes a la hora de diseñar un modelo para el estudio de procesos de muerte celular programada.

Para determinar la distribución temporal de la inducción de apoptosis, realizamos ensayos a distintos tiempos post-inducción utilizando la concentración de 25 nM, dado que ésta fue la concentración media a la cual la diferencia de apoptosis inducida era una medida sensible y reproducible.





**Figura 2. Cinética de la inducción de apoptosis por staurosporina.** Mediante la medición de los niveles de apoptosis, y desarrollando los tratamientos a distintos tiempos, realizamos un estudio cinético del mismo. Se utilizó la concentración de 25 nM de STP como inductor. A los distintos tiempos de inducción, se realizó el recuento diferencial de células apoptóticas después de la tinción con Hoechst. Se observa que el efecto de la STP se hace evidente luego de, al menos, 6 horas de inducción.

**Mediante los ensayos descriptos, logramos estandarizar el sistema de inducción de apoptosis en nuestros cultivos celulares. Para ello, decidimos utilizar el siguiente esquema de tratamientos con el inductor de apoptosis staurosporina: 25 nM durante 12 horas. Este modelo permitió desarrollar valores de apoptosis sensibles para las técnicas utilizadas, siendo a la vez los tiempos de los tratamientos apropiados para los ensayos a realizar.**

**En todos los tratamientos donde la STP fue el inductor de apoptosis, se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO) como agente vehículo en los cultivos control.**

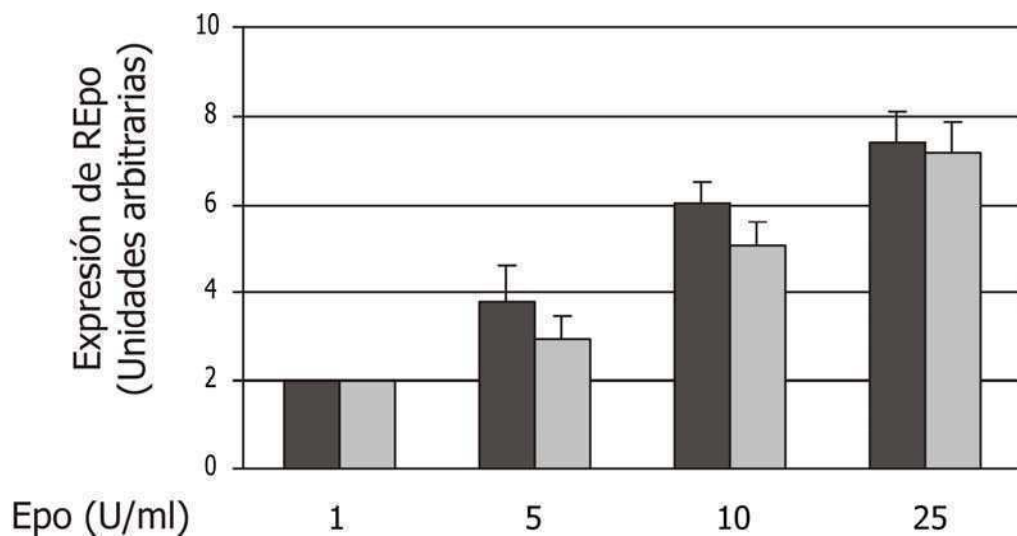
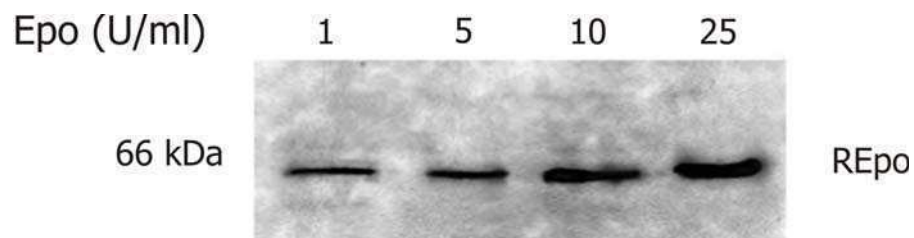
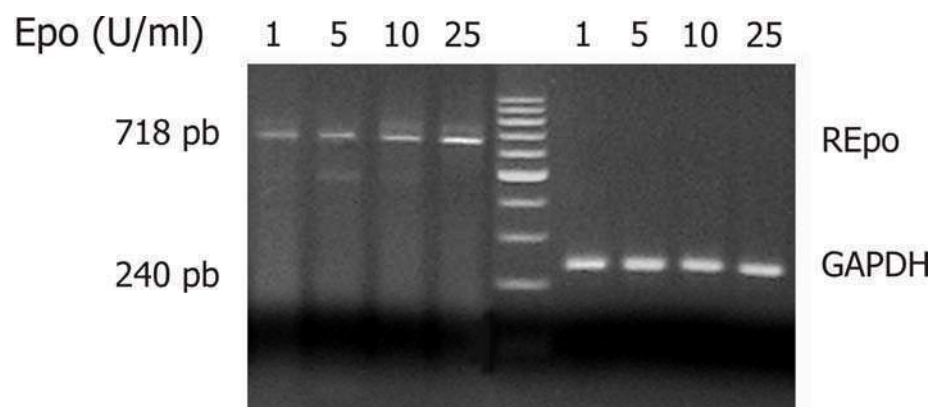
#### IV. Expresión del receptor de eritropoyetina

Para una mejor comprensión del mecanismo involucrado en el efecto antiapoptótico de la Epo es necesario estudiar la expresión y regulación del receptor de la hormona (REpo), dado que podría ser el responsable de modular y regular la señal de la misma.

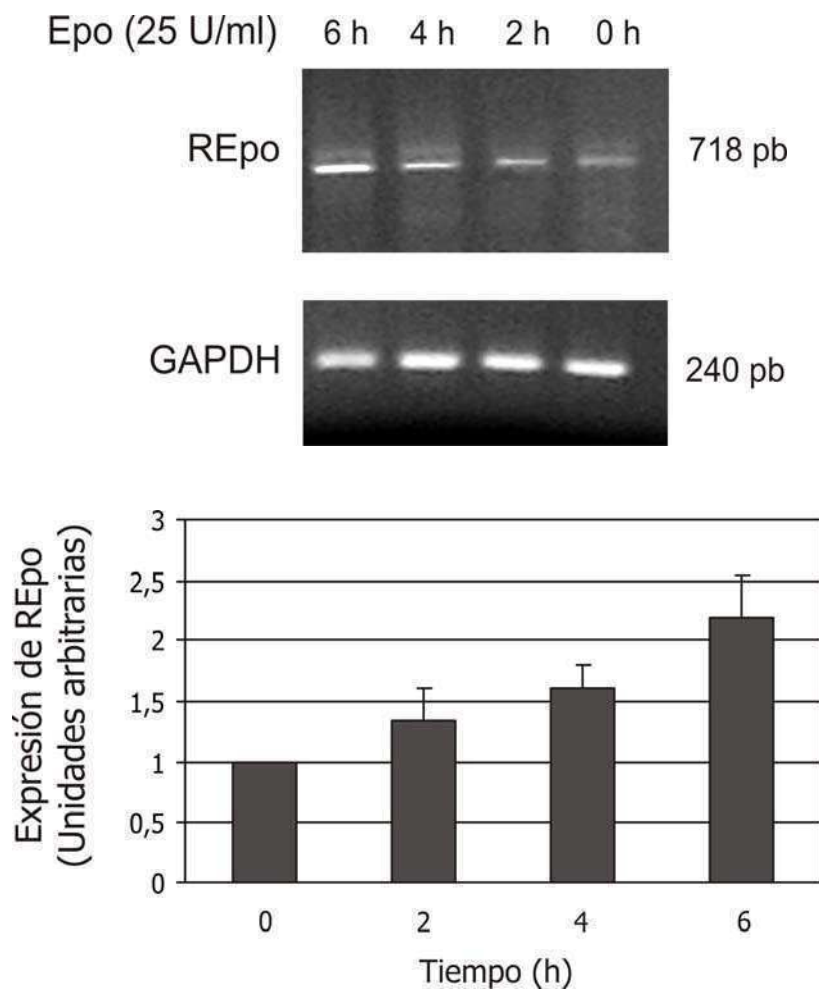
Desde hace varios años se observó la expresión del receptor de Epo en varios tejidos, diferentes de los ampliamente estudiados de origen eritroide. Fue así como se puso en evidencia también la existencia de una isoforma de la hormona expresada en tejidos tales como el cerebro del adulto (Buemi *et al.*, 2002; Chin *et al.*, 2000). Partiendo de estos datos previos, estudiamos la expresión del REpo en nuestro modelo celular.

### ¿Expresan las células SH-SY5Y el receptor de eritropoyetina?

Para el estudio de la expresión del receptor en la línea celular SH-SY5Y sometida a distintas situaciones, planteamos ensayos a nivel de ARNm y de proteínas. Las células control y las incubadas en presencia de distintas cantidades de la hormona fueron lisadas. Se realizó luego la extracción de ARN total y posterior pasaje a ADNc mediante ensayo de retrotranscripción. Empleando PCR semicuantitativa y utilizando *primers* específicos, se detectaron los niveles de expresión del gen del REpo. Mediante *western blotting* se pudo corroborar la expresión del REpo a nivel de proteínas (Figs. 3 y 4). Pudimos, así, determinar que estas células expresan REpo, y que dicha expresión es modulada por la misma hormona en forma concentración dependiente.



**Figura 3. Regulación de la expresión del receptor por eritropoyetina.** Las células fueron incubadas durante 12 horas en presencia de distintas concentraciones de Epo (1 – 25 U/ml). La expresión de REpo fue analizada a nivel de ARNm por RT-PCR y los fragmentos de PCR visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa, conteniendo BrEt. La expresión del receptor a nivel de proteína fue estudiada por *western blotting* empleando un anticuerpo monoclonal anti-REpo y revelado por quimioluminiscencia. El análisis de la señal correspondiente al REpo fue normalizado con respecto al estándar interno GAPDH y expresado en unidades arbitrarias de densidad de banda de ARNm. Las barras indican Media $\pm$ SEM de 4 ensayos independientes y representan la relación de ARNm REpo/GAPDH (barras oscuras) o la relación de la densidad de banda proteica de cada muestra con respecto a la del control (barras claras) y están expresadas en unidades arbitrarias. Tanto a nivel de ARNm, como de proteínas, se observa que al aumentar la cantidad de hormona agregada al cultivo se incrementa la expresión del REpo.



**Figura 4. Expresión del receptor de eritropoyetina a distintos tiempos de exposición a la hormona.** Se midió la expresión a nivel de ARNm utilizando RT-PCR semicuantitativa utilizando *primers* específicos después de incubación de las células, por distintos períodos, con una concentración de Epo de 25 U/ml. Se observa el aumento en la expresión del REpo en el tiempo. Los fragmentos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa,

conteniendo BrEt. El análisis de la señal correspondiente al REpo fue normalizado con respecto al estándar interno GAPDH y expresado en unidades arbitrarias de densidad de banda de ARNm. Las barras representan Media $\pm$ SEM de 4 ensayos independientes.

**Demostramos que nuestro modelo celular expresa el receptor de Epo y que éste es regulado por la hormona en forma concentración-dependiente.**

**Estos ensayos nos permitieron estandarizar la cantidad óptima de Epo y el tiempo necesario para activar al receptor.**

La capacidad de Epo para estimular la proliferación de las células progenitoras y prevenir la apoptosis es fundamental para el mantenimiento del linaje eritroide, pero se ha observado también su expresión y acción en las células progenitoras nerviosas y musculares.

Se ha observado el aumento de la expresión del receptor mediado, en parte, por el aumento de la expresión de Epo en modelos de hipoxia en distintos tipos celulares (Burger *et al.*, 2006; Foster *et al.*, 2004).

Por otro lado, en un trabajo donde se utilizó una línea celular eritroide dependiente de la hormona para sobrevivir, se ha descrito la disminución de los niveles de ARNm del receptor en función del tratamiento con Epo (Komatsu *et al.*, 1997). En un modelo *in vivo* de hipoxia, se observó que frente a niveles muy bajos de Epo, el organismo respondería aumentando la expresión del receptor probablemente debido al aumento previo de la síntesis de la hormona (Shams *et al.*, 2005).

## **V. Efecto antiapoptótico de la eritropoyetina**

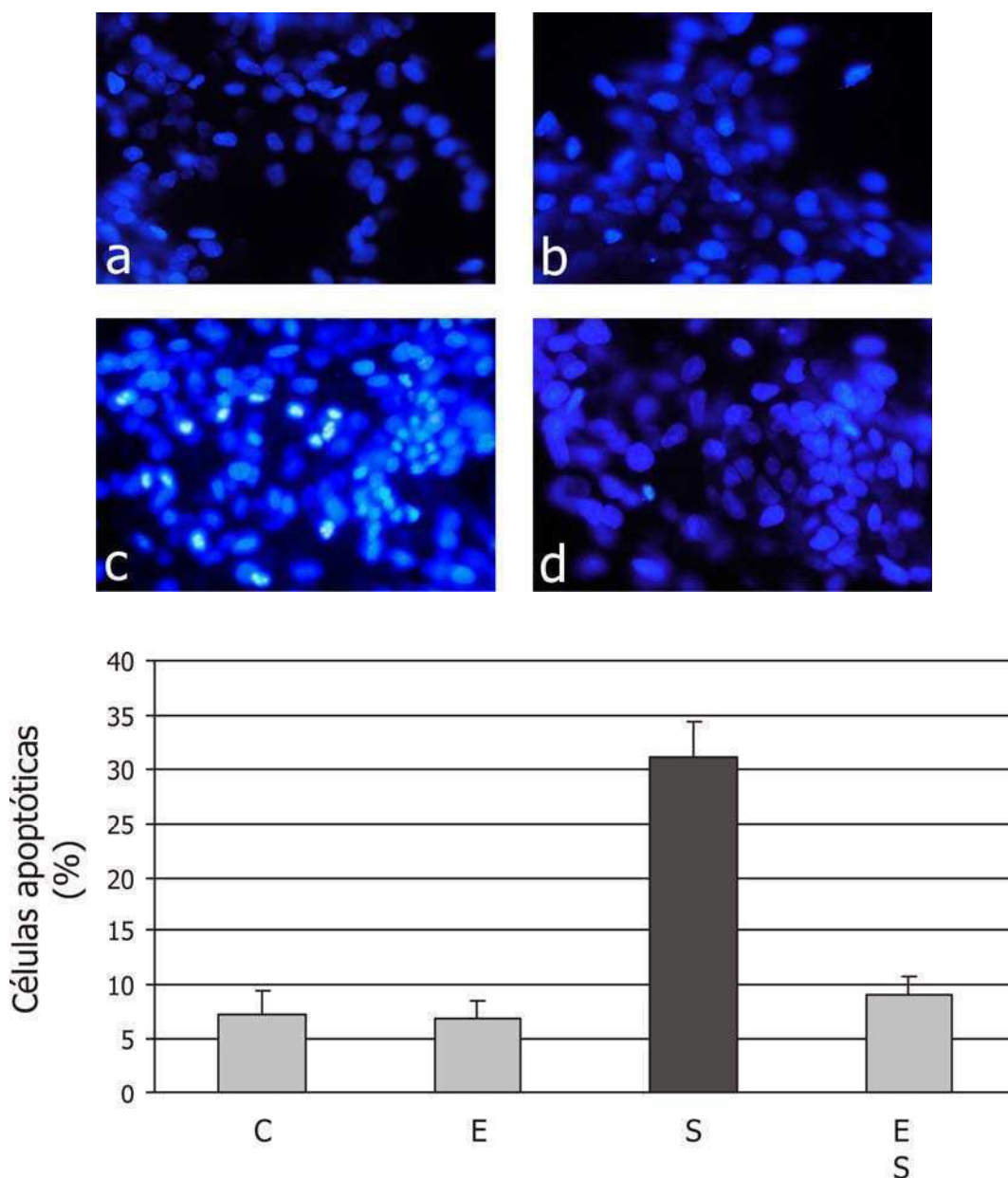
Para investigar el potencial efecto neuroprotector de la Epo, utilizamos una aproximación experimental clásica, mediante la variación de las concentraciones de la hormona y del tiempo de tratamiento, previo a la inducción de apoptosis o durante la misma.

### ***¿Es la eritropoyetina capaz de proteger de la apoptosis inducida por staurosporina a las células SH-SY5Y?***

Las concentraciones de hormona utilizadas fueron 5, 10, 25 y 50 U/ml. Los tratamientos con la hormona fueron 1, 3, 6, 12, y 24 horas previo al tratamiento, como así también en conjunto con el agregado del inductor.

Los resultados de los ensayos demostraron que el efecto antiapoptótico se evidenció cuando el tratamiento con la hormona fue previo al tratamiento con el inductor y, en mayor grado, cuando éste fue de 6 a 24 horas previo. A partir de estos datos, en los siguientes ensayos de neuroprotección las células fueron preincubadas durante 12 horas con 25 U/ml de Epo y luego, inducidas a apoptosis por exposición a STP 25 nM por 12 horas adicionales. Con este tratamiento, se observó que el efecto protector de la Epo fue capaz de revertir completamente la apoptosis inducida por STP. Este efecto

fue menos pronunciado en ensayos con menos tiempo de exposición a Epo. Más aún, cuando Epo y STP fueron adicionados al cultivo al mismo tiempo, la muerte celular programada no pudo ser prevenida.



**Figura 5. Efecto antiapoptótico de la eritropoyetina.** Se observa un efecto neuroprotector de Epo cuando las células fueron tratadas durante 12 h previas a la inducción de apoptosis con STP. El efecto neuroprotector es capaz de revertir totalmente la apoptosis inducida por el inductor, observándose una disminución significativa del número de células apoptóticas con respecto a los ensayos con STP (E+S vs. S,  $P < 0,01$ ). Microfotografías obtenidas en microscopio de fluorescencia de cultivos controles (a), células expuestas a Epo 25 U/ml (b), células inducidas a apoptosis durante 12 h con STP 25 nM (c) y células protegidas con 25 U/ml de Epo por 12 h antes de la inducción a apoptosis (d). El número de células apoptóticas fue obtenido por el recuento diferencial

de núcleos fluorescentes mediante la metodología de tinción de la cromatina con Hoechst analizando un mínimo de 500 células/muestra. Cada barra representa la Media $\pm$ SEM de 4 ensayos independientes.

**La apoptosis inducida por staurosporina fue revertida a niveles del control por el pretratamiento con 25 U/ml de Epo durante 12 horas previas a la inducción de apoptosis.**

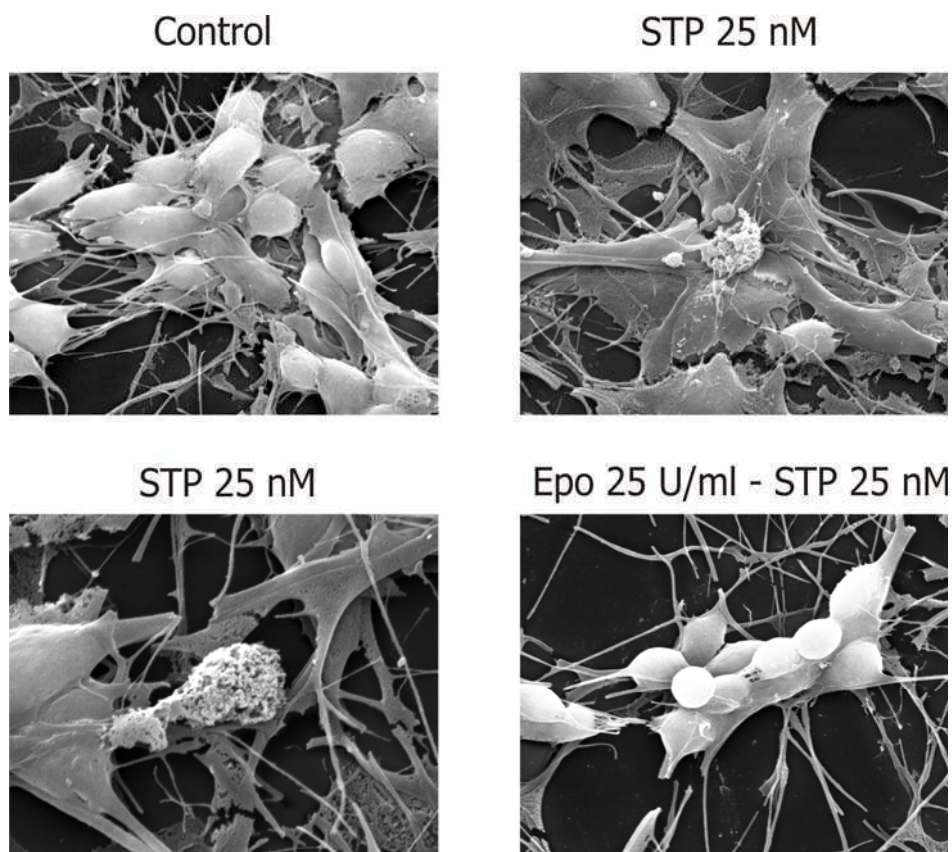
Se ha propuesto que el sistema Epo/REpo podría desempeñar un papel importante en la protección de las neuronas y que la suplementación con Epo exógena podría promover la supervivencia de neuronas en diferentes situaciones, tanto fisiológicas como patológicas (Xie *et al.*, 2007) y también se demostró un efecto neuroprotector en modelos *in vivo* de isquemia cerebral en animales adultos (Chen *et al.*, 2006).

**VI. Acción de la eritropoyetina sobre cambios morfológicos inducidos por staurosporina**

A la luz de los resultados que mostraban los efectos de la muerte celular programada inducida por STP, decidimos estudiar los cambios morfológicos sufridos por las células SH-SY5Y mediante microscopía electrónica de barrido. Para ello, se realizaron los cultivos en presencia o ausencia de STP, con o sin tratamientos previos con Epo. Se procedió al fijado de las células y preparación de las muestras de acuerdo a lo indicado en la sección Metodología y se realizó el análisis por microscopía electrónica de barrido (MEB).

***¿Es la Epo capaz de interferir con los cambios morfológicos inducidos por STP?***

La Figura 6 muestra claramente la pérdida de tamaño del cuerpo de la célula y la modificación de la estructura básica, así como la formación de poros a nivel de la membrana citoplasmática que se producen al ser tratadas las células con el inductor de apoptosis STP. Dichos cambios morfológicos no se producen en los cultivos celulares tratados previamente con Epo.



**Figura 6. Cambios morfológicos inducidos por staurosporina.** Utilizando MEB se pudieron observar los cambios sufridos por las células SH-SY5Y por acción de staurosporina: pérdida del tamaño y de la estructura básica celular y la formación de poros a nivel de la membrana citoplasmática. Dichos efectos no son observados en las células tratadas previamente con Epo.

La línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y presenta la capacidad madurar a un fenotipo neuronal (Biedler *et al.*, 1973). La diferenciación morfológica y funcional de estas células puede ser inducida por staurosporina dando lugar a un fenotipo neuronal maduro (Jalava *et al.*, 1992; Yuste *et al.*, 2002). Sin embargo, STP ha sido ampliamente considerada como una de los mejores inductores de apoptosis en muchos tipos de células neuronales (Lopez y Ferrer, 2000; Prince y Orelan, 1997; Yuste *et al.*, 2002). Esto puede explicarse por el hecho de que STP es un potente inhibidor no específico de varias proteína-quinasa, incluida la proteína quinasa C, que desempeña un papel importante en la proliferación celular, la diferenciación y la supervivencia celular (Papp *et al.*, 2004; Spitaler y Cantrell, 2004)

La STP induce cambios ultraestructurales típicos de la muerte de las células apoptóticas en distintos modelos celulares. La bien conocida condensación de la cromatina se ha observado, seguida de la aparición de protuberancias nucleares. La formación de numerosos micronúcleos densos es el último paso del proceso. Sin embargo no siempre se ha podido detectar la fragmentación del ADN internucleosomal distintivo que se produce en una variedad de células expuestas a los agentes que causan apoptosis (Falcieri *et al.*, 1993).

## VII. Estudio de mecanismos involucrados en el efecto neuroprotector de la eritropoyetina

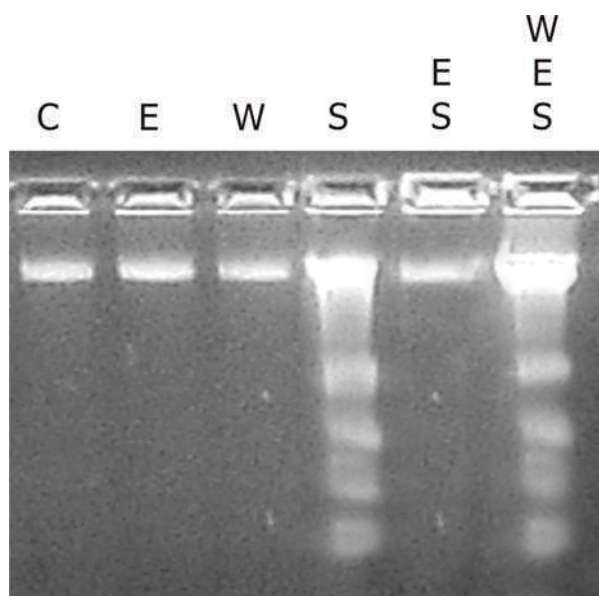
La eritropoyetina y su receptor se expresan en el cerebro adulto, pero sus funciones aún no están esclarecidas.

Siguiendo una hipótesis acerca de la fisiología del sistema nervioso, otros investigadores realizaron estudios para evaluar los efectos de la Epo sobre la secreción de neurotransmisores en un clon de células de feocromocitoma de rata (PC12). La activación del REpo por Epo induce la autofosforilación de la quinasa Janus 2 (JAK2), una tirosina quinasa que se asocia con el REpo, y la desfosforilación de GAP-43. Estos resultados sugieren que Epo suprime la liberación de neurotransmisores a través de la activación de REpo vinculados a JAK2 (Kawakami *et al.*, 2000).

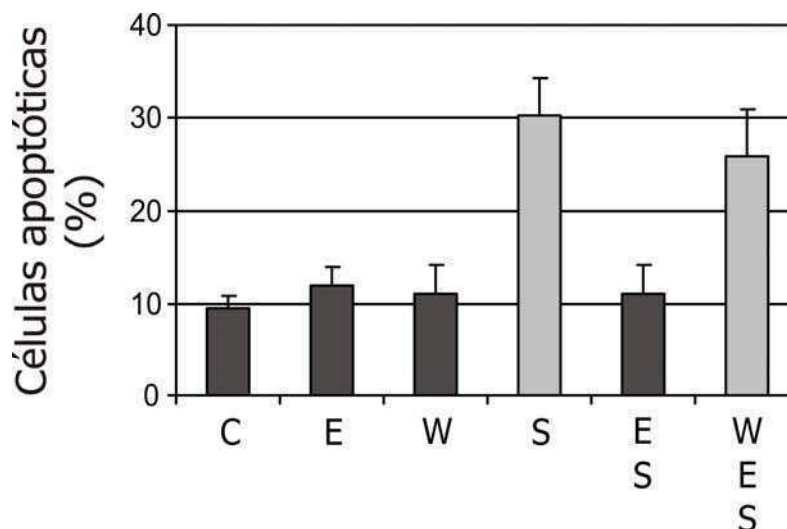
Con el objeto de estudiar los posibles mecanismos involucrados en el efecto neuroprotector de la Epo se realizaron ensayos utilizando distintos inhibidores farmacológicos de algunas de las vías de transducción de señales activadas por la unión de la hormona a su receptor. Los mismos fueron ensayados previos al tratamiento con Epo.

### ***¿Cuáles son las vías activadas por eritropoyetina que participan de la acción antiapoptótica de la misma?***

En primer lugar, se realizaron ensayos para determinar el grado de participación de la vía PI3K. Para ello, se empleó el inhibidor wortmanina. Los tratamientos con dicho inhibidor mostraron un rol importante de dicha vía en la acción antiapoptótica mediada por Epo. La acción del inhibidor fue evidenciada tanto en los ensayos en los que la apoptosis fue evaluada por *ladder* como en aquéllos en los que se realizó el recuento diferencial de células apoptóticas después de la tinción de la cromatina con Hoechst (Fig. 7).







**Figura 7. Participación de la vía PI3K en la acción de la eritropoyetina.** Se realizaron ensayos para medir los niveles de apoptosis y la capacidad de bloquear el efecto protector de la Epo utilizando un inhibidor específico de la vía de PI3K. Se emplearon las técnicas de *ladder* y de tinción con Hoechst. Las células fueron inducidas a apoptosis por STP (S), protegidas por el pretratamiento con Epo (E S) o bien recibieron un tratamiento secuencial con wortmanina por 2 h, Epo por 12 h y STP por 12 h adicionales. El bloqueo de la acción protectora de la hormona al tratar con el inhibidor wortmanina (W E S) demuestra que la vía de PI3K está fuertemente involucrada en el accionar de la Epo, o es, al menos, una importante vía regulatoria de dicho efecto (E S vs. S,  $P < 0.01$ ; W E S vs. S, NS). El número de células apoptóticas fue obtenido por el recuento diferencial de núcleos fluorescentes mediante la metodología de tinción de la cromatina con Hoechst analizando un mínimo de 500 células/muestra. Las barras indican la Media $\pm$ SEM de 4 ensayos independientes.

#### La vía de PI3K jugaría un rol importante en el efecto neuroprotector de la Epo.

La eritropoyetina es una citoquina multifuncional que regula el número de eritrocitos circulantes en la sangre de mamíferos. Estudios bioquímicos con progenitores eritroides humanos derivados de la sangre del cordón muestran que Ras y la enzima PI3K, se activan en respuesta a concentraciones mínimas de Epo. Sorprendentemente, tres inhibidores estructuralmente diferentes de PI3K bloquean Ras y la activación de MEK y Erk en progenitores eritroides mediada por Epo (Schmidt *et al.*, 2004). Ambos, wortmanina y LY294002 han demostrado ser inhibidores específicos de la vía de PI3K en distintos modelos celulares y relacionados con distintos procesos fisiológicos (Fukuda *et al.*, 2002; Jung *et al.*, 2002).

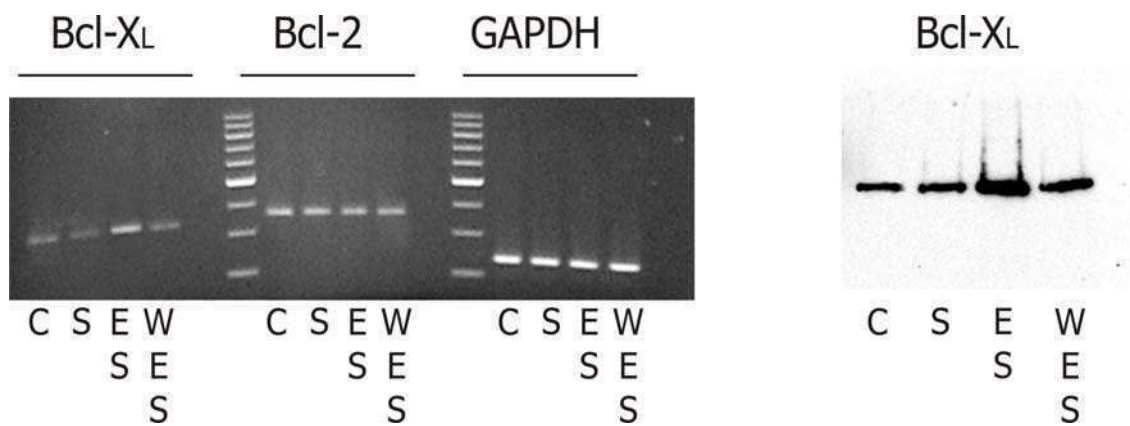
### VIII. Estudio de la expresión de miembros de la familia de Bcl-2

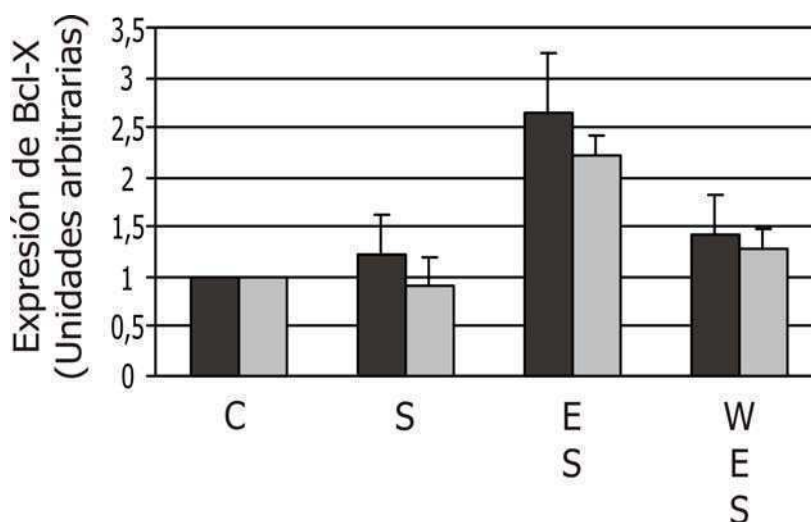
Los miembros de la familia de proteínas Bcl-2 juegan un rol muy importante en la regulación de los procesos pro y antiapoptóticos y, por consiguiente, son capaces de producir resistencia en las células que hacen frente a estímulos apoptóticos. Ante este hecho, fue interesante investigar si el efecto de la Epo, contrarrestando la acción de la STP, se encontraba asociado a la modulación de la expresión de factores antiapoptóticos de la familia Bcl-2.

#### *¿Regula Epo la expresión de los miembros de la familia Bcl-2?*

Con el fin de responder la pregunta, realizamos ensayos para determinar si los principales factores antiapoptóticos, tales como Bcl-X<sub>L</sub> y Bcl-2, se expresan en las células SH-SY5Y y, de ser así, si el tratamiento de las células con Epo induce el aumento de dicha expresión. Los estudios incluyeron técnicas de RT-PCR y *western blotting*.

Los resultados mostraron una acción positiva de la hormona frente a la regulación del factor Bcl-X, luego de la inducción a apoptosis por STP (Fig. 8). El efecto neuroprotector de Epo frente a la inducción por STP se debería, en parte a la aumento de la expresión de dicho factor, y no involucraría a otros miembros como Bcl-2 y Bax.





**Figura 8. Expresión de miembros de la familia Bcl-2 mediada por eritropoyetina.** Se estudió la expresión de miembros de la familia de Bcl-2 para evaluar su regulación por la hormona y el posible grado de participación en el efecto protector de la misma. Las células recibieron tratamientos similares a los indicados en la Figura 7. Mediante RT-PCR se analizó la expresión de Bcl-2 y Bcl-X<sub>L</sub> a nivel de ARNm y de éste último a nivel de proteínas por *western blotting*. El tratamiento de las células con Epo induce, frente al daño inducido por STP, un aumento significativo de la expresión de Bcl-X<sub>L</sub>, tanto a nivel de ARNm como al de proteínas (E S vs. S,  $P < 0,05$ ). Las barras indican Media  $\pm$  SEM de 4 ensayos independientes y representan la relación de ARNm Bcl-X<sub>L</sub>/GAPDH (barras oscuras) o la relación de la densidad de banda proteica de cada muestra con respecto a la del control (barras claras) y están expresadas en unidades arbitrarias.

**El tratamiento con eritropoyetina aumenta la expresión del factor Bcl-X<sub>L</sub> frente a la inducción con staurosporina, sin alterar la expresión de otros miembros de la familia de Bcl-2.**

La función clave de los miembros de la familia de Bcl-2 es regular la liberación de factores proapoptóticos, en particular el citocromo *c*, desde el compartimiento intermembranal de la mitocondria hasta el citosol (Adams y Cory, 1998). Algunos miembros de la familia pueden homodimerizar pero, lo que es más importante, pueden formarse heterodímeros de miembros pro y antiapoptóticos (Adams y Cory, 1998; Antonsson *et al.*, 2000). La heterodimerización puede simplemente resultar en una neutralización mutua de las proteínas pro y antiapoptóticas unidas.

En trabajos donde se utilizaron inmunoensayos, se observó que la activación por Epo inducía un aumento significativo de la fosforilación de JAK2 y de la activación del factor STAT5 entre 24 y 48 h luego al daño inducido (modelo de Isquemia cerebral), y aumentaba la expresión de Bcl-X<sub>L</sub> 24 h después del mismo, pero también sugerían que dichos efectos no afectarían la expresión del receptor de Epo ni la activación de NF- $\kappa$ B. En dicho trabajo demostraron, que el tratamiento con Epo después del daño isquémico en ratas recién nacidas provee una neuroprotección significativa, posiblemente

mediada por la activación de las vías de transducción de señales relacionada, como STAT5 y esto conllevaría un aumento de la expresión de Bcl-X<sub>L</sub> (Sola *et al.*, 2005).

## **IX. Estudio de los cambios morfológicos inducidos por staurosporina**

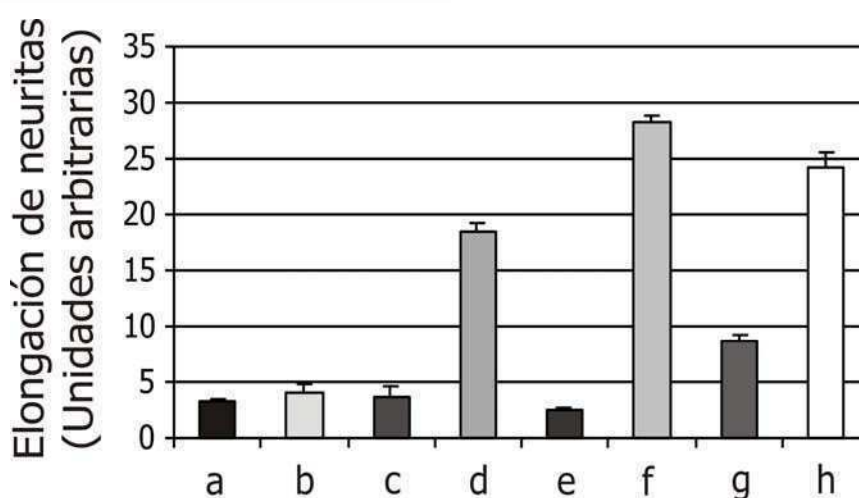
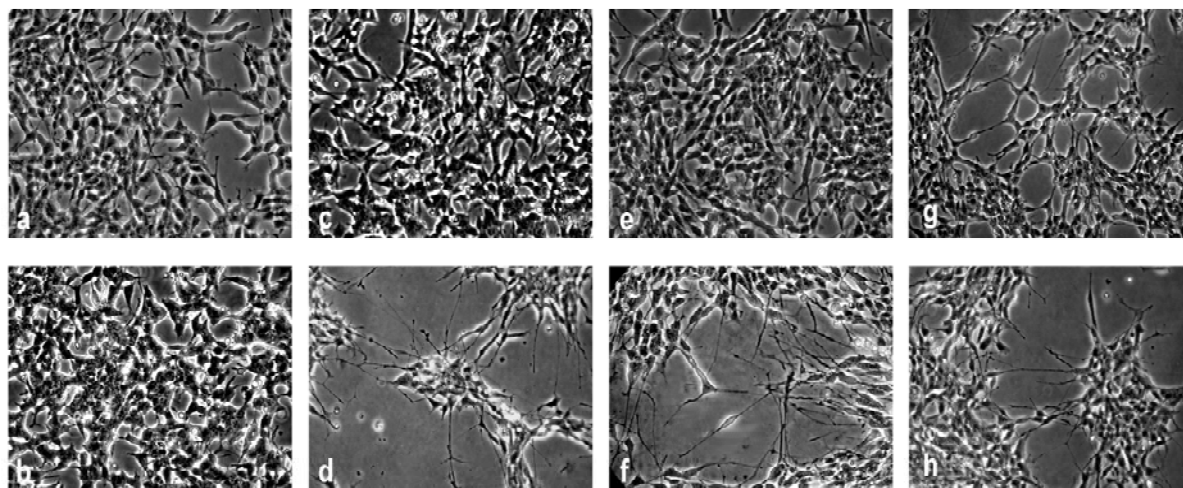
La staurosporina es, además de un inhibidor de quinasas, un agente con capacidad de diferenciar células de neuroblastoma. Las células SH-SY5Y al diferenciarse modifican su morfología, produciéndose la formación de neuritas y su posterior elongación. Estos cambios morfológicos son utilizados para determinar el grado de diferenciación de dichas células.

### ***¿Presenta la Epo algún efecto sobre la diferenciación celular inducida por staurosporina?***

Como metodología de estudio utilizamos microscopía de contraste de fase y fotogramas para vigilar neuritogénesis en cultivos celulares desarrollados en presencia de STP con o sin tratamiento previo con Epo.

Los cultivos celulares, desarrollados bajo distintos tratamientos, fueron luego fijados y observados por microscopía óptica. Distintos campos fueron fotografiados digitalmente y se procedió a la cuantificación de la diferenciación a través de la elongación de las neuritas. Este parámetro fue medido utilizando un software apropiado, como se indica en Metodología, y los resultados, expresados en unidades arbitrarias, se muestran en la Figura 9.

Se observó la inducción a diferenciación celular mediada por STP, en dosis de 25 nM y 100 nM. Las células SH-SY5Y tratadas con STP mostraron una morfología neuronal diferencial, ya descrita anteriormente (Prince y Orelan, 1997; Yuste *et al.*, 2002). Se observó un aumento en la neuritogénesis combinado con un mayor grado de ramificación y la reducción del tamaño de la célula. Este proceso de diferenciación fue prevenido por el pretratamiento con Epo, en forma total frente a dosis bajas de STP y parcialmente, cuando se emplearon dosis más altas del inductor (Fig. 9). El inhibidor de PI3K, wortmanina, anuló el efecto de la Epo, permitiendo la diferenciación celular en niveles semejantes a los del tratamiento con STP.



**Figura 9. Diferenciación celular inducida por staurosporina.** El crecimiento celular fue observado bajo microscopio invertido después de recibir los siguientes tratamientos: 12 h de STP 25 nM (d) o 100 nM (f); 25 U/ml de Epo por 12 h + 12 h de STP 25 nM (e) o 100 nM (g); 200 nM de wortmanina por 2 h + 12 h de Epo + 12 h de STP (h). Los controles fueron células no tratadas (a) o expuestas sólo a Epo (b) o a wortmanina (c). Las microfotografías muestran los cambios morfológicos debidos al proceso de diferenciación: elongación de neuritas e interconexión de los cuerpos celulares (aumento 400×). Utilizando microscopia de contraste de fase y un *software* específico se analizó el grado de diferenciación celular a través de la medición del largo de las neuritas. Las barras indican Media±SEM de los resultados de 10 ensayos independientes, expresados en unidades arbitrarias. Se puede observar un efecto positivo en la diferenciación de las células SH-SY5Y mediado por STP (d, f). También se observa un significativo efecto negativo de la Epo sobre dicha acción de la STP, especialmente cuando se emplean dosis bajas de STP (e vs.d,  $P < 0,001$ ,  $n = 10$ ). El inhibidor de la vía de PI3K, wortmanina, produjo un bloqueo parcial de la acción de la hormona, permitiendo la diferenciación celular inducida por STP.

**Además de inductor de apoptosis, staurosporina prueba ser un agente diferenciador importante de células de la línea neuronal SH-SY5Y. La Epo presenta un efecto negativo sobre la diferenciación inducida por STP, y dicho efecto sería al menos en parte mediado por la activación de la vía de PI3K.**

Observaciones realizadas muestran que staurosporina puede desencadenar rápidamente tanto cambios morfológicos como la fragmentación de ADN intranucleosomal típica de la apoptosis. Esto ocurrió en una serie de líneas de células de diversos orígenes, independientemente del estado de la diferenciación y la fase del ciclo celular, lo que sugiere la presencia de una vía común inducible (Bertrand *et al.*, 1994).

## ACCIÓN ANTIAPOPTÓTICA DE LA ERITROPOYETINA EN CÉLULAS SH-SY5Y INDUCIDAS A APOPTOSIS POR TNF- $\alpha$

### X. Estudio de inducción de apoptosis por TNF- $\alpha$

El factor de necrosis tumoral es un potente inductor de los procesos inflamatorios, pero también es un agente con capacidad de inducir apoptosis en distintos tipos celulares. Con el fin de conocer las implicancias de la presencia de TNF- $\alpha$  sobre células neuronales, se estudió su efecto sobre las células SH-SY5Y. Además, se evaluaron posibles mecanismos de resistencia frente a la acción de TNF- $\alpha$ , generados por el pretratamiento de las células con Epo.

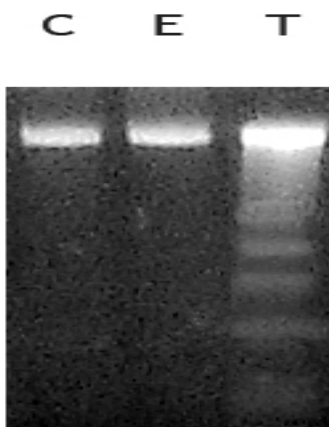
#### *¿Es el TNF- $\alpha$ capaz de inducir apoptosis en las células SH-SY5Y?*

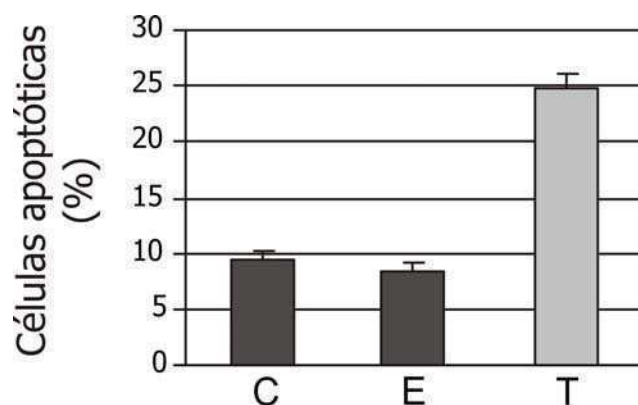
Utilizando la metodología aplicada para la detección de signos de apoptosis inducida por STP, realizamos ensayos en los cuales se utilizaron distintas concentraciones del inductor TNF- $\alpha$  y se variaron los tiempos de exposición al mismo.

Las concentraciones de TNF- $\alpha$  en el cultivo fueron 10, 25, 50 y 100 ng/ml, y los tiempos de exposición variaron entre 3 y 24 horas.

Observamos el grado de apoptosis inducido por TNF- $\alpha$  mediante las técnicas de *ladder* y tinción nuclear con Hoechst. Cuando el tiempo de exposición fue de 6, 12 ó 24 h, todas las concentraciones ensayadas produjeron un aumento de la apoptosis al comparar los resultados con los de los cultivos controles, pero sólo la concentración más elevada produjo un aumento similar en el grado de apoptosis cuando se emplearon períodos de inducción de 3 h.

En la Figura 10, se muestran los resultados obtenidos con incubaciones de las células SH-SY5Y durante 12 h en presencia de 25 ng/ml de TNF- $\alpha$ . Como se observa en la figura, esas condiciones muestran un *pattern* de degradación de ADN (*ladder*) y un significativo incremento de células apoptóticas identificadas por la condensación de la cromatina, característicos de apoptosis.





**Figura 10. Inducción de apoptosis por TNF- $\alpha$ .** Se realizaron tratamientos con distintas concentraciones de la citoquina como agente inductor de apoptosis y curvas de tiempo para estudiar el comportamiento de las células SH-SY5Y frente a la exposición a TNF- $\alpha$ . Se evaluó el grado de apoptosis por las técnicas de *ladder* y de recuento diferencial de células apoptóticas por microscopía de fluorescencia después de la tinción con reactivo de Hoechst. La figura muestra los resultados obtenidos en cultivos celulares tratados con 25 ng/ml de TNF- $\alpha$  durante 12 h que indican un significativo nivel de apoptosis ( $P < 0,01$ ,  $n = 5$ ). El número de células apoptóticas fue obtenido por recuento diferencial de núcleos fluorescentes mediante la metodología de tinción de la cromatina con Hoechst analizando un mínimo de 500 células/muestra. Cada barra representa la Media  $\pm$  SEM de 5 ensayos independientes.

**Para los tratamientos posteriores se decidió utilizar el siguiente modelo de inducción de apoptosis por TNF- $\alpha$ : exposición a la citoquina por 12 horas empleando una concentración de 25 ng/ml.**

Recientes ensayos indican que la expresión del TNF- $\alpha$  es aumentada después de una lesión cerebral y en enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis múltiple, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer. Se han identificado, tanto al TNF- $\alpha$  como a otras ciertas interleuquinas, IL-1 IL-4, como agentes inductores de procesos apoptóticos; sin embargo, la privación de factores neurotróficos también desencadena apoptosis (Altman, 1992).

Por otra parte se ha descrito, que las células de la glía al ser activadas producirían un aumento en la producción de factores tróficos, pero también la secreción de citoquinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ . La microglía, miembro de la familia de las células monocito-macrófagos, es la productora principal de las distintas citoquinas reguladoras de los procesos tanto proinflamatorios como antiinflamatorios (Stewart *et al.*, 2000). El uso de TNF- $\alpha$  como inductor de apoptosis surge como una herramienta frente a los procesos inflamatorios que se producen en sistema nervioso central en situaciones fisiopatológicas.



## XI. Efecto de la eritropoyetina sobre la viabilidad de células SH-SY5Y

Una vez demostrado el efecto proapoptótico del factor  $\text{TNF-}\alpha$ , se realizaron ensayos para evaluar un posible efecto protector de la Epo frente a la agresión producida por la citoquina. Para determinar la viabilidad de los cultivos, se utilizó la reacción de MTT. Como esta reacción sólo puede ser producida por células con actividad mitocondrial intacta, la cantidad de formazán formado resulta directamente proporcional al número de células viables presentes en el ensayo.

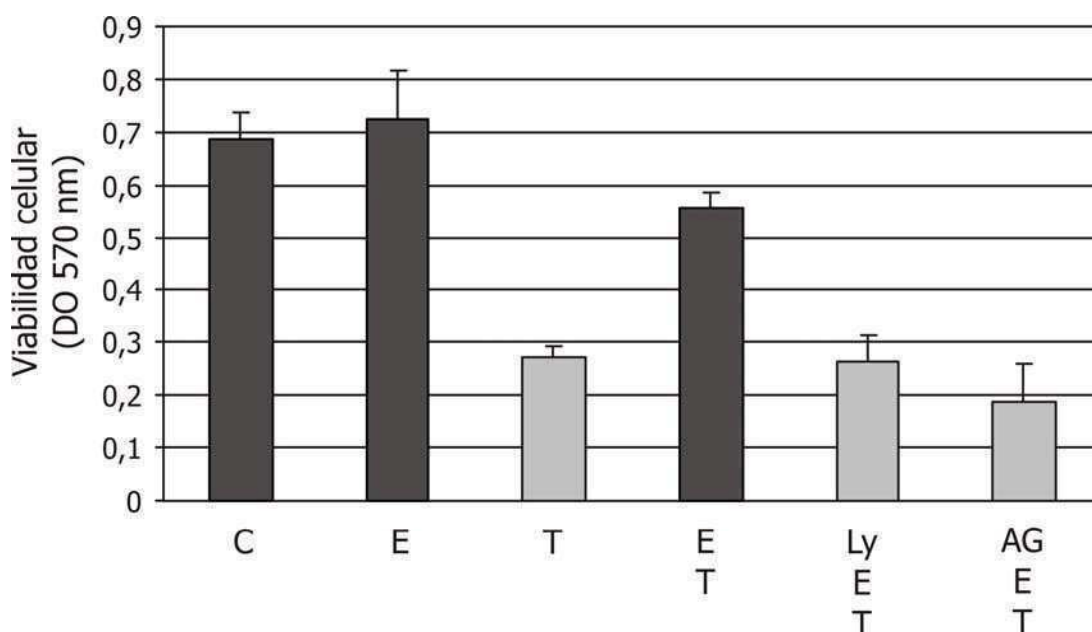
Tal como se esperaba y, en coherencia con los resultados de evaluación de apoptosis, se observó un efecto negativo significativo de la respuesta celular frente al tratamiento con  $\text{TNF-}\alpha$  (Fig. 11).

Se ensayó el efecto de la Epo frente al insulto con la citoquina y se realizaron tratamientos con distintos agentes inhibidores de algunas de las vías involucradas en la respuesta de la hormona.

### *¿Es la Epo capaz de mantener la viabilidad de las células SH-SY5Y frente al daño inducido por $\text{TNF-}\alpha$ ?*

En los ensayos con Epo fueron utilizadas las mismas dosis y los mismos tiempos de exposición que permitieron mostrar un efecto protector de la hormona en células SH-SY5Y inducidas a apoptosis por staurosporina.

Los ensayos de viabilidad demostraron que la Epo es capaz de contrarrestar el efecto negativo del  $\text{TNF-}\alpha$  sobre la viabilidad celular (Figura 11). La utilización de inhibidores (LY294002 y AG490) de las vías de transducción de señales activadas por Epo permitió observar el rol que jugarían las mismas en su efecto neuroprotector.



**Figura 11. Viabilidad celular en presencia de  $\text{TNF-}\alpha$  y de Epo.** Las células fueron tratadas con 25 U/ml de Epo por 12 h y luego cultivadas con y sin  $\text{TNF-}\alpha$  (ET y E, respectivamente).

Los controles no recibieron tratamiento (C) o fueron expuestos sólo a la acción de la citoquina (T). Algunos cultivos fueron desarrollados en presencia de 25  $\mu$ M de Ly294200 o de AG490 por 12 h antes del agregado de Epo (LyET y AGET). Se estudió la viabilidad celular mediante la técnica de MTT. Se observó una significativa disminución en la viabilidad celular cuando el cultivo fue tratado con TNF- $\alpha$  (T vs. C,  $P < 0,001$ ,  $n=5$ ), mientras que esa situación fue contrarrestada al tratar el cultivo previamente con Epo (ET vs. T,  $P < 0,01$ ,  $n=5$ ). Tanto el agregado del inhibidor específico de la vía de PI3K (Ly), como el agregado del inhibidor de JAK2 (AG) demuestran la importancia de dichas vías en el efecto neuroprotector ( $n=3$ ). Las barras representan Media $\pm$ SEM.

**La Epo es capaz de mantener la viabilidad de las células SH-SY5Y a pesar de la presencia del inductor de muerte celular TNF- $\alpha$ . Esta acción de Epo estaría, al menos en parte, mediada por la activación de las vías que involucran JAK2 y PI3K.**

Los detalles de los mecanismos por los cuales Epo produce su acción antiapoptótica en células eritroides y no eritroides aun no han sido aclarados totalmente, pero se ha demostrado que los efectos de la Epo serían dependientes de la señalización por JAK2 y de la activación de PI3K (Dunlop *et al.*, 2006; Pelletier *et al.*, 2006). La acción antiapoptótica de Epo en células tumorales sería dependiente de la activación de JAK2 y la consiguiente fosforilación de Akt (Calo *et al.*, 2006).

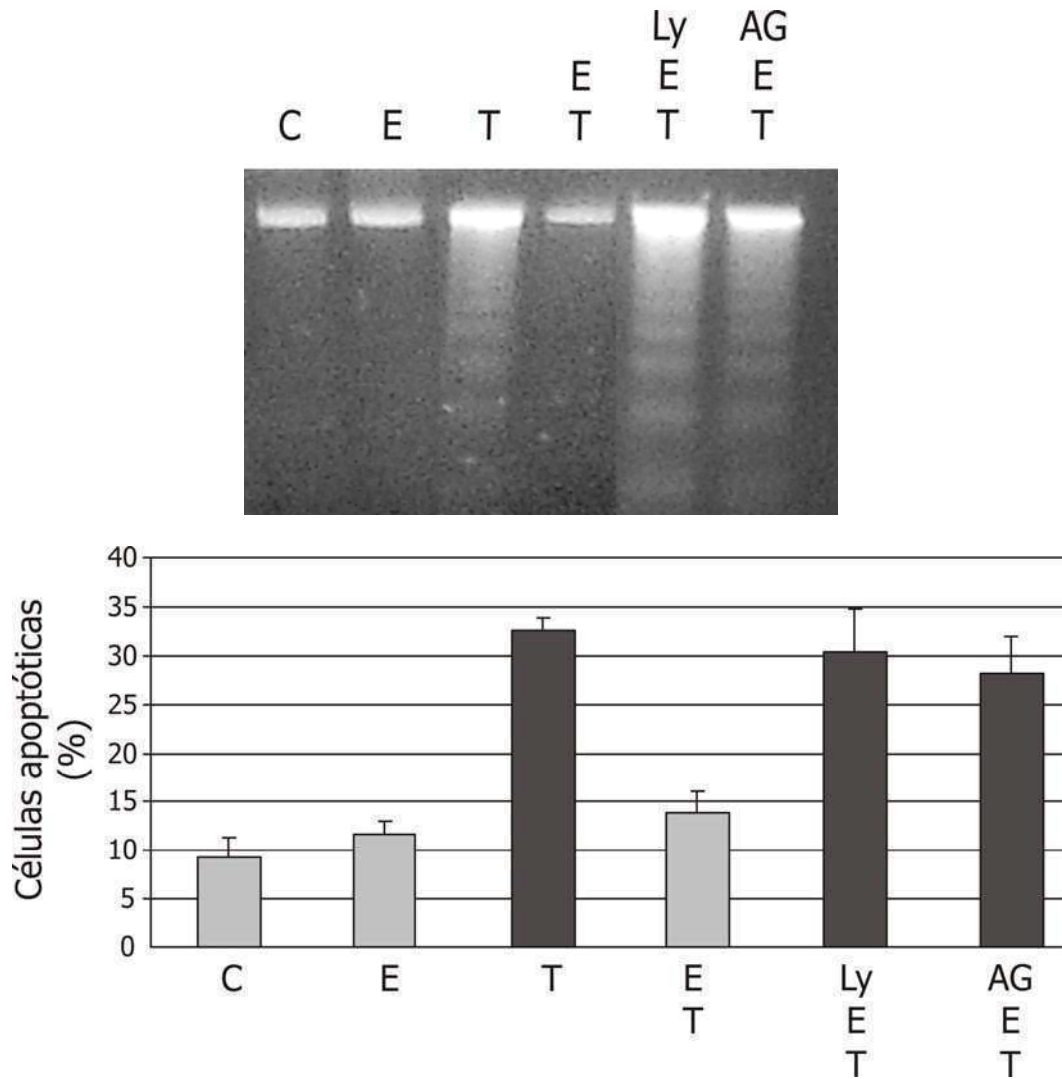
Por otra parte, en cultivos primarios de células endoteliales se ha descrito que el efecto protector de Epo sería mediado por la activación principalmente de la vía de PI3K (Zhande y Karsan, 2007).

## **XII. Efecto antiapoptótico de la eritropoyetina frente al daño celular inducido por TNF- $\alpha$**

Para investigar si la Epo es capaz de prevenir la muerte celular programada en nuestro modelo de células SH-SY5Y inducidas a apoptosis por TNF- $\alpha$ , realizamos ensayos de medición de los niveles de apoptosis tanto por la metodología de tinción de cromatina con Hoechst y recuento diferencial de células apoptóticas como por la técnica electroforética de *ladder*.

### ***¿Puede la Epo inducir un efecto antiapoptótico en las células SH-SY5Y?***

La Epo fue capaz de impedir la acción apoptótica del TNF- $\alpha$ . Al estudiar cómo es que la Epo produce su efecto neuroprotector en nuestro modelo realizamos los ensayos agregando un inhibidor de la vía de PI3K, Ly294200 y un inhibidor de la activación de JAK2, AG490. Se observa que, el agregado de estos inhibidores, bloquean, en parte, el efecto antiapoptótico de hormona.



**Figura 12. Efecto antiapoptótico de Eritropoyetina.** Las células fueron tratadas con 25 U/ml de Epo por 12 h y luego cultivadas con y sin TNF- $\alpha$  (E T y E, respectivamente). Los controles no recibieron tratamiento (C) o fueron expuestos sólo a la acción de la citoquina (T). Algunos cultivos fueron desarrollados en presencia de 25  $\mu$ M de Ly294200 o de AG490 por 12 h antes del agregado de Epo (Ly E T y AG E T). El típico *pattern de ladder* de la apoptosis inducida por TNF- $\alpha$  no se observó bajo los efectos de Epo. Además, la Epo fue capaz de impedir el desarrollo de células y cuerpos apoptóticos (E T vs. T,  $P < 0,01$ ). La adición de inhibidores bloqueó el efecto antiapoptótico de la hormona (Ly E T y AG E T). El número de células apoptóticas fue obtenido por recuento diferencial de núcleos fluorescentes mediante la metodología de tinción de la cromatina con Hoechst analizando un mínimo de 500 células/muestra. Cada barra indica la Media  $\pm$  SEM de 5 ensayos independientes.

**La Epo impide la inducción de apoptosis causada por TNF- $\alpha$ , y dicha acción protectora es bloqueada por los inhibidores Ly y AG, sugiriendo un importante rol de la activación de JAK2 y la señalización por parte de la vía PI3K frente al daño inducido por TNF- $\alpha$ .**

Estudios bioquímicos y genéticos han demostrado que JAK2 es un componente esencial para activar las vías de transducción de señales de REpo y que es necesario para la eritropoyesis normal. Sin embargo, sigue siendo controvertido respecto a la participación de JAK2 como único mediador de la señal de REpo (Pelletier *et al.*, 2006).

Por ejemplo, se ha descrito la activación de JAK2 y STAT5 como fase preliminar en el proceso de protección celular inducido por Epo en cultivos de células de miocardio (Schwartzberg *et al.*, 2006).

Por otra parte, la activación de JAK2 y PI3K y la subsiguiente supervivencia, jugarían un rol vital en la supervivencia y maduración celular en tumores de distintos orígenes (Sytkowski, 2007).

La activación de Akt/PKB por medio de la vía de PI3K, sería un mecanismo crítico en la protección inducida por Epo, mientras que la activación de otras vías secundarias, como ERK1/2 sólo contribuiría muy moderadamente (Signore *et al.*, 2006).

### **XIII. Mecanismos involucrados en la acción antiapoptótica de la eritropoyetina**

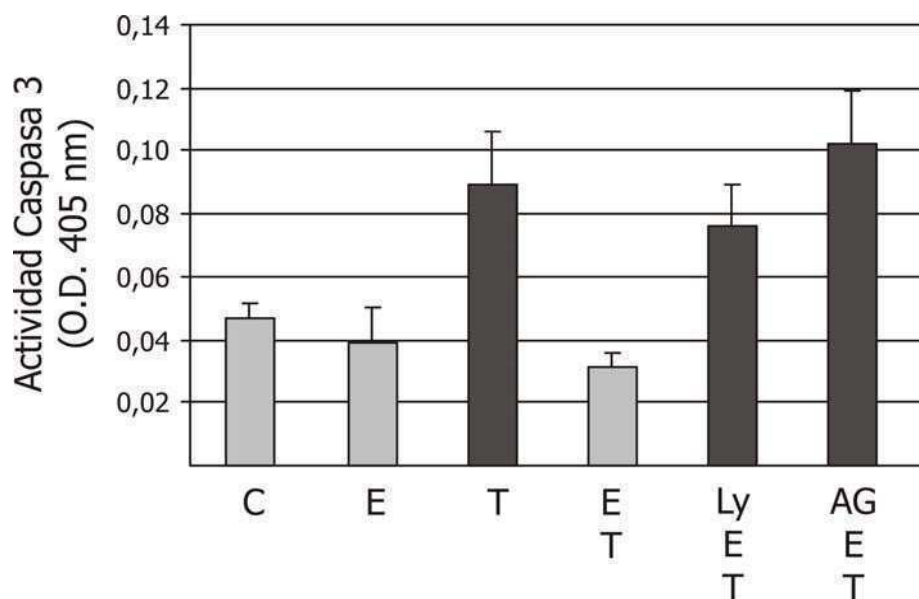
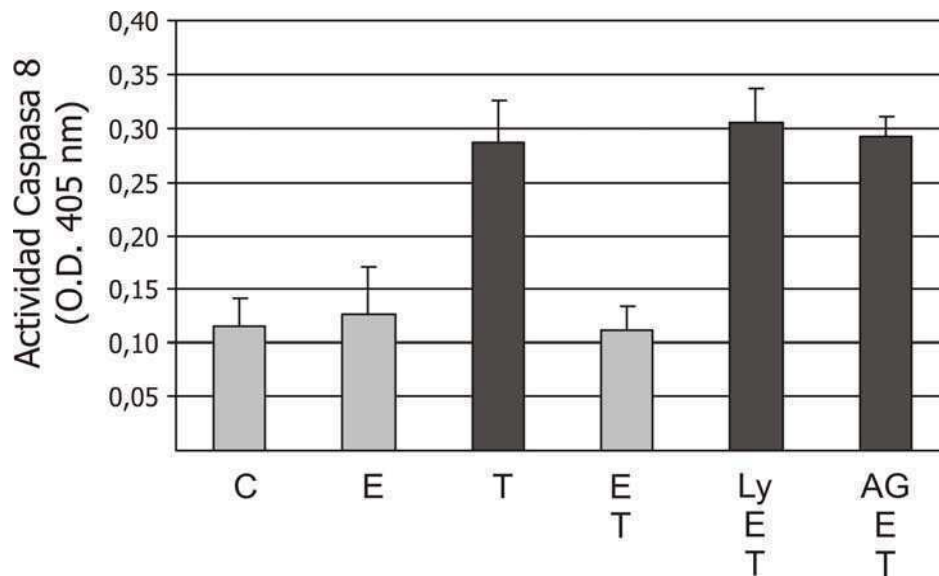
Dentro de la maquinaria que lleva a cabo el programa de apoptosis, los miembros ejecutores son los miembros de la familia de caspasas. El mecanismo de acción de las caspasas tiene importancia a la hora de explicar tanto su papel dentro de la apoptosis como su activación. Las caspasas se activan por proteólisis y cumplen todas las condiciones para que esta activación sea llevada a cabo por otras caspasas. Este proceso de activación puede permitir a las caspasas realizar su función con un efecto cascada que se va amplificando a sí mismo desde que se da la señal de inicio. En cuanto a los sustratos celulares sobre los que actúan las caspasas, éstos son proteínas que son clivadas de manera coordinada con la finalidad de hacerles perder su función o modificársela, de tal manera, que la organización celular resulte desmantelada. Una de las proteínas degradadas por caspasas es la poli(ADP-ribosa)polimerasa (PARP).

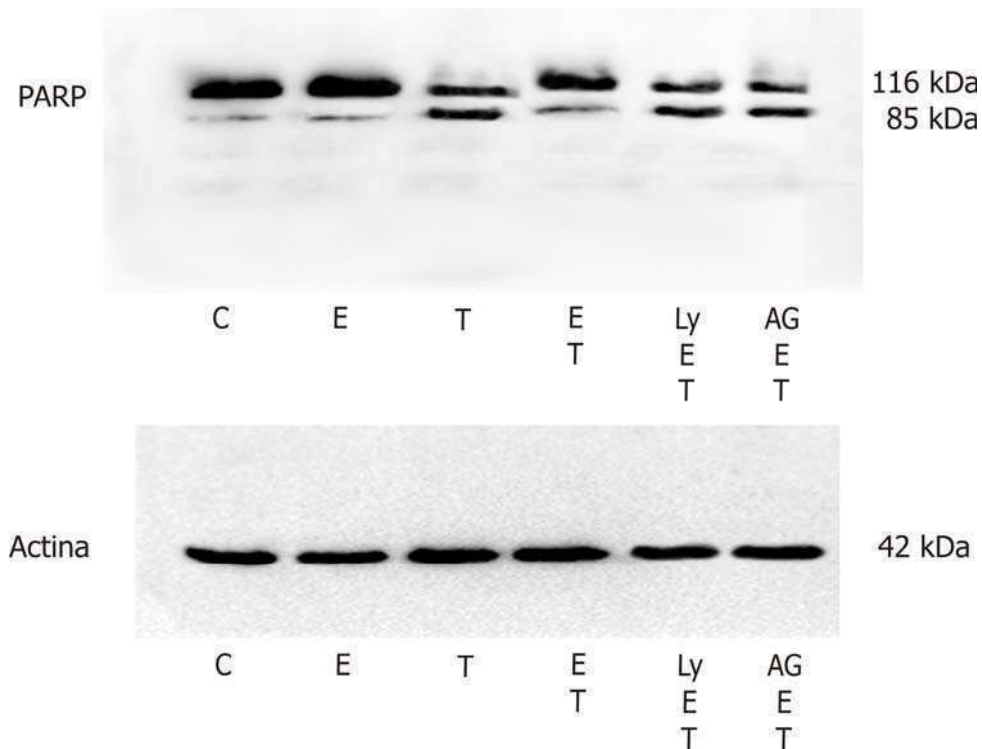
#### ***¿Qué acciones se encuentran asociadas al efecto antiapoptótico de la Epo frente al daño inducido por TNF- $\alpha$ ?***

Con el fin de estudiar la forma en que la Epo protege a las células SH-SY5Y afectadas por TNF- $\alpha$ , estudiamos distintos marcadores del proceso apoptótico. Los eventos que llevan a la apoptosis se desencadenan siguiendo un proceso finamente regulado. Para evaluar los distintos niveles donde se daría un efecto regulatorio por parte de la Epo en este modelo estudiamos, la actividad de caspasas. La activación de caspasa fue determinada espectrofotométricamente utilizando dos sustratos cromogénicos, IETD-pNA para caspasa 8 y Ac-DEVD-pNA para caspasa 3, mientras que el clivaje de PARP fue analizado por *western blotting*.

Observamos cómo la activación, primero de la caspasa 8 para luego activar la caspasa 3, sería la forma en que TNF- $\alpha$  afectaría a las células SH-SY5Y (Figura 13).

Por otra parte, el efecto neuroprotector de la Epo regularía negativamente dicho proceso, actuando antes e impidiendo, así, la activación de dichas proteasas. La inhibición de PI3K y JAK2 confirmarían la participación de estos caminos de señalización en la neuroprotección por Epo.





**Figura 13. Activación de caspasas por TNF- $\alpha$  y acción inhibitoria de eritropoyetina.**

Las células fueron tratadas con 25 U/ml de Epo por 12 h y luego cultivadas con y sin TNF- $\alpha$  (ET y E, respectivamente). Los controles no recibieron tratamiento (C) o fueron expuestos sólo a la acción de la citoquina (T). En los ensayos con inhibidores, Ly294200 o de AG490 por 12 h fueron agregados al medio de cultivo 12 h antes del pretratamiento con Epo (LyET y AGET). La actividad de caspasas fue determinada a través del clivaje de sustratos cromogénicos y por medición de la lectura espectrofotométrica del producto de degradación coloreado a 405 nm. La expresión de la proteína PARP fue analizada por *western blotting* utilizando un anticuerpo específico, el cual tiene la capacidad de unirse tanto a la proteína completa como a la porción de 85 kDa, generada por clivaje durante el proceso de apoptosis. Se observa un aumento significativo de la actividad de las caspasa 8 y caspasa 3, tanto cuando las células fueron expuestas a TNF- $\alpha$  (T vs. C,  $P < 0,01$ ) como cuando los inhibidores bloquearon el efecto neuroprotector de la Epo. En concordancia, la degradación del sustrato de caspasa 3, PARP, aumentó en los mismos ensayos. La Epo previno la activación de las caspasas y, en consecuencia, también el clivaje de PARP. El pretratamiento con Epo impidió la activación de las caspasas (ET vs. T,  $P < 0,005$ ) mientras que los ensayos con inhibidores cancelaron el efecto protector de la Epo. Cada barra corresponde a Media  $\pm$  SEM de 3 ensayos independientes.

**Los cultivos desarrollados en presencia de TNF- $\alpha$  inducen la activación de caspasa 8, caspasa 3 y, en concordancia, el aumento de la degradación de la proteína PARP. Estos resultados confirman que los mecanismos asociados a la muerte celular inducida por TNF- $\alpha$  en la línea de neuroblastoma SH-SY5Y involucran la activación de caspasas.**

**El pretratamiento con Epo impidió el clivaje de PARP, así como la previa activación de ambas caspasas. La inhibición de las vías de JAK2 y PI3K confirmó la participación de estos caminos de señalización en la neuroprotección mediada por Epo.**

En nuestro modelo celular, el tratamiento con TNF- $\alpha$  produjo la activación de los distintos intermediarios del proceso de muerte celular programada. Así, se observa cómo la activación de la caspasa 8, iniciadora del proceso apoptótico, llevó a la activación de la caspasa 3, ejecutora de la muerte celular programada, y finalmente esto provocó el clivaje de la proteína PARP.

En estudios se ha observado que el tratamiento con Epo reduciría los niveles de ARNm de distintos factores proapoptóticos, como así también la actividad de caspasa 8 y caspasa 3 (Lee *et al.*, 2006). En estudios con células epiteliales, la activación de distintas vías como PI3K y STAT5 determinaría la disminución en la actividad, tanto de caspasa 8 y de caspasa 3 como así también de caspasa 9 (Kolyada *et al.*, 2008).

#### **XIV. Regulación de la expresión de receptores de TNF- $\alpha$**

El TNF- $\alpha$  provoca sus efectos biológicos a través de dos receptores de TNF- $\alpha$ : p55 TNFR (TNFR1) y p75 TNFR (TNFR2). Los estudios han demostrado que TNFR1 contribuye a la muerte celular, mientras que el papel del TNFR2 podría ser el de aumentar la viabilidad neuronal, aunque aún no está clara esta diferencia.

Estos dos receptores, TNFR1 y TNFR2, han mostrado un solapamiento parcial tanto de los caminos de activación como de sus principales roles biológicos, dependiendo del tipo celular. Para analizar, posteriormente, la contribución de los receptores de TNF- $\alpha$  en la apoptosis celular inducida por la citoquina, primero examinamos la expresión de ambos subtipos de receptores en las células SH-SY5Y. Mediante el análisis por *Real Time*-PCR de las células en niveles basales, encontramos al receptor TNFR1 constitutivamente expresado, pero muy bajos niveles del TNFR2.

Los niveles del ARNm de TNFR1 fueron incrementados significativamente cuando las células fueron incubadas en presencia de TNF- $\alpha$  (Figura 14).

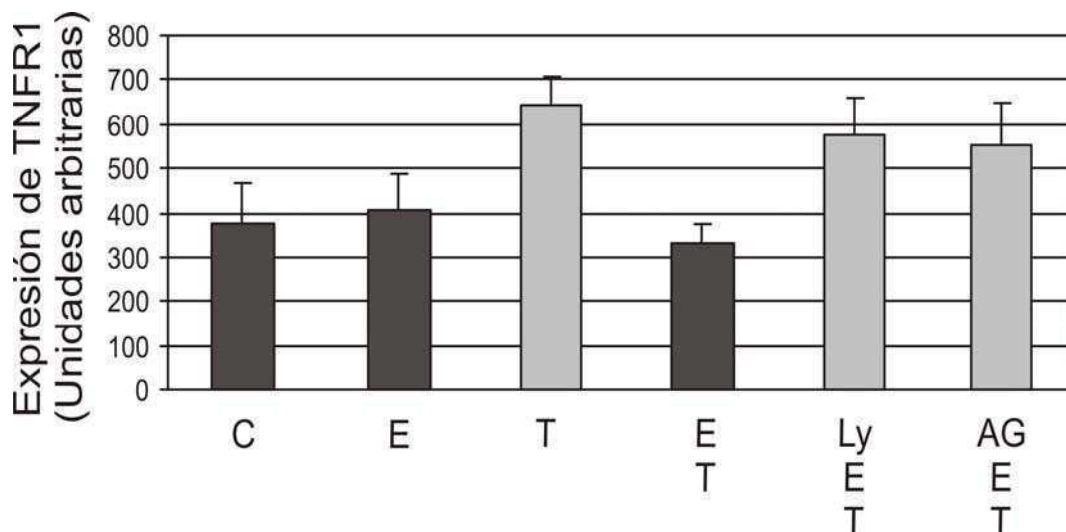
Decidimos investigar si la señalización del TNF- $\alpha$  podía ser modificada por la acción de Epo.

##### ***¿Es la Epo capaz de regular la expresión de los receptores de TNF- $\alpha$ ?***

Para responder la pregunta, realizamos ensayos de inducción de apoptosis con TNF- $\alpha$  y pretratamientos con la hormona. Utilizamos los distintos inhibidores para estudiar las vías de señalización que podrían estar involucradas (Figura 14).

Los ensayos de expresión, utilizando *Real Time*-PCR, demostraron muy baja expresión de TNFR2 en las células SH-SY5Y. Los bajos niveles de ARNm del TNFR2 no presentarían regulación mediada por Epo. Por el contrario el TNFR1, que se expresa en mayor medida, sería regulado por Epo, ya que su expresión disminuye significativamente cuando las células son pretratadas con Epo antes de la

inducción a apoptosis por TNF- $\alpha$ . El mecanismo de acción de Epo involucra las vías de señalización activadas por JAK2 y PI3K.



**Figura 14. Modulación de la expresión del receptor 1 de TNF- $\alpha$ .** Las células SH-SY5Y recibieron los tratamientos correspondientes al modelo de apoptosis inducida por TNF- $\alpha$  y de protección celular por Epo, mencionado en las figuras anteriores (Figs. 11-13). Los niveles de ARNm del receptor TNFR1 fueron determinados por *Real Time*-PCR. Si bien TNFR1 se encontró expresado constitutivamente en estas células, la incubación con la citoquina indujo un aumento significativo de su expresión (T vs. C,  $P < 0,05$ ), mientras que este efecto fue contrarrestado por el pretratamiento celular con Epo (ET vs. T,  $P < 0,05$ ) mediante mecanismos que involucran la activación de JAK2 y PI3K. Las barras indican Media $\pm$ SEM de 3 ensayos independientes.

**El aumento de la expresión del TNFR1 en cultivos expuestos al TNF- $\alpha$  contribuye a explicar el efecto proapoptótico de la citoquina.**

**La eritropoyetina es capaz de modular negativamente la expresión del TNFR1, disminuyendo, de esta forma, la posibilidad de acción de la citoquina sobre la célula.**

Se ha descrito la expresión de TNFR1 en células de origen neuronal y se ha demostrado que dicha expresión sería regulada positivamente por TNF- $\alpha$  mientras que algunas drogas neurotóxicas regularían negativamente su expresión (Figiel y Dzwonek, 2007). La disminución de la expresión de TNFR1 por Epo estaría mediada por la activación de la vía de PI3K. Sugerimos que la activación de dicha vía podría ser la responsable de la inhibición de la modulación positiva de TNFR1 al activar y translocar al factor de transcripción nuclear  $\kappa$ B.

En células tumorales, la activación de NF- $\kappa$ B se encuentra generalmente disminuida, y muchos autores sugieren que este hecho sería el responsable del aumento en la expresión del receptor de



TNFR1 y la reactividad frente al TNF- $\alpha$  (Bhattacharyya y Filipowicz, 2007; Shinnery *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007a).

## XV. Regulación de los miembros de la familia de Bcl-2

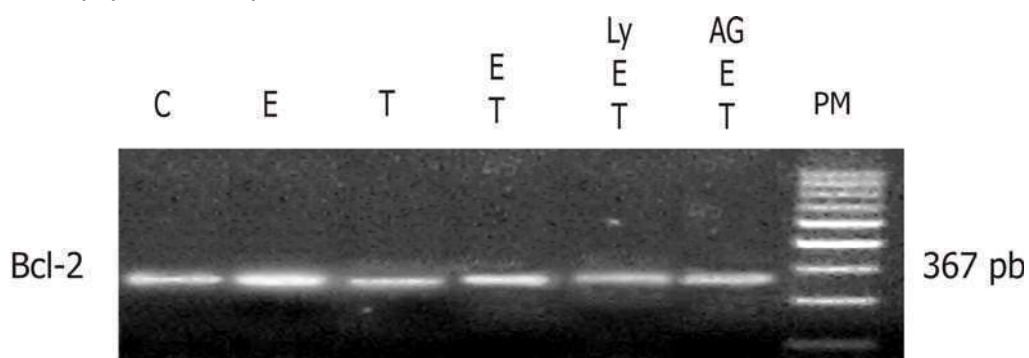
Un proceso como la apoptosis, que culmina con la muerte de las células y que cuenta con casi la totalidad de la maquinaria para llevarse a cabo ya sintetizada, a falta sólo de la señal que la ponga en marcha, necesita de mecanismos de regulación de gran exactitud y seguridad. Una de las vías de regulación de la apoptosis más importantes es llevada a cabo por la familia de proteínas que tiene como característica la homología de todos sus miembros con Bcl-2 que fue la primera descrita. Los miembros de esta familia tienen carácter anti o proapoptótico.

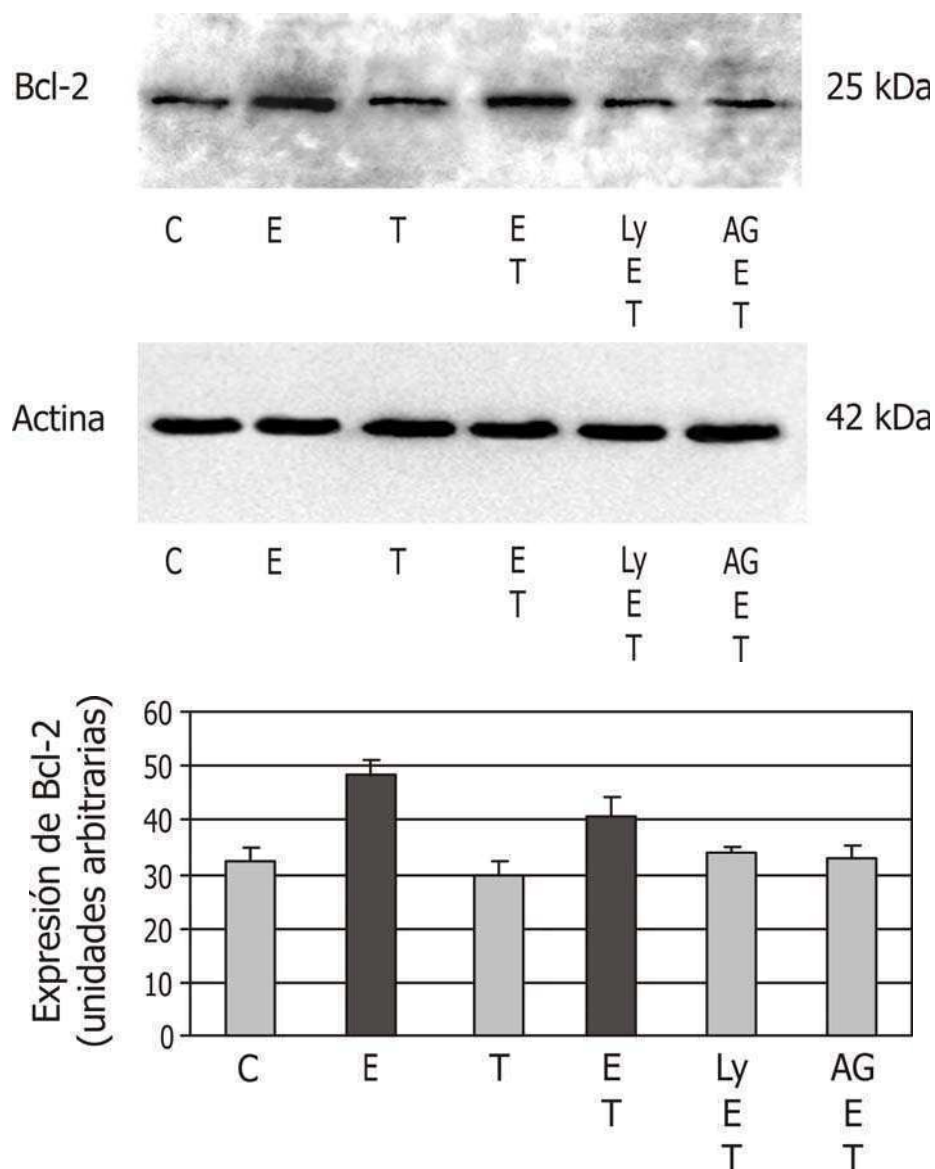
Como se menciona en la Introducción de este trabajo, los efectos antiapoptóticos de la Epo sobre células eritropoyéticas se han encontrados relacionados al aumento de los niveles de miembros antiapoptóticos de esta familia. También, hemos mencionado la modulación positiva de la proteína antiapoptótica Bcl-X<sub>L</sub> en los ensayos en los que Epo previno la apoptosis inducida por staurosporina (Fig. 8).

Por lo tanto, se realizaron estudios para determinar si proteínas de la familia de Bcl-2 estarían mediando el efecto de la Epo frente al daño ocasionado en las células SH-SY5Y por TNF- $\alpha$ . Mediante *Real Time*-PCR se estudió la regulación de varios miembros de dicha familia, utilizando los tratamientos indicados y utilizando los inhibidores de algunas vías de transducción de señales activadas por Epo.

### ***¿El efecto neuroprotector de Epo es mediado por la regulación de factores de la familia de Bcl-2?***

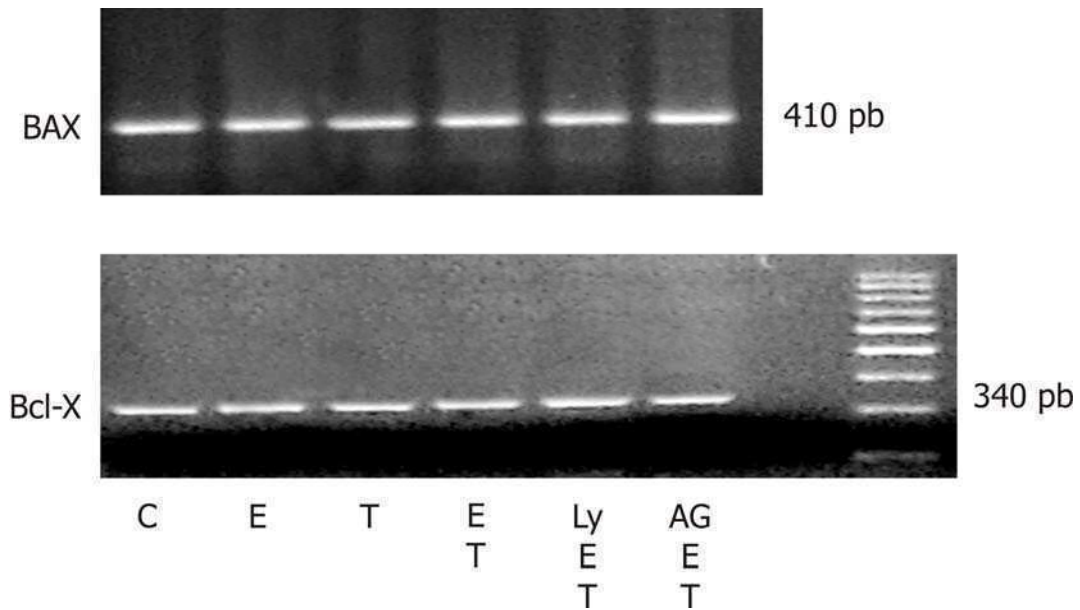
La medición de la expresión de factores de la familia de Bcl-2 mediante RT-PCR y luego por *Real Time*-PCR y *western blotting* puso en evidencia la participación, al menos en parte, del factor Bcl-2 en la acción antiapoptótica de Epo.





**Figura 15. Efecto de eritropoyetina sobre la expresión de Bcl-2.** Las células SH-SY5Y recibieron los tratamientos correspondientes al modelo de apoptosis inducida por TNF- $\alpha$  y de protección celular por Epo, descrito en las figuras anteriores (Figs. 11-13). Se determinó la expresión de Bcl-2 a nivel de ARNm (por *Real Time*-PCR) y de proteína (por *western blotting*). Al evaluar la modulación de la expresión del factor Bcl-2 por el tratamiento con Epo se observa un aumento significativo en su expresión, a nivel de ARNm y de proteínas (E vs. C,  $P < 0,05$ ,  $n = 4$ ), tanto en ausencia como en presencia de TNF- $\alpha$  (E y E T). Dicho aumento es bloqueado por la acción de los inhibidores específicos.

Se estudió también la modulación por Epo de otros miembros de la familia de factores Bcl-2, tales como Bax y Bcl-X<sub>L</sub>.



**Figura 16. Efecto de la eritropoyetina sobre la expresión de otros miembros de la familia Bcl-2.** Las células SH-SY5Y recibieron los tratamientos correspondientes al modelo de apoptosis inducida por TNF- $\alpha$  y de protección celular por Epo, descritos en figuras anteriores (Figs. 11-13). Mediante RT-PCR se estudiaron los niveles de ARNm de dos factores, tales como Bax, proapoptótico y Bcl-X<sub>L</sub>, antiapoptótico, los cuales podrían estar involucrados en la acción de la Epo. Los resultados muestran que los niveles de expresión de los factores estudiados no se vieron modificados por ninguno de los tratamientos realizados.

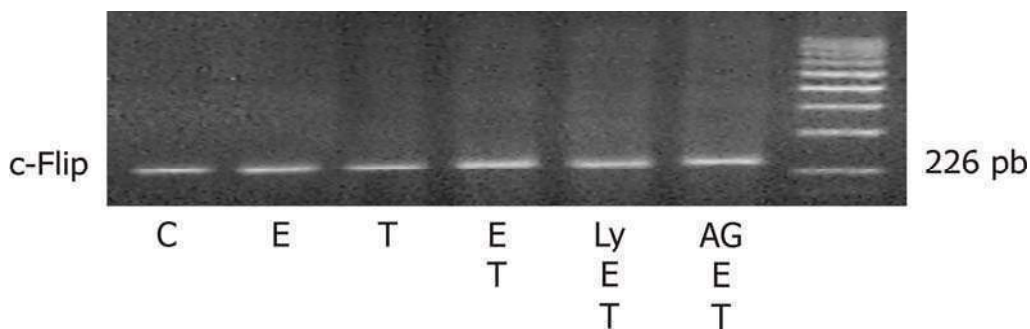
**El aumento en la expresión de Bcl-2 mediada por el accionar de la Epo evidencia un importante punto dentro de la regulación del proceso apoptótico que explica, al menos en parte, el efecto neuroprotector de la hormona frente al daño inducido por TNF- $\alpha$ . Por otro lado, la expresión de otros factores de la familia, como Bcl-X y Bax, no fue afectada en este modelo, si bien demostramos que pueden ser regulados positivamente en otros casos, como el de inducción por STP, donde se observó un aumento en la expresión de Bcl-X<sub>L</sub> sin modificaciones en la de Bcl-2.**

Los miembros de la familia Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bax, Bok, Bak, Bcl-X<sub>S</sub>, Bad, Bid, Bim, Bmf, Mcl-1S) se destacan tanto por su capacidad de regulación de la apoptosis como también por su efecto en la progresión del ciclo celular (Maddika *et al.*, 2007).

El incremento en la expresión de Bcl-X<sub>L</sub> sería esencial para la diferenciación y maduración en ciertos tipos celulares.

## XVI. Modulación de la expresión de c-Flip

Se conoce la participación de la proteína c-Flip en el mecanismo de apoptosis desencadenado por receptores de muerte. La expresión de esta proteína impediría la activación de la procaspasa 8 y, por lo tanto, la de toda la cascada de caspasas. Por este motivo, se determinaron los niveles de ARNm de c-Flip para determinar su participación en los eventos desencadenados por la citoquina inflamatoria, o bien durante el proceso de la protección celular inducido por Epo.



**Figura 17. Efecto de la eritropoyetina sobre la expresión de c-Flip.** Las células SH-SY5Y recibieron los tratamientos correspondientes al modelo de apoptosis inducida por TNF- $\alpha$  y de protección celular por Epo, descriptos en figuras anteriores (Figs. 11-13). Mediante RT-PCR se estudiaron los niveles de ARNm del factor antiapoptótico c-Flip, el cual podría estar involucrado en la acción del TNF- $\alpha$ . No obstante, los niveles de expresión del factor estudiado no se vieron modificados por ninguno de los tratamientos realizados.

**Los niveles de ARNm de c-Flip no resultaron modificados por los distintos tratamientos, sugiriendo que este factor no está involucrado en el proceso de apoptosis desencadenado por TNF- $\alpha$  ni en la neuroprotección ejercida por la eritropoyetina.**

El complejo de señalización inductor de muerte (*death-inducing signalling complex*, DISC) se forma en el segundo de los receptores trimerizados. Primero, el adaptador FADD (*FAS-associated death domain*) se une a través de su dominio de muerte al dominio de muerte del TNFR1. La procaspasa 8 es activada proteolíticamente y la caspasa 8 activa es liberada del DISC al citoplasma formando un heterotetrámero de dos subunidades pequeñas y dos grandes (Muzio *et al.*, 1996). La inhibición de esta ruta es realizada por proteínas que contienen dos DED, como por ejemplo FLIP (*FLICE inhibitory protein*), que se unen al complejo TNFR-FADD. Esta unión inhibe el reclutamiento y la activación de la caspasa 8 (FLICE) (Thome *et al.*, 1997; Yeh *et al.*, 2000).

Nuestros resultados no permiten involucrar la modulación de c-Flip en los mecanismos de apoptosis y antiapoptosis desarrollados en nuestro modelo celular.

Una posible explicación, entonces, de la sensibilidad de nuestro modelo celular frente al tratamiento con TNF- $\alpha$  sería la capacidad de que el aumento en la expresión del TNFR1 sea tal que no se vea una

modulación positiva en la expresión de c-Flip. Por otro lado, cuando las células fueron tratadas con Epo, la falta de modulación de la expresión de c-FLIP podría deberse a la activación de distintas vías de transducción de señales.

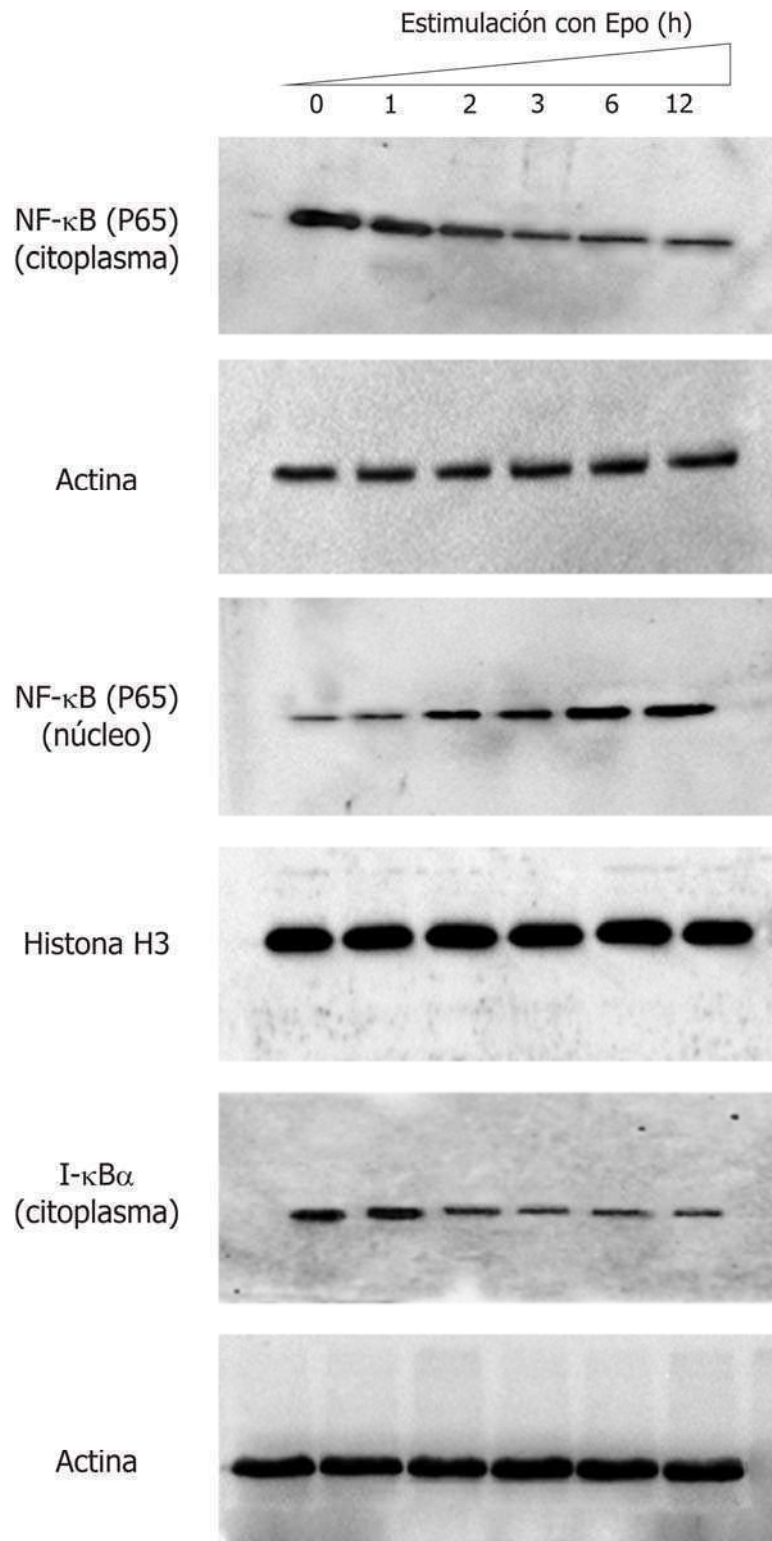
## **XVII. Activación de la vía de NF- $\kappa$ B**

Es conocido el efecto protector de la vía de NF- $\kappa$ B, al activar la expresión de genes relacionados con la supervivencia celular. En este contexto, la protección por Epo en distintos tejidos ha sido asociada a la activación de esa vía. Además, en ensayos de protección por Epo se ha descrito *cross-talk* entre las vías de JAK2 y de NF- $\kappa$ B. Como en resultados anteriores a este trabajo hemos mostrado que la vía de activación de JAK2 está altamente involucrada en la protección por Epo de las células SH-SY5Y frente a la apoptosis inducida por TNF- $\alpha$ , investigamos a continuación el rol de NF- $\kappa$ B en la activación por la hormona.

Por medio de los distintos tratamientos experimentales y utilizando la técnica de *western blotting* evaluamos la activación o no de dicha vía y la regulación de la misma por Epo.

### ***¿Es la Epo capaz de activar al factor NF- $\kappa$ B en las células SH-SY5Y?***

Para poder responder esta pregunta realizamos ensayos de cinética de activación de NF- $\kappa$ B realizando la exposición de los cultivos celulares a Epo por distintos tiempos. Se obtuvieron las fracciones subcelulares de núcleo y citoplasma y se evaluó la activación del factor mediante *western blotting*. La activación de NF- $\kappa$ B se puso en evidencia al observar su localización en la subfracción nuclear.



**Figura 18. Activación de NF- $\kappa$ B por eritropoyetina.** Se realizaron ensayos cinéticos para evaluar la translocación nuclear del factor NF- $\kappa$ B. Para ello, Las células SH-SY5Y fueron incubadas en presencia de 25 U/ml de Epo durante 0,1, 2, 3, 6 o 12 h. Luego, se obtuvieron subfracciones de núcleo y citosol las que fueron analizadas mediante *western blotting* empleando anticuerpos anti-p65

y anti-I $\kappa$ B. La disminución de los niveles de NF- $\kappa$ B en el citosol coincide con el aumento temporal del factor en la fracción nuclear, así como con la disminución del inhibidor en la fracción citoplasmática. Como control de carga proteica fueron empleados actina, en el análisis de fracciones citosólicas, e histona, en el análisis de fracciones nucleares. Los resultados son representativos de 3 ensayos independientes.

**La desaparición del NF- $\kappa$ B de la fracción citoplasmática, que se manifiesta ya a las 2 h, está asociada a la aparición de niveles crecientes del factor en la fracción nuclear. Al mismo tiempo, la desaparición del inhibidor I $\kappa$ B del citosol es consistente con su ubiquitinación y degradación vía proteasoma, permitiendo la translocación del NF- $\kappa$ B al núcleo donde activa la transcripción de genes *target*.**

NF- $\kappa$ B regula la expresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-X<sub>L</sub>, IAP's y c-FLIP (Ghosh y Karin, 2002; Karin *et al.*, 2002), lo que explicaría un efecto regulatorio sobre la expresión de Bcl-X<sub>L</sub> y c-FLIP en algunos modelos celulares de leucemia (Kitada *et al.*, 1999).

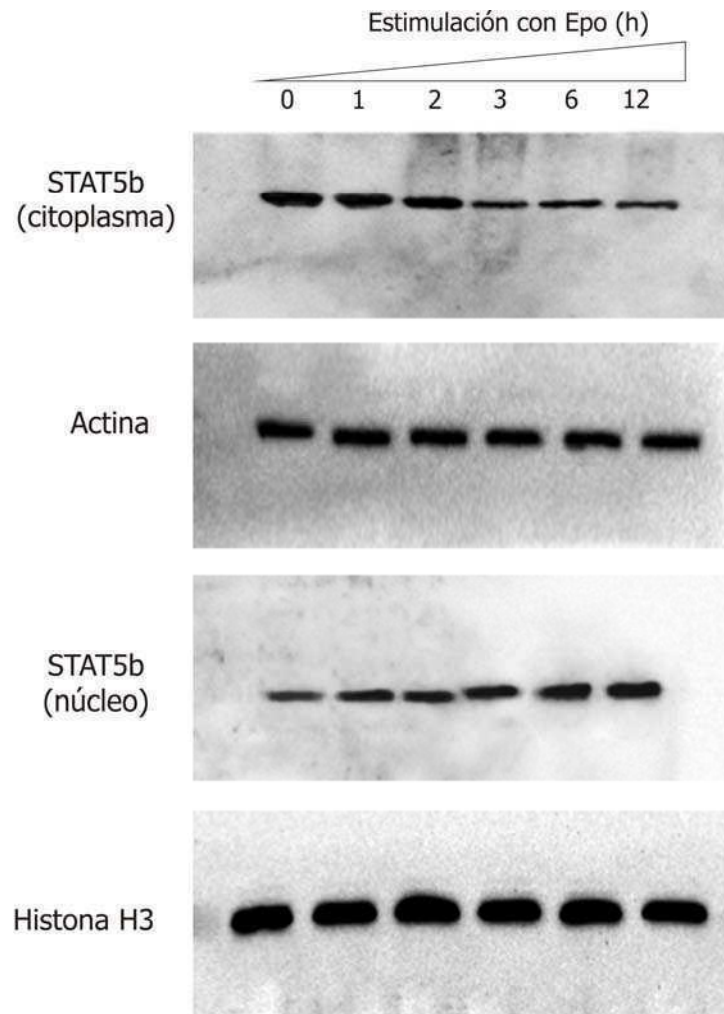
NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción heterodimérico formado por dos subunidades, p50 y p65 (RelA). La subunidad p50 contiene el dominio de unión a las secuencias *target* del ADN, mientras que p65 contiene el dominio de transactivación para el reclutamiento de coactivadores de la transcripción. De éste reclutamiento dependerá el grado de activación de los genes *target* y cuales de estos sean activados o no (Nakanishi y Toi, 2005).

## **XVIII. Activación de las vías de NF- $\kappa$ B y STAT5 por efecto de eritropoyetina**

Una vez que demostrada la activación de NF- $\kappa$ B por Epo y determinada la cinética de activación, resultó de interés investigar la posible interconexión con otras vías de transducción de señales más clásicas del REpo, como la de STAT5.

### ***¿La activación de STAT5 sigue la misma cinética que la de NF- $\kappa$ B?***

Para este análisis se utilizaron tratamientos de las células SH-SY5Y similares a los del ensayo de medición de la cinética de activación de NF- $\kappa$ B, es decir inducción con Epo por distintos períodos, fraccionamiento subcelular y detección de la activación y translocación de STAT5 al núcleo por *western blotting*.



**Figura 19. Activación de STAT5 por eritropoyetina.** Células SH-SY5Y fueron incubadas en presencia de 25 U/ml de Epo por diferentes períodos (0 a 12 h). Las fracciones subcelulares de citosol y núcleo fueron obtenidas como se describió en la Metodología y analizadas por *western blotting* empleando anticuerpo específico. Actina e histona fueron empleados como estándar interno de carga proteica en los ensayos correspondientes a las fracciones citosólica y nuclear, respectivamente. La curva de desaparición temporal de STAT5 del citosol coincide con la de su aparición en la fracción nuclear. Los *blots* que se muestran son representativos de 3 ensayos diferentes con resultados similares.

**El factor STAT5 es activado por inducción con eritropoyetina y dicha activación presenta una cinética similar a la observada para el factor NF- $\kappa$ B.**



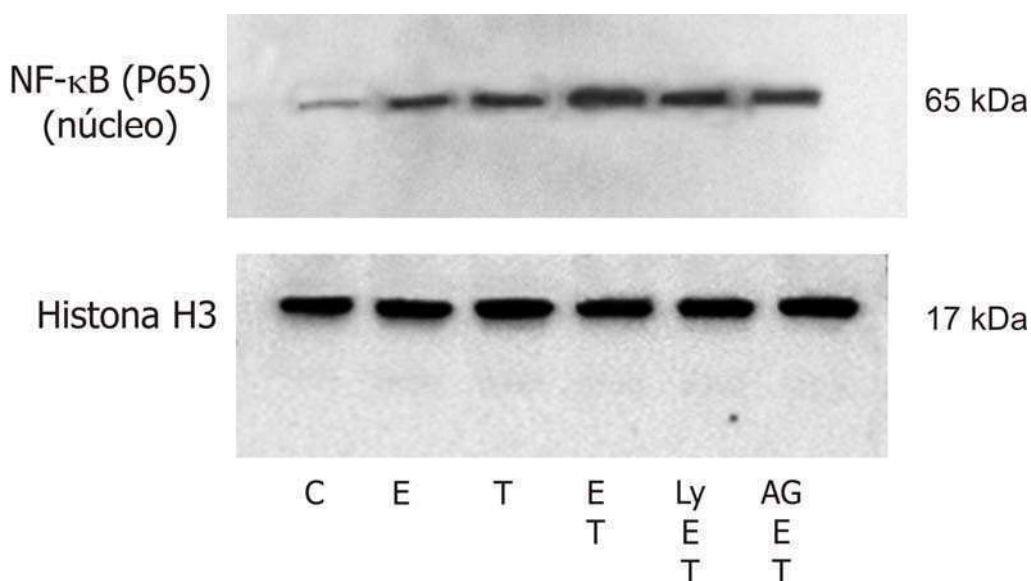
### XIX. Activación la vía de NF- $\kappa$ B por TNF- $\alpha$ y eritropoyetina

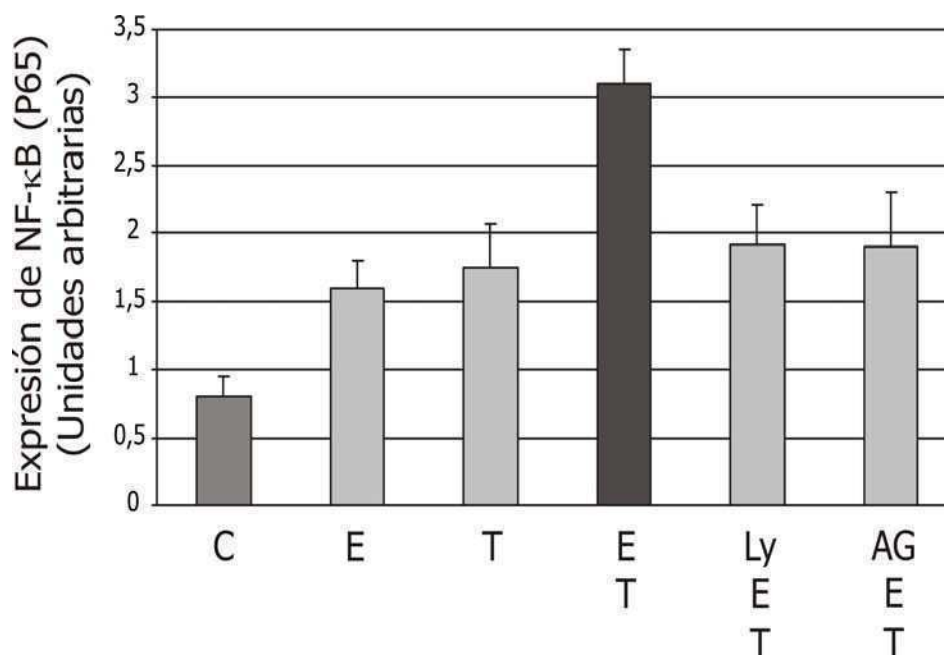
Ya demostramos la activación de la vía de NF- $\kappa$ B por Epo pero también es conocida la activación de dicha vía por el accionar del TNF- $\alpha$ . Esto nos llevó a estudiar la posible relación entre la activación de distintas vías de supervivencia y de muerte celular en nuestro modelo.

El estudio de la activación de las distintas vías de transducción de señales fue realizado con el objeto de entender el mecanismo por el cual la Epo modularía la respuesta desencadenada por el TNF- $\alpha$  y, tal vez, encontrar puntos de regulación compartidos por las dos señales que pudiesen explicar el efecto neuroprotector de la hormona.

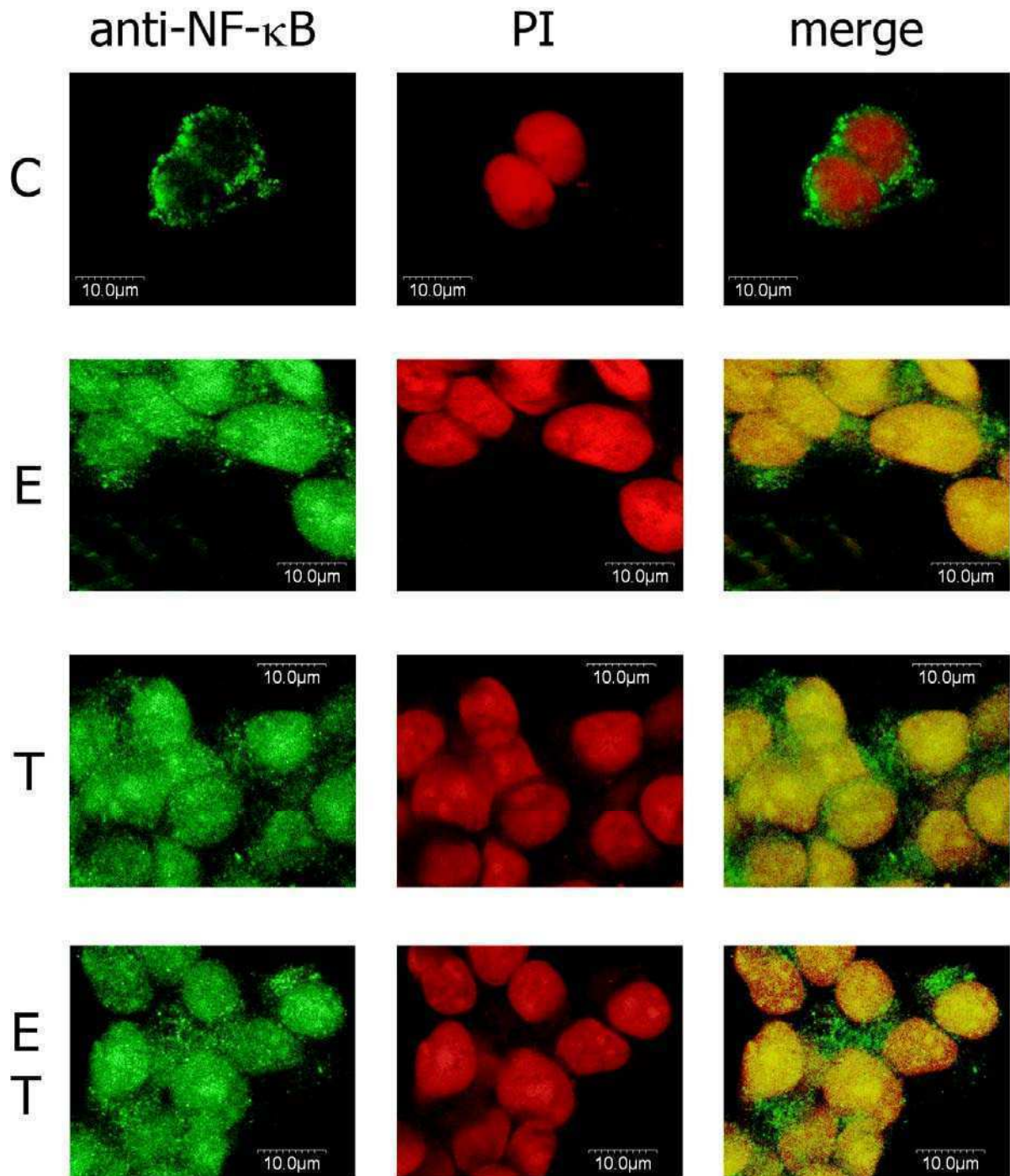
#### *¿Comparten Epo y TNF- $\alpha$ vías de transducción de señales?*

Luego de realizar tratamientos a distintos tiempos tanto con TNF- $\alpha$  como con Epo o inhibidores de PI3K y JAK2, se procedió a realizar la lisis celular y posterior fraccionamiento subcelular, con el fin de obtener y poder analizar la fracción nuclear. Mediante *western blotting* se evaluó la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (Figura 20).





**Figura 20. Activación de NF-κB por TNF-α y por eritropoyetina.** Las células SH-SY5Y fueron preincubadas con 25 U/ml de Epo por 12 h y luego, cultivadas en presencia o ausencia de 25 ng/ml de TNF-α por otras 12 h (ET y E). Células controles no recibieron tratamiento alguno (C) o fueron incubadas sólo con TNF-α (T). Las incubaciones en presencia de los inhibidores Ly294002 y AG490 fueron realizadas durante 12 h previas a cualquier otro tratamiento. Se utilizó la técnica de *western blotting* empleando el anticuerpo anti-NF-κB (P65). La igualdad de carga proteica nuclear fue confirmada por ensayos con histona. La observación de los resultados revela niveles aumentados de NF-κB en el núcleo cuando las células fueron incubadas con Epo, con TNF-α o con ambos factores simultáneamente. Los resultados mostrados son representativos de otros dos ensayos independientes.



**Figura 21. Imágenes de microscopía confocal de la activación de NF-κB.** Los tratamientos celulares fueron iguales a los descritos en la leyenda de la Figura 20. Las células fueron procesadas para tinción inmunofluorescente de acuerdo al protocolo indicado en la Metodología y los preparados analizados por microscopía confocal. El color verde indica la localización de la proteína p65 y el rojo indica la coloración nuclear por Ioduro de propidio. Las imágenes son representativas de otras dos determinaciones independientes con hallazgos esencialmente similares.

**Los resultados revelan niveles aumentados de NF- $\kappa$ B en la fracción nuclear cuando los cultivos celulares fueron incubados con Epo, con TNF- $\alpha$  o con ambos factores simultáneamente.**

**Se observa claramente una ampliación sinérgica de la señal positiva de translocación de NF- $\kappa$ B, mediada tanto por la activación de las vías del sistema Epo/REpo, PI3K y JAK2, como por las activadas por el sistema TNF/TNFR1.**

Los productos de los genes que son regulados por NF- $\kappa$ B presentan también la capacidad de activar a NF- $\kappa$ B. Las citoquinas proinflamatorias interleuquina-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  pueden, ambas, activar y son activadas por NF- $\kappa$ B. Este tipo de regulación positiva puede amplificar y perpetuar una señal, que podría regular o modular la respuesta inflamatoria (Barnes y Karin, 1997).

## **XX. Estudio de la regulación del receptor de eritropoyetina por TNF- $\alpha$**

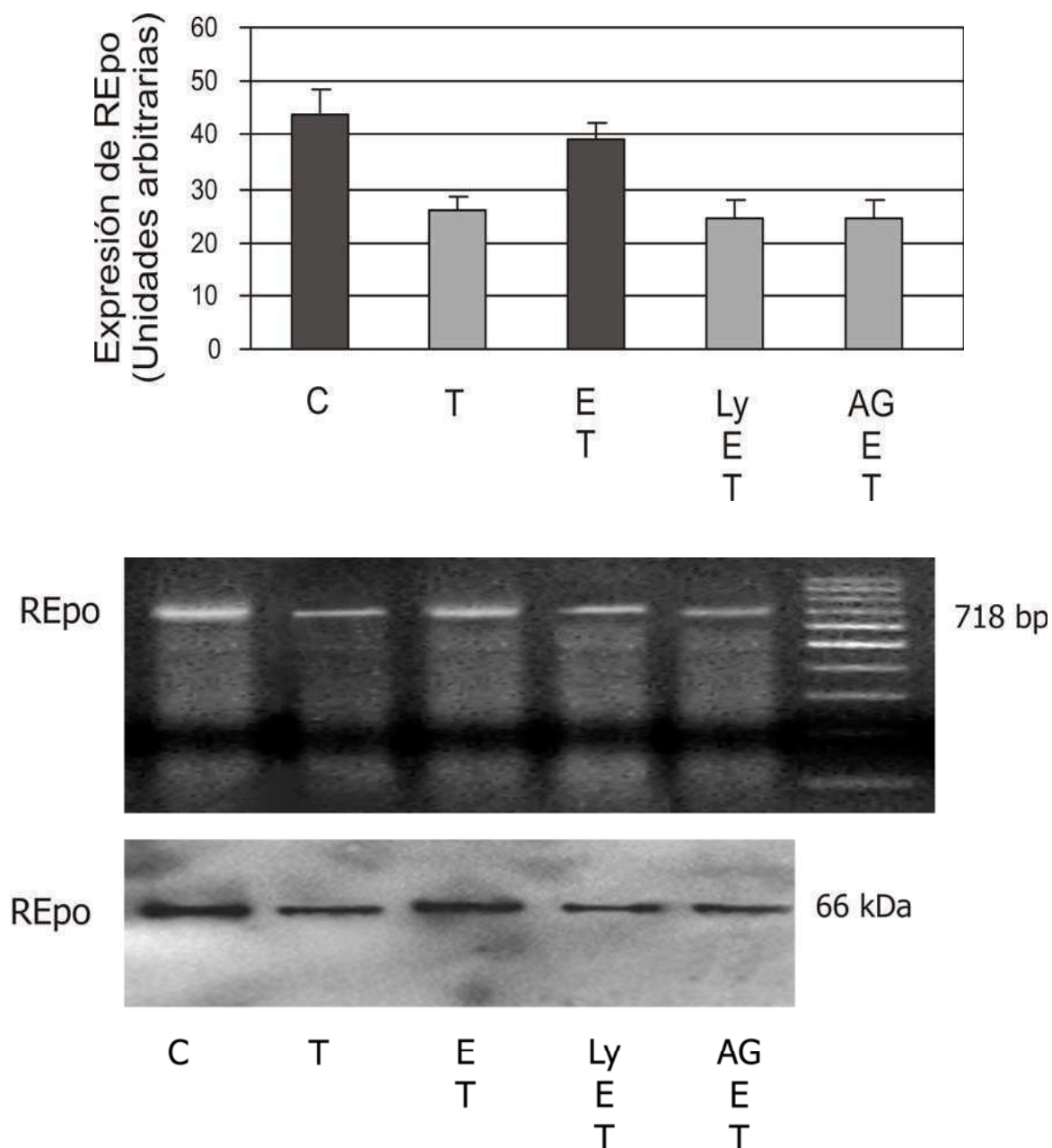
En las vías de señalización del proceso apoptótico se observa que las señales que lo activan o desactivan se encuentran formando parte de una red muy ramificada en sus inicios y que después va confluyendo hacia vías más comunes para terminar en una o unas pocas. Existen sobre todo algunos puntos clave de la regulación, situados al final dentro de la red, donde se deciden acciones tan drásticas para la integridad celular que constituyen auténticos puntos de no retorno. Todo esto nos llevó a pensar que la regulación en nuestro modelo debería darse en más de un punto, es que seguramente, tendrían algunos mediadores en común.

### ***¿Es regulada la expresión del REpo por TNF- $\alpha$ ?***

Mediante *Real Time*-PCR y utilizando *primers* específicos medimos la expresión a nivel de ARN del REpo después de los tratamientos celulares que se indican.

Utilizando un anticuerpo específico para REpo, realizamos mediciones de la expresión de REpo por *western blotting*.

Los resultados de estos ensayos en los que fue evaluada la expresión del REpo en nuestro modelo de células neuronales mostraron un efecto modulador de la expresión del receptor por parte del TNF- $\alpha$  (Fig. 22).



**Figura 22. Regulación de la expresión de REpo por TNF- $\alpha$ .** Se realizaron ensayos de *Real Time-PCR* y *western blotting*. En el primer caso, utilizando *primers* específicos, se observó una disminución en la expresión del REpo a nivel de ARNm cuando las células expuestas a TNF- $\alpha$  (T vs. C,  $P < 0.05$ ). Al tratar previamente los cultivos con Epo, se obtuvieron niveles de expresión semejantes a los del control, efecto que fue bloqueado por el tratamiento con los inhibidores, Ly y AG. A nivel de proteínas se observa un patrón de regulación muy similar.

**Se observa una regulación negativa en la expresión del REpo mediada por TNF- $\alpha$ , la cual es contrarrestada, al menos en parte, por la inducción de la expresión del REpo por la hormona.**

La activación del REpo en células neuronales previene la apoptosis inducida por NMDA (N-metil-D-aspartato) al desencadenar una activación cruzada entre las vías de señalización de JAK2 y NF- $\kappa$ B (Digicaylioglu y Lipton, 2001). Estos autores demostraron que la activación de REpo mediada por JAK2 conduce a la fosforilación del inhibidor de NF- $\kappa$ B (I- $\kappa$ B), y dicha activación produciría después la translocación del factor al núcleo. NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción heterodimérico formado por dos subunidades, p50 y p65 (RelA). La subunidad p50 contiene el dominio de unión a las secuencias *target* del ADN, mientras que p65 contiene el dominio de transactivación para el reclutamiento de coactivadores de la transcripción. De éste reclutamiento dependerá el grado de activación de los genes *target* y cuales de estos sean activados o no (Nakanishi y Toj, 2005).

En la secuencia del gen de REpo se encuentran sitios o motivos de diferentes factores de transcripción. Entre ellos, además de los ya conocidos y estudiados para STAT, se encuentran sitios  $\kappa$ B. La activación de la expresión de REpo mediada en parte por los factores de transcripción activados por las distintas vías de señalización (STAT5, PI3K, MAPK) produciría el aumento de la expresión del mismo. Frente a la activación del sistema TNF/TNFR1, con la consiguiente activación de NF- $\kappa$ B, se podría producir una disminución en la expresión del REpo en parte por la activación mayoritaria de otros genes *target* que compartirían al NF- $\kappa$ B como factor de activación y por otro lado debido a un posible bloqueo de los sitios B en respuesta a otros factores. Por otra parte, la capacidad de NF- $\kappa$ B de activar al gen de REpo podría estar modulada por otro actor, necesario para que los sitios  $\kappa$ B estén disponibles o necesarios para el correcto acoplamiento y activación del mismo.

Con todo esto, pensamos que la modulación negativa del REpo por parte de TNF- $\alpha$  se podría deber a una fina regulación de los distintos factores de transcripción involucrados en las vías de señales activadas por los dos sistemas, Epo/REpo y TNF/TNFR1, algunas de las cuales son compartidas y otras no. También es de notar que la vía de PI3K, principal vía antiapoptótica del sistema Epo/REpo estaría, al menos en parte, involucrada en dicha modulación, ya sea de forma directa o por activación de otra vía, como NF- $\kappa$ B.

## **DISCUSIÓN**

## **Discusión**

En el presente trabajo de tesis buscamos evidenciar mecanismos con el fin de ampliar los conocimientos sobre la actividad antiapoptótica atribuida a la eritropoyetina. Este conocimiento podrá permitir, en el futuro, desarrollar estrategias antiapoptóticas con un gran potencial terapéutico. Con este objeto, se estudió la acción de la Epo en modelos de apoptosis sobre una línea celular de origen neuronal, como así también algunas de sus potenciales vías de acción, a nivel de procesos que involucran la inactivación de caspasas, la modulación de factores de la familia Bcl-2 y de receptores de muerte, así como las vías de señalización mediadas por JAK/STAT y PI3K/Akt.

Las enfermedades neurodegenerativas representan la consecuencia final de un grupo de interacciones complejas a lo largo de la vida de un individuo, en las que intervienen la predisposición genética, algunas características innatas de poblaciones neuronales específicas y la exposición a toxinas endógenas y exógenas (Olanow y Tatton, 1999). La muerte celular se considera el principal mecanismo fisiopatológico asociado a la pérdida neuronal en estas enfermedades, que incluyen la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson. Aunque la etiología de la muerte neuronal en la mayoría de estos desórdenes permanece desconocida, diversas evidencias sugieren que, en el proceso de desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, las neuronas podrían morir por apoptosis (Honig y Rosenberg, 2000; Mattson, 2000; Yuan y Yankner, 2000). La apoptosis es un mecanismo de muerte celular programada que está involucrado en la homeostasis del tejido nervioso. Su desregulación está, frecuentemente, asociada a la patología de enfermedades neurodegenerativas, de tal forma, que las estrategias para evitar la apoptosis representan una valiosa herramienta para prevenir y/o retardar la aparición de la sintomatología en estos desórdenes. El rescate celular, que se refiere a los procesos para salvar células que se encuentran en proceso de degeneración, se considera parte del proceso protector. Es por eso que la neuroprotección es un tema principal en la investigación de sistemas terapéuticos y está enfocada al uso de factores de crecimiento como agentes farmacológicos que puedan prevenir la apoptosis.

En este contexto, la Epo está siendo investigada por su potencial rol neuroprotector, como se ha mencionado en distintas secciones de este trabajo. Es bien conocida la relación de la Epo con mecanismos de supervivencia, proliferación y diferenciación de células precursoras eritroides con el fin último de acrecentar la masa eritroide. Menos conocidas son, sin embargo, las diversas funciones mediadas por Epo y su receptor REpo en tejidos no hematopoyéticos.

Teniendo en cuenta que el inhibidor de proteína-quinasa, staurosporina, no sólo induce maduración sino que también dispara fenómenos apoptóticos en la línea de células SH-SY5Y (Mookherjee *et al.*, 2007; Um *et al.*, 2007; Yuste *et al.*, 2002), este modelo celular fue elegido para estudiar, en nuestro trabajo, su comportamiento frente al efecto antiapoptótico de la Epo. La aplicación de este modelo de células indiferenciadas sería particularmente relevante para estudiar el comportamiento de tejidos de origen neuronal. Por otra parte, la acción de la STP, en términos de su capacidad para inducir apoptosis transitoria durante la diferenciación celular podría asemejarse a condiciones a que son sometidos los tejidos in vivo.



En concordancia con otros autores (Mookherjee *et al.*, 2007; Um *et al.*, 2007; Yuste *et al.*, 2002), observamos que la STP produce, en las células SH-SY5Y, el desarrollo de signos de apoptosis, tal como la fragmentación de ADN, puesta en evidencia por el típico *pattern* electroforético de *ladder* y por la condensación de la cromatina nuclear, revelada por microscopía de fluorescencia, después de la tinción con Hoechst. Demostramos que estas manifestaciones pueden ser bloqueadas por un pretratamiento de las células con Epo, durante por lo menos 12 horas, antes de la inducción de apoptosis por STP. Este efecto protector no se manifestó cuando ambos, Epo y el inductor de apoptosis fueron incorporados simultáneamente al cultivo. Este resultado sugiere la necesidad de una activación celular por Epo. Un mecanismo que sustenta esta sugerencia es el aumento de la expresión de los receptores específicos (REpo), tanto a nivel de ARNm como de proteína, inducido por Epo en forma dosis-dependiente ya a las 6 horas de exposición, lo que derivaría en la amplificación de la señal de la hormona.

Una década después de comenzar a utilizar el término de apoptosis se identificó la primera proteína reguladora de la muerte celular programada. Contrariamente a los primeros oncogenes descritos, se vio que Bcl-2 promovía la supervivencia celular en lugar de la proliferación (Vaux *et al.*, 1988). Este descubrimiento fue importante para el nacimiento del concepto que describe que el bloqueo de la apoptosis es un efecto clave en el desarrollo tumoral. Los miembros de la familia Bcl-2 son factores que han despertado interés acerca del rol que pudieran cumplir en condiciones neuropatológicas, debido a su conocida participación en la regulación de la muerte celular durante el desarrollo del sistema nervioso. Se ha reportado que células SH-SY5Y con sobreexpresión de factores antiapoptóticos de esta familia resultaron protegidas frente a efectos neurotóxicos de  $\beta$ -amiloide (Luetjens *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2007b). En base a este conocimiento, postulamos que la Epo ejercería su efecto antiapoptótico en la línea neuronal SH-SY5Y a través de la regulación de factores de la familia Bcl-2, sugiriendo un mecanismo similar al descrito para las células hematopoyéticas (Benito *et al.*, 1996; Chong *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 1996). Bajo las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo, se observó una regulación positiva del factor antiapoptótico Bcl-X<sub>L</sub>, pero no de Bcl-2, por activación celular con Epo de células expuestas a STP. Este efecto protector de la hormona fue dependiente de la vía de activación de PI3K, ya que fue anulado por acción del inhibidor de esta vía, wortmanina. Este efecto diferencial observado entre la activación de Bcl-X<sub>L</sub> y Bcl-2 en el mismo tipo celular no ha sido demostrado en forma concluyente en otros trabajos. En el linaje eritroide, ambos factores antiapoptóticos están involucrados en la regulación de la supervivencia celular (Silva *et al.*, 1996), aunque parecería que Bcl-X<sub>L</sub> tuviera una mayor participación en la represión de la apoptosis por Epo (Benito *et al.*, 1996). Nuestros resultados también muestran una relevancia de Bcl-X<sub>L</sub> mayor que la de Bcl-2 en el efecto neuroprotector de la Epo sobre células SH-SY5Y inducidas a apoptosis por STP. Este hecho tendría su explicación en resultados de otros autores que sugieren una mayor eficiencia de Bcl-X<sub>L</sub> sobre Bcl-2 para prevenir la liberación de citocromo c desde la mitocondria (Yuste *et al.*, 2002). Aunque Bcl-2 es considerado un factor relacionado con la regulación de la diferenciación neuronal (Raguenez *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1996), nosotros no

encontramos aumento de la expresión de este factor en el proceso de maduración de las células SH-SY5Y por STP, al menos, en las condiciones de inducción empleadas en este trabajo.

De acuerdo con trabajos anteriores (Boix *et al.*, 1997; Prince y Oreland, 1997; Yuste *et al.*, 2002), encontramos que la STP no sólo actúa como un efectivo agente inductor de apoptosis, sino que, al mismo tiempo es un inductor de neurogénesis en estas células provenientes de neuroblastoma. Además, se observó un bloqueo de la diferenciación celular producida por concentraciones bajas (25 nM) de STP por el pretratamiento de las células con Epo en concentración de 25 U/ml. Sin embargo, esta concentración del factor neuroprotector resultó insuficiente para prevenir el efecto causado por dosis altas de STP (100 nM). Los resultados sugieren que la expresión de Bcl-X<sub>L</sub> inducida por Epo aumentaría el umbral de activación de los mecanismos apoptóticos. Sin embargo, no se puede descartar que la Epo contrarreste el efecto inhibitorio que la STP ejerce sobre la PKC, dado el rol atribuido a la activación de una isoforma de PKC en la diferenciación de progenitores eritroides en médula ósea humana mediado por Epo (Myklebust *et al.*, 2000).

Nuestro resultados confirman y extienden reportes anteriores acerca de la expresión del REpo en células neuronales y demuestran que la regulación del receptor es dependiente de la dosis de ligando. Este hallazgo podría explicar el efecto de la protección de las células SH-SY5Y por Epo frente a una agresión proapoptótica. El hecho de que ambos eventos inducidos por STP, apoptosis y diferenciación, fueran inhibidos por una previa exposición de las células SH-SY5Y a la Epo, sugieren la posibilidad de que ambos mecanismos fueron mediados por caminos de señalización comunes activados por la interacción Epo/REpo.

Una vez verificada la hipótesis que postulaba un potencial efecto antiapoptótico de la Epo sobre las células SH-SY5Y inducidas a apoptosis por STP, se trató de determinar cuál sería el comportamiento de la Epo frente a un daño celular producido por un compuesto fisiológico.

En diversas enfermedades del sistema nervioso central, la inflamación es un importante componente patogénico y se presenta con un aumento en la producción de citoquinas, infiltración leucocitaria y activación glial. Por eso, se eligió como inductor de apoptosis al factor de necrosis tumoral, TNF- $\alpha$ , caracterizado como una de las citoquinas proinflamatorias.

En la segunda parte de este trabajo hemos caracterizado algunos aspectos del proceso de muerte celular desencadenado por TNF- $\alpha$  sobre cultivos de células de la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y. El tipo de muerte celular producido fue identificado como apoptosis. Los resultados indican que la exposición de las células a concentraciones de 25 ng/ml de la citoquina por al menos 12 horas induce la aparición de células apoptóticas. Las células apoptóticas están caracterizadas por cambios morfológicos, bioquímicos y genéticos pero como estos signos generalmente no se producen en forma simultánea, en este trabajo se ha prestado especial atención a la aplicación de diferentes métodos. Se observó estrecha coherencia entre los resultados de ensayos cuali y cuantitativos, tales como determinación de la condensación de cromatina por tinción con reactivo de Hoechst y evaluación por microscopía de fluorescencia, fragmentación de ADN por la técnica de *ladder*, y medición de la

activación de caspasas a través de su habilidad para clivar sustratos cromogénicos e inducir la degradación de PARP.

El TNF- $\alpha$ , una citoquina que ejerce funciones pleiotrópicas relacionadas con inmunidad, inflamación y apoptosis, es el prototipo de una familia de citoquinas de las que día a día se describen nuevas funciones. Aunque este factor es actualmente reconocido como un potente inductor de caminos de señalización que conducen a la activación del factor NF- $\kappa$ B, también es capaz de inducir apoptosis por activación de los receptores de muerte. Induce señales a través de los receptores TNFR1 y TNFR2, los cuales han sido hallados en una variedad de células. En la línea celular SH-SY5Y, detectamos principalmente la expresión de TNFR1 y sólo una débil expresión de TNFR2. No obstante ha sido reportado que la presencia de TNFR1 sería suficiente para inducir la mayoría de las respuestas mediadas por TNF- $\alpha$ , tales como activación de NF- $\kappa$ B, citotoxicidad o proliferación. También ha sido demostrado que, en algunos tipos celulares, TNFR2 puede mediar respuestas celulares similares a las mencionadas, es decir activación de NF- $\kappa$ B, proliferación o muerte celular. Algunos reportes han mostrado distintas responsabilidades de ambos receptores en el amplio repertorio, aunque se necesita más investigación para clarificar completamente el rol específico que cumplen estos receptores. Los efectos diferenciales atribuidos a TNFR1 y TNFR2 podrían explicar nuestros resultados que mostraron una estrecha asociación entre la regulación positiva de la expresión de TNFR1 y el efecto proapoptótico de la citoquina, sin observarse la participación del TNFR2.

La apoptosis mediada por el receptor de muerte TNFR1 involucra señales secuenciales. El complejo inicial localizado en la membrana plasmática (complejo I), compuesto por TNFR1, la proteína adaptadora TRADD (TNFR1-associated death domain protein), la quinasa RIP (receptor-interacting protein) y el TNFR2, rápidamente induce la activación de NF- $\kappa$ B. En un segundo paso, TRADD y RIP se asocian con FADD (*FAS-associated death domain protein*) y con procaspasa 8, formando un complejo citoplasmático (complejo II). Así, las señales de transducción mediadas por TNFR1 incluyen un doble vía, induciendo muerte celular en aquellas instancias en las que no pueden ser activadas las señales iniciales (Micheau y Tschopp, 2003). Como consecuencia de la activación de la procaspasa 8 se inicia la activación de la cascada de caspasas. Consistente con este mecanismo, nosotros encontramos aumentada la actividad de caspasa 8 después de que las células SH-SY5Y fueran cultivadas en presencia de TNF- $\alpha$ . A continuación, la caspasa 8 activa a la caspasa 3, la cual participa en la ejecución del proceso de apoptosis. Esto explica la coherencia de los hallazgos que mostraron el aumento de la actividad de ambas caspasas, 8 y 3, así como la degradación de PARP, sustrato de la caspasa 3 activa.

Algunos autores apoyan una acción antiinflamatoria directa de la Epo sobre las neuronas mientras otros sostienen que ésta ejercería su efecto a través de su actividad antiapoptótica.

Así como demostramos que la apoptosis inducida por STP en la línea celular SH-SY5Y podía ser prevenida por un tratamiento previo de las células con Epo, un efecto protector similar fue observado frente a la apoptosis inducida por TNF- $\alpha$ . Al igual que en los ensayos con STP, la muerte celular

programada inducida por TNF- $\alpha$  no pudo ser neutralizada cuando la Epo fue adicionada simultáneamente con el inductor de apoptosis.

Uno de los efectos derivados de la incubación celular con Epo fue detectado a nivel de la regulación de los receptores de TNF- $\alpha$ . Al mismo tiempo que se observó un aumento de la resistencia de las células a la apoptosis, la Epo impidió la regulación positiva de la expresión de TNFR1 inducida por la citoquina. Este hallazgo sustenta la hipótesis de que la sensibilidad que mostraron las células SH-SY5Y al TNF- $\alpha$  se debería al aumento de la expresión de los receptores de muerte inducida por la citoquina. Por otra parte, hemos demostrado que la acción protectora de la Epo es dependiente de diversas vías de señalización. Por ejemplo, en ensayos con el inhibidor AG490 se encontró involucrada la vía de JAK2. Los mecanismos por medio de los cuales la Epo se relaciona con la transcripción de determinados genes han sido ampliamente estudiados en el sistema hematopoyético. Una vez que la Epo se une a su receptor, la proteína JAK2, que se encuentra asociada al dominio citoplasmático del REpo, es rápidamente activada por transfosforilación. Subsecuentemente, los residuos tirosina del REpo se fosforilan, constituyendo sitios de enlace para moléculas de señalización que contienen dominios con homología Src, entre ellas STAT5 y PI3K. La vía PI3K/Akt puede participar en la supervivencia celular y neuroprotección mediante el bloqueo de la apoptosis, la promoción de la proliferación celular y la regulación de vías adicionales de señalización celular. En neuronas, la PI3K y su mediador corriente abajo, PKB o Akt (PKB/Akt), median señales de supervivencia, diferenciación y proliferación neuronal (Huang y Reichardt, 2001; Zhou *et al.*, 1998). Estas vías activadas por diversos factores de crecimiento constituyen un punto crucial en el cual convergen diversas señales de supervivencia celular (Kandel y Hay, 1999). La unión de factores de crecimiento a los receptores de tirosina-quinasa causa autofosforilación de sus residuos tirosina, reclutamiento de proteínas adaptadoras como Shc, acoplamiento corriente abajo y activación de las vías PI3K/Akt y Raf/MEK/ERK (Chao, 2003; Huang y Reichardt, 2003).

Los sustratos de Akt incluyen la inactivación por fosforilación de mediadores proapoptóticos (Bad, Bax, caspasa 9, factor de transcripción Forkhead, GSK-3, p53), y la activación de proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, IAP y mTOR) (Datta *et al.*, 1997; Gao *et al.*, 2003; Kennedy *et al.*, 1999; Zheng *et al.*, 2002). En neuronas, se ha demostrado que Akt regula la supervivencia pero no el crecimiento y la diferenciación (Kaplan y Cooper, 2001). Probablemente Akt media la supervivencia neuronal a diferentes niveles dependiendo del tipo celular, de la disponibilidad de blancos y del requerimiento de eventos transcripcionales o postranscripcionales (Rokudai *et al.*, 2000). El desarrollo de terapias dirigidas contra componentes específicos de la vía PI3K/Akt y sus blancos río abajo, puede constituir una de las principales opciones para la regulación de la muerte celular y un blanco terapéutico para favorecer la supervivencia neuronal de las poblaciones más susceptibles.

En este trabajo, demostramos que el efecto protector que la Epo ejerce sobre las células SH-SY5Y es dependiente de la activación de PI3K. Además, el estímulo de estas células con Epo mostró la activación del factor de transcripción STAT5, dado que la desaparición de este factor del citosol coincidió con niveles crecientes en la subfracción nuclear. En conjunto los resultados indican que, al

igual que en progenitores eritroides, la acción antiapoptótica de la Epo sobre células neuronales está asociada a la activación de las vías JAK/STAT y PI3K.

En el endotelio el factor Akt, mediador de la vía PI3K, promueve la supervivencia inhibiendo la apoptosis mediada por FAS al regular la expresión de FLIP (proteína inhibitoria de FLICE), FLIP interactúa con FADD (dominio de muerte asociado a FAS), bloqueando la activación de la caspasa 8 (Panka *et al.*, 2001). Debido a ello, la inducción de c-FLIP por Epo podría haber sido uno de los posibles mecanismos que permitieran explicar la acción protectora de la hormona en nuestro modelo celular. Sin embargo, no se observó modificación de la expresión de este factor debido al pretratamiento celular con Epo.

Otro mecanismo descrito para la acción antiapoptótica de Epo involucra *cross-talk* entre JAK2 y NF- $\kappa$ B (Digicaylioglu y Lipton, 2001). Nuestros resultados podrían concordar con este concepto, ya que hemos comprobado que la activación de células SH-SY5Y por Epo involucra a la vía mediada por JAK2 e induce la expresión y translocación de NF- $\kappa$ B. Los ensayos cinéticos mostraron que la desaparición de este factor del citoplasma coincidía con el aumento progresivo del mismo en la fracción nuclear. La disminución simultánea de I $\kappa$ B, además, supone una rápida degradación de este inhibidor. Estos resultados concuerdan con el mecanismo propuesto para otros sistemas celulares: la Epo activa las I $\kappa$ Ks, quinasas que fosforilan al I $\kappa$ B lo cual lo lleva a ubiquitinación y degradación en el proteasoma; esto conduce a la desinhibición de NF- $\kappa$ B y le permite translocarse al núcleo donde activa la transcripción de sus genes *target* (Bittorf *et al.*, 2001).

La familia Bcl-2 está constituida por un grupo de proteínas involucradas en la regulación de la muerte celular, que incluye miembros con actividad proapoptótica o antiapoptótica (Adams y Cory, 1998; Allen *et al.*, 1998; Brown, 1997; Kidd, 1998). Las proteínas Bcl-2 antiapoptóticas se localizan principalmente a nivel de membranas, en particular en la membrana mitocondrial externa (Hockenbery *et al.*, 1990; Marzo *et al.*, 1998; Zamzami *et al.*, 1998), mientras que la mayoría de los miembros proapoptóticos se encuentran en el citosol pero, luego de un estímulo apoptótico, sufren un proceso de translocación a las membranas, particularmente de la mitocondria y del retículo endoplásmico (Gao *et al.*, 2001; Putcha *et al.*, 1999; Vander Heiden y Thompson, 1999). Diversos estudios han demostrado que los miembros pro y antiapoptóticos de la familia Bcl-2 alteran o mantienen la homeostasis mitocondrial respectivamente, mediante la formación de nuevos canales o mediante el control de canales preexistentes en la mitocondria. Así, miembros antiapoptóticos como Bcl-2 y Bcl-X<sub>L</sub> impiden la pérdida de la homeostasis mitocondrial y la liberación de mediadores proapoptóticos confinados dentro de la mitocondria, mientras que los miembros proapoptóticos alteran la homeostasis y permiten la liberación de mediadores proapoptóticos hacia el citosol (Banasiak *et al.*, 2000; Brenner *et al.*, 2000; Gross *et al.*, 1999; Kroemer y Reed, 2000). De acuerdo con este modelo de "reóstato" de los factores Bcl-2, el balance entre los miembros proapoptóticos y antiapoptóticos define la sensibilidad celular hacia estímulos apoptóticos particulares (Goping *et al.*, 1998; Gross *et al.*, 1998).

Con respecto al efecto antiapoptótico de la Epo frente a la muerte celular inducida por TNF- $\alpha$ , detectamos que induce la expresión del factor Bcl-2, a diferencia de la acción de la hormona cuando

el daño celular fue causado por STP, donde se observó un aumento de la expresión de Bcl-X<sub>L</sub> y no de Bcl-2. Los resultados sugieren que la modulación de estos factores antiapoptóticos dependen del tipo de agente apoptótico y/o de la magnitud del daño celular. En un modelo de roedores con injuria debida a isquemia hipóxica se encontró el aumento de Bcl-2 pero ello no ocurrió en todos los animales, sugiriendo los autores que la modulación de la expresión de este factor debería estar influenciada por el grado de daño celular y otros factores, como los específicos de especie (Akhtar *et al.*, 2004).

La unión de TNF- $\alpha$  a su receptor también indujo la activación de NF- $\kappa$ B. Se sabe que esta citoquina proinflamatoria tiene un rol clave en una amplia variedad de procesos fisiológicos, incluyendo inflamación, proliferación y muerte celular programada. Estos efectos biológicos pleiotrópicos que manifiesta el TNF- $\alpha$  derivan de su habilidad para iniciar diferentes caminos de señalización intracelulares. De hecho, la activación del TNFR1 es capaz de activar dos caminos simultáneamente, lo que lleva a la inducción de apoptosis y a la activación de NF- $\kappa$ B al mismo tiempo. Se ha reportado que la activación de este factor es inducida por mecanismos similares por ambos, Epo y TNF- $\alpha$  (Marchetti *et al.*, 2004). Nosotros encontramos el aumento de la localización nuclear de NF- $\kappa$ B no sólo por la activación celular por Epo sino también causado por la presencia de TNF- $\alpha$ . Más aún, el tratamiento celular con ambos factores indujo efectos aditivos sobre los niveles del factor nuclear. Sin embargo, a pesar de la capacidad del TNF- $\alpha$  para inducir la activación de NF- $\kappa$ B, tal mecanismo no pudo impedir la apoptosis inducida por la citoquina en las células SH-SY5Y. Estos resultados permiten concluir que la regulación de la vía de señalización con efecto antiapoptótico de la Epo podría compartir, al menos, algunos elementos con vías de señalización activadas por TNF- $\alpha$ . Esto explicaría por qué el aumento de Bcl-2 durante la acción antiapoptótica de la Epo, es evidente cuando el TNF- $\alpha$  produjo un cierto grado de apoptosis. De igual forma el efecto protector de la Epo frente al daño inducido por el tratamiento con STP, fue mediado por el aumento en la expresión de Bcl-X<sub>L</sub>, aumento que fue el resultado de la respuesta al daño y no producido en forma directa por el tratamiento con la hormona. Además, el *cross-talk* entre las vías activadas por receptores de muerte y por la acción mediada por Epo/REpo se pone en evidencia por el efecto negativo del TNF- $\alpha$  sobre la expresión de los receptores de Epo.

Se puede sugerir que la activación de una vía podría alterar el balance de la otra, lo que explicaría la acción dual del TNF- $\alpha$ , como factor de supervivencia o apoptosis. Distintos factores involucrados podrían estar determinando el *switch* entre supervivencia y muerte celular. Esta interacción entre las distintas vías de señalización también tendría relevancia en la acción antiapoptótica de la Epo, la cual se vería interferida por la presencia de factores proinflamatorios.

## **CONCLUSIONES FINALES**

### **Conclusiones finales**

1. La staurosporina es un buen inductor de apoptosis en las células de neuroblastoma SHSY-5Y, y dicho proceso de muerte celular programada puede ser prevenido por tratamiento con eritropoyetina.
2. El efecto neuprotector de la eritropoyetina, frente al daño inducido por staurosporina, es mediado por la activación de las vías de PI3K y JAK2 y modula la expresión de Bcl-X<sub>L</sub>.
3. El efecto diferenciador de la staurosporina sobre nuestro modelo celular es prevenido por el pretratamiento con eritropoyetina, y dicho efecto dependería de la activación de las mismas vías de transducción de señales.
4. El modelo de células SH-SY5Y es susceptible al TNF- $\alpha$ , observándose el desencadenamiento de un proceso de muerte celular programada, mediado por la regulación positiva del receptor 1 de TNF.
5. El efecto de TNF- $\alpha$  puede ser prevenido por tratamiento con Eritropoyetina, a través de mecanismos mediados por la activación de distintas vías como STAT5, PI3K y NF- $\kappa$ B.
6. La acción antiapoptótica de la eritropoyetina se relaciona con la regulación negativa de la expresión del receptor 1 de TNF y con la activación de factores antiapoptóticos Bcl-2 y NF- $\kappa$ B.
7. La activación de NF- $\kappa$ B, que también es inducida por TNF- $\alpha$ , no alcanza, en este modelo, para contrarrestar la acción proapoptótica de la citoquina.

En conclusión, hemos descrito mecanismos relacionados con el efecto antiapoptótico de la eritropoyetina frente a la muerte de células de origen neuronal inducida por staurosporina y TNF- $\alpha$ . También se detectó posible *cross-talk* entre caminos de señalización mediadores de la activación de NF- $\kappa$ B y entre aquéllos que involucran la relación entre receptores de muerte y Epo/REpo.

Los resultados sugieren que la sensibilidad celular a la apoptosis inducida por receptores de muerte podría ser regulada por diversos factores, siendo el balance de los mismos lo que decidiría entre supervivencia o muerte celular. Esto explicaría por qué, en nuestro diseño experimental, la incubación de las células SH-SY5Y con TNF- $\alpha$  produce apoptosis a pesar de la capacidad de la citoquina para inducir la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B. La sensibilidad celular a la citoquina podría ser causada por la elevada expresión del TNFR1 y la falta de contribución de los miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2. Por otra parte, la activación de las células por eritropoyetina transforma a éstas en resistentes a



la muerte celular. La acción neuroprotectora de la hormona en estas células impide el aumento de la expresión de los receptores de muerte, bloquea la activación de caspasas e induce la expresión de factores antiapoptóticos como Bcl-2 y NF- $\kappa$ B.

Los resultados de los ensayos con TNF- $\alpha$  subrayan la capacidad de la eritropoyetina como factor antiinflamatorio, por lo cual podría cumplir un rol importante en la neuroprotección a través de su acción antiapoptótica.

**DIFUSIÓN**

**Difusión**

Resultados parciales del presente trabajo de investigación han sido incluidos en las siguientes publicaciones:

1. **Pregi N**, Wenker S, Vittori D, et al.

Erythropoietin neuroprotective effect on SH-SY5Y cells induced to apoptosis by TNF-alpha.

En Prensa.

2. **Pregi N**, Vittori D, Perez G, et al.

Effect of erythropoietin on staurosporine-induced apoptosis and differentiation of SH-SY5Y neuroblastoma cells.

MOLECULAR CELL RESEARCH - BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA 1763 (2): 238-246 FEB 2006

3. Vittori D, **Pregi N**, Perez G, et al.

The distinct erythropoietin functions that promote cell survival and proliferation are affected by aluminum exposure through mechanisms involving erythropoietin receptor.

MOLECULAR CELL RESEARCH-BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA 1743 (1-2): 29-36 MAR 22 2005

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

**Referencias Bibliográficas**

Adams, J.M., and Cory, S. (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science (New York, NY)* *281*, 1322-1326.

Akhtar, R.S., Ness, J.M., and Roth, K.A. (2004). Bcl-2 family regulation of neuronal development and neurodegeneration. *Biochimica et biophysica acta* *1644*, 189-203.

Altman, J. (1992). Programmed cell death: the paths to suicide. *Trends Neurosci* *15*, 278-280.

Allen, R.T., Cluck, M.W., and Agrawal, D.K. (1998). Mechanisms controlling cellular suicide: role of Bcl-2 and caspases. *Cell Mol Life Sci* *54*, 427-445.

Antonsson, B., Montessuit, S., Lauper, S., Eskes, R., and Martinou, J.C. (2000). Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *The Biochemical journal* *345 Pt 2*, 271-278.

Ashkenazi, A., and Dixit, V.M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science (New York, NY)* *281*, 1305-1308.

Baeuerle, P.A., and Baltimore, D. (1996). NF-kappa B: ten years after. *Cell* *87*, 13-20.

Banasiak, K.J., Xia, Y., and Haddad, G.G. (2000). Mechanisms underlying hypoxia-induced neuronal apoptosis. *Progress in neurobiology* *62*, 215-249.

Barinaga, M. (1993). Death gives birth to the nervous system. But how? *Science (New York, NY)* *259*, 762-763.

Barnes, P.J., and Karin, M. (1997). Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *The New England journal of medicine* *336*, 1066-1071.

Benito, A., Silva, M., Grillot, D., Nunez, G., and Fernandez-Luna, J.L. (1996). Apoptosis induced by erythroid differentiation of human leukemia cell lines is inhibited by Bcl-XL. *Blood* *87*, 3837-3843.

Bernaudin, M., Marti, H.H., Roussel, S., Divoux, D., Nouvelot, A., MacKenzie, E.T., and Petit, E. (1999). A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* *19*, 643-651.

Bertrand, R., Solary, E., O'Connor, P., Kohn, K.W., and Pommier, Y. (1994). Induction of a common pathway of apoptosis by staurosporine. *Experimental cell research* *211*, 314-321.

Bhattacharyya, S.N., and Filipowicz, W. (2007). Argonautes and company: sailing against the wind. *Cell* *128*, 1027-1028.

Biedler, J.L., Helson, L., and Spengler, B.A. (1973). Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer research* *33*, 2643-2652.

Bittorf, T., Buchse, T., Sasse, T., Jaster, R., and Brock, J. (2001). Activation of the transcription factor NF-kappaB by the erythropoietin receptor: structural requirements and biological significance. *Cell Signal* *13*, 673-681.

- Black, R.A., Rauch, C.T., Kozlosky, C.J., Peschon, J.J., Slack, J.L., Wolfson, M.F., Castner, B.J., Stocking, K.L., Reddy, P., Srinivasan, S., *et al.* (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* *385*, 729-733.
- Boatright, K.M., Renatus, M., Scott, F.L., Sperandio, S., Shin, H., Pedersen, I.M., Ricci, J.E., Edris, W.A., Sutherlin, D.P., Green, D.R., *et al.* (2003). A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell* *11*, 529-541.
- Bohl, D., Naffakh, N., and Heard, J.M. (1997). Long-term control of erythropoietin secretion by doxycycline in mice transplanted with engineered primary myoblasts. *Nature medicine* *3*, 299-305.
- Boix, J., Llecha, N., Yuste, V.J., and Comella, J.X. (1997). Characterization of the cell death process induced by staurosporine in human neuroblastoma cell lines. *Neuropharmacology* *36*, 811-821.
- Bonsdorff, B.V., and Jalavisto, E. (1948). A humoral mechanism in anoxic erythrocytosis. *Nord Med* *40*, 1830.
- Bren, A., Kandus, A., Varl, J., Buturovic, J., Ponikvar, R., Kveder, R., Primožic, S., and Ivanovich, P. (2002). A comparison between epoetin omega and epoetin alfa in the correction of anemia in hemodialysis patients: a prospective, controlled crossover study. *Artif Organs* *26*, 91-97.
- Brenner, C., Cadiou, H., Vieira, H.L., Zamzami, N., Marzo, I., Xie, Z., Leber, B., Andrews, D., Duclouhier, H., Reed, J.C., *et al.* (2000). Bcl-2 and Bax regulate the channel activity of the mitochondrial adenine nucleotide translocator. *Oncogene* *19*, 329-336.
- Brines, M.L., Ghezzi, P., Keenan, S., Agnello, D., de Lanerolle, N.C., Cerami, C., Itri, L.M., and Cerami, A. (2000). Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *97*, 10526-10531.
- Brown, R. (1997). The bcl-2 family of proteins. *British medical bulletin* *53*, 466-477.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J., and Greenberg, M.E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* *96*, 857-868.
- Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., and Wang, X. (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annual review of cell and developmental biology* *15*, 269-290.
- Buemi, M., Cavallaro, E., Floccari, F., Sturiale, A., Aloisi, C., Trimarchi, M., Grasso, G., Corica, F., and Frisina, N. (2002). Erythropoietin and the brain: from neurodevelopment to neuroprotection. *Clin Sci (Lond)* *103*, 275-282.
- Burger, D., Lei, M., Geoghegan-Morphet, N., Lu, X., Xenocostas, A., and Feng, Q. (2006). Erythropoietin protects cardiomyocytes from apoptosis via up-regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Cardiovasc Res* *72*, 51-59.
- Calapai, G., Marciano, M.C., Corica, F., Allegra, A., Parisi, A., Frisina, N., Caputi, A.P., and Buemi, M. (2000). Erythropoietin protects against brain ischemic injury by inhibition of nitric oxide formation. *Eur J Pharmacol* *401*, 349-356.

Calo, L.A., Davis, P.A., Piccoli, A., and Pessina, A.C. (2006). A role for heme oxygenase-1 in the antioxidant and antiapoptotic effects of erythropoietin: the start of a good news/bad news story? *Nephron Physiol* *103*, p107-111.

Carnot, P., and Deflandre, C. (1906). Sur pactivité hémopoïétique de sérum au cours de la régénération du sang. *CR Acad Sci* *1*, 384-386.

Carswell, E.A., Old, L.J., Kassel, R.L., Green, S., Fiore, N., and Williamson, B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *72*, 3666-3670.

Catania, M.A., Marciano, M.C., Parisi, A., Sturiale, A., Buemi, M., Grasso, G., Squadrito, F., Caputi, A.P., and Calapai, G. (2002). Erythropoietin prevents cognition impairment induced by transient brain ischemia in gerbils. *Eur J Pharmacol* *437*, 147-150.

Combe, C., Tredree, R.L., and Schellekens, H. (2005). Biosimilar epoetins: an analysis based on recently implemented European medicines evaluation agency guidelines on comparability of biopharmaceutical proteins. *Pharmacotherapy* *25*, 954-962.

Cross, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M., and Hemmings, B.A. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* *378*, 785-789.

Chao, M.V. (2003). Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci* *4*, 299-309.

Chen, Z.Y., Warin, R., and Noguchi, C.T. (2006). Erythropoietin and normal brain development: receptor expression determines multi-tissue response. *Neurodegener Dis* *3*, 68-75.

Chin, K., Yu, X., Beleslin-Cokic, B., Liu, C., Shen, K., Mohrenweiser, H.W., and Noguchi, C.T. (2000). Production and processing of erythropoietin receptor transcripts in brain. *Brain Res Mol Brain Res* *81*, 29-42.

Chipuk, J.E., and Green, D.R. (2005). Do inducers of apoptosis trigger caspase-independent cell death? *Nature reviews* *6*, 268-275.

Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* *162*, 156-159.

Chong, Z.Z., Kang, J.Q., and Maiese, K. (2002). Hematopoietic factor erythropoietin fosters neuroprotection through novel signal transduction cascades. *J Cereb Blood Flow Metab* *22*, 503-514.

Danial, N.N., and Korsmeyer, S.J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell* *116*, 205-219.

Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., and Greenberg, M.E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* *91*, 231-241.

del Peso, L., Lucas, L., Esteve, P., and Lacal, J.C. (1997). Activation of phospholipase D by growth factors and oncogenes in murine fibroblasts follow alternative but cross-talking pathways. *The Biochemical journal* *322 ( Pt 2)*, 519-528.

- Digicaylioglu, M., and Lipton, S.A. (2001). Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades. *Nature* *412*, 641-647.
- Dunlop, E.A., Percy, M.J., Boland, M.P., Maxwell, A.P., and Lappin, T.R. (2006). Induction of signalling in non-erythroid cells by pharmacological levels of erythropoietin. *Neurodegener Dis* *3*, 94-100.
- Edsjo, A., Nilsson, H., Vandesompele, J., Karlsson, J., Pattyn, F., Culp, L.A., Speleman, F., and Pahlman, S. (2004). Neuroblastoma cells with overexpressed MYCN retain their capacity to undergo neuronal differentiation. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* *84*, 406-417.
- Ehrenreich, H., Aust, C., Krampe, H., Jahn, H., Jacob, S., Herrmann, M., and Siren, A.L. (2004). Erythropoietin: novel approaches to neuroprotection in human brain disease. *Metab Brain Dis* *19*, 195-206.
- Ehrenreich, H., Hasselblatt, M., Dembowski, C., Cepek, L., Lewczuk, P., Stiefel, M., Rustenbeck, H.H., Breiter, N., Jacob, S., Knerlich, F., *et al.* (2002). Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol Med* *8*, 495-505.
- Elliott, S., Chang, D., Delorme, E., Eris, T., and Lorenzini, T. (2004). Structural requirements for additional N-linked carbohydrate on recombinant human erythropoietin. *The Journal of biological chemistry* *279*, 16854-16862.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Nagata, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* *391*, 43-50.
- Erbayraktar, S., Yilmaz, O., Gokmen, N., and Brines, M. (2003). Erythropoietin is a multifunctional tissue-protective cytokine. *Curr Hematol Rep* *2*, 465-470.
- Erslev, A. (1953). Humoral regulation of red cell production. *Blood* *8*, 349-357.
- Eschbach, J.W., Egrie, J.C., Downing, M.R., Browne, J.K., and Adamson, J.W. (1987). Correction of the anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin. Results of a combined phase I and II clinical trial. *The New England journal of medicine* *316*, 73-78.
- Evan, G., and Littlewood, T. (1998). A matter of life and cell death. *Science (New York, NY)* *281*, 1317-1322.
- Falcieri, E., Martelli, A.M., Bareggi, R., Cataldi, A., and Cocco, L. (1993). The protein kinase inhibitor staurosporine induces morphological changes typical of apoptosis in MOLT-4 cells without concomitant DNA fragmentation. *Biochemical and biophysical research communications* *193*, 19-25.
- Figiel, I., and Dzwonek, K. (2007). TNFalpha and TNF receptor 1 expression in the mixed neuronal-glia cultures of hippocampal dentate gyrus exposed to glutamate or trimethyltin. *Brain Res* *1131*, 17-28.
- Fischer, E.H., and Krebs, E.G. (1966). Relationship of structure to function of muscle phosphorylase. *Federation proceedings* *25*, 1511-1520.
- Foster, D.J., Moe, O.W., and Hsia, C.C. (2004). Upregulation of erythropoietin receptor during postnatal and postpneumectomy lung growth. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* *287*, L1107-1115.



- Fukuda, R., Hirota, K., Fan, F., Jung, Y.D., Ellis, L.M., and Semenza, G.L. (2002). Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells. *The Journal of biological chemistry* *277*, 38205-38211.
- Fulda, S., and Debatin, K.M. (2004). Modulation of TRAIL signaling for cancer therapy. *Vitam Horm* *67*, 275-290.
- Funato, N., Takayanagi, H., Konda, Y., Toda, Y., Harigaya, Y., Iwai, Y., and Omura, S. (1994). Absolute Configuration of Staurosporine By X-Ray Analysis. *Tetrahedron Letters* *35*, 1251-1254.
- Gao, C.F., Ren, S., Zhang, L., Nakajima, T., Ichinose, S., Hara, T., Koike, K., and Tsuchida, N. (2001). Caspase-dependent cytosolic release of cytochrome c and membrane translocation of Bax in p53-induced apoptosis. *Experimental cell research* *265*, 145-151.
- Gao, N., Zhang, Z., Jiang, B.H., and Shi, X. (2003). Role of PI3K/AKT/mTOR signaling in the cell cycle progression of human prostate cancer. *Biochemical and biophysical research communications* *310*, 1124-1132.
- Ghosh, S., and Karin, M. (2002). Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* *109 Suppl*, S81-96.
- Goping, I.S., Gross, A., Lavoie, J.N., Nguyen, M., Jemmerson, R., Roth, K., Korsmeyer, S.J., and Shore, G.C. (1998). Regulated targeting of BAX to mitochondria. *The Journal of cell biology* *143*, 207-215.
- Gross, A., Jockel, J., Wei, M.C., and Korsmeyer, S.J. (1998). Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *The EMBO journal* *17*, 3878-3885.
- Gross, A., McDonnell, J.M., and Korsmeyer, S.J. (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & development* *13*, 1899-1911.
- Gutierrez-Castellanos, S., Cruz, M., Rabelo, L., Godinez, R., Reyes-Maldonado, E., and Riebeling-Navarro, C. (2004). Differences in BCL-X(L) expression and STAT5 phosphorylation in chronic myeloid leukaemia patients. *Eur J Haematol* *72*, 231-238.
- Hail, N., Jr., Carter, B.Z., Konopleva, M., and Andreeff, M. (2006). Apoptosis effector mechanisms: a requiem performed in different keys. *Apoptosis* *11*, 889-904.
- Henke, M., Laszig, R., Rube, C., Schafer, U., Haase, K.D., Schilcher, B., Mose, S., Beer, K.T., Burger, U., Dougherty, C., *et al.* (2003). Erythropoietin to treat head and neck cancer patients with anaemia undergoing radiotherapy: randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* *362*, 1255-1260.
- Hockenbery, D., Nunez, G., Milliman, C., Schreiber, R.D., and Korsmeyer, S.J. (1990). Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* *348*, 334-336.
- Honig, L.S., and Rosenberg, R.N. (2000). Apoptosis and neurologic disease. *The American journal of medicine* *108*, 317-330.
- Hsu, S.Y., and Hsueh, A.J. (2000). Tissue-specific Bcl-2 protein partners in apoptosis: An ovarian paradigm. *Physiol Rev* *80*, 593-614.

- Huang, E.J., and Reichardt, L.F. (2001). Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annual review of neuroscience* 24, 677-736.
- Huang, E.J., and Reichardt, L.F. (2003). Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annual review of biochemistry* 72, 609-642.
- Hunter, T. (1995). Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 80, 225-236.
- Jacobson, L.O., and Goldwasser, E. (1957). The dynamic equilibrium of erythropoiesis. *Brookhaven symposia in biology*, 110-131.
- Jalava, A., Heikkila, J., Lintunen, M., Akerman, K., and Pahlman, S. (1992). Staurosporine induces a neuronal phenotype in SH-SY5Y human neuroblastoma cells that resembles that induced by the phorbol ester 12-O-tetradecanoyl phorbol-13 acetate (TPA). *FEBS Lett* 300, 114-118.
- Jung, J.Y., Kim, Y.W., Kwak, J.M., Hwang, J.U., Young, J., Schroeder, J.I., Hwang, I., and Lee, Y. (2002). Phosphatidylinositol 3- and 4-phosphate are required for normal stomatal movements. *Plant Cell* 14, 2399-2412.
- Juul, S.E., Yachnis, A.T., and Christensen, R.D. (1998). Tissue distribution of erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human fetus. *Early Hum Dev* 52, 235-249.
- Kandel, E.S., and Hay, N. (1999). The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Experimental cell research* 253, 210-229.
- Kaplan, D.R., and Cooper, E. (2001). PI-3 kinase and IP3: partners in NT3-induced synaptic transmission. *Nature neuroscience* 4, 5-7.
- Karin, M., Cao, Y., Greten, F.R., and Li, Z.W. (2002). NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer* 2, 301-310.
- Kawakami, M., Iwasaki, S., Sato, K., and Takahashi, M. (2000). Erythropoietin inhibits calcium-induced neurotransmitter release from clonal neuronal cells. *Biochemical and biophysical research communications* 279, 293-297.
- Kawasaki, N., Haishima, Y., Ohta, M., Itoh, S., Hyuga, M., Hyuga, S., and Hayakawa, T. (2001). Structural analysis of sulfated N-linked oligosaccharides in erythropoietin. *Glycobiology* 11, 1043-1049.
- Ke, Q., and Costa, M. (2006). Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Molecular pharmacology* 70, 1469-1480.
- Kennedy, S.G., Kandel, E.S., Cross, T.K., and Hay, N. (1999). Akt/Protein kinase B inhibits cell death by preventing the release of cytochrome c from mitochondria. *Molecular and cellular biology* 19, 5800-5810.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* 26, 239-257.

- Khosravi-Far, R., and Esposti, M.D. (2004). Death receptor signals to mitochondria. *Cancer Biol Ther* *3*, 1051-1057.
- Kidd, V.J. (1998). Proteolytic activities that mediate apoptosis. *Annual review of physiology* *60*, 533-573.
- Kim, K. (2005). Silencing Bcl-X(L) in cancer therapy. *Cancer Biol Ther* *4*, 398-399.
- Kitada, S., Zapata, J.M., Andreeff, M., and Reed, J.C. (1999). Bryostatins and CD40-ligand enhance apoptosis resistance and induce expression of cell survival genes in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* *106*, 995-1004.
- Kolb, W.P., and Granger, G.A. (1968). Lymphocyte in vitro cytotoxicity: characterization of human lymphotoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *61*, 1250-1255.
- Kolyada, A.Y., Liangos, O., Madias, N.E., and Jaber, B.L. (2008). Protective effect of erythropoietin against radiocontrast-induced renal tubular epithelial cell injury. *Am J Nephrol* *28*, 203-209.
- Komatsu, N., Kirito, K., Kashii, Y., Furukawa, Y., Kikuchi, J., Suwabe, N., Yamamoto, M., and Miura, Y. (1997). Cell-cycle-dependent regulation of erythropoietin receptor gene. *Blood* *89*, 1182-1188.
- Korsmeyer, S.J., Wei, M.C., Saito, M., Weiler, S., Oh, K.J., and Schlesinger, P.H. (2000). Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell death and differentiation* *7*, 1166-1173.
- Koury, M.J., Sawyer, S.T., and Brandt, S.J. (2002). New insights into erythropoiesis. *Curr Opin Hematol* *9*, 93-100.
- Krajewski, S., Tanaka, S., Takayama, S., Schibler, M.J., Fenton, W., and Reed, J.C. (1993). Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer research* *53*, 4701-4714.
- Krebs, D.L., and Hilton, D.J. (2000). SOCS: physiological suppressors of cytokine signaling. *J Cell Sci* *113 ( Pt 16)*, 2813-2819.
- Kriegler, M., Perez, C., DeFay, K., Albert, I., and Lu, S.D. (1988). A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* *53*, 45-53.
- Kroemer, G., and Reed, J.C. (2000). Mitochondrial control of cell death. *Nature medicine* *6*, 513-519.
- Kuan, C.Y., Flavell, R.A., and Rakic, P. (2000). Programmed cell death in mouse brain development. Results and problems in cell differentiation *30*, 145-162.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680-685.

Lee-Huang, S. (1984). Cloning and expression of human erythropoietin cDNA in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *81*, 2708-2712.

Lee, S.T., Chu, K., Sinn, D.I., Jung, K.H., Kim, E.H., Kim, S.J., Kim, J.M., Ko, S.Y., Kim, M., and Roh, J.K. (2006). Erythropoietin reduces perihematomal inflammation and cell death with eNOS and STAT3 activations in experimental intracerebral hemorrhage. *J Neurochem* *96*, 1728-1739.

Legler, D.F., Micheau, O., Doucey, M.A., Tschopp, J., and Bron, C. (2003). Recruitment of TNF receptor 1 to lipid rafts is essential for TNF $\alpha$ -mediated NF- $\kappa$ B activation. *Immunity* *18*, 655-664.

Leitgeb, C., Pecherstorfer, M., Fritz, E., and Ludwig, H. (1994). Quality of life in chronic anemia of cancer during treatment with recombinant human erythropoietin. *Cancer* *73*, 2535-2542.

Leyland-Jones, B. (2003). Breast cancer trial with erythropoietin terminated unexpectedly. *Lancet Oncol* *4*, 459-460.

Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., and Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* *91*, 479-489.

Lin, F.K., Suggs, S., Lin, C.H., Browne, J.K., Smalling, R., Egrie, J.C., Chen, K.K., Fox, G.M., Martin, F., Stabinsky, Z., *et al.* (1985). Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *82*, 7580-7584.

Lippin, Y., Dranitzki-Elhalel, M., Brill-Almon, E., Mei-Zahav, C., Mizrahi, S., Liberman, Y., Iaina, A., Kaplan, E., Podjarny, E., Zeira, E., *et al.* (2005). Human erythropoietin gene therapy for patients with chronic renal failure. *Blood* *106*, 2280-2286.

Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. (1997). DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* *89*, 175-184.

Lopez-Carballo, G., Moreno, L., Masia, S., Perez, P., and Baretino, D. (2002). Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway by retinoic acid is required for neural differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *The Journal of biological chemistry* *277*, 25297-25304.

Lopez, E., and Ferrer, I. (2000). Staurosporine- and H-7-induced cell death in SH-SY5Y neuroblastoma cells is associated with caspase-2 and caspase-3 activation, but not with activation of the FAS/FAS-L-caspase-8 signaling pathway. *Brain Res Mol Brain Res* *85*, 61-67.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* *193*, 265-275.

Luetjens, C.M., Lankiewicz, S., Bui, N.T., Krohn, A.J., Poppe, M., and Prehn, J.H. (2001). Up-regulation of Bcl-xL in response to subtoxic beta-amyloid: role in neuronal resistance against apoptotic and oxidative injury. *Neuroscience* *102*, 139-150.

Lukiw, W.J., and Bazan, N.G. (2006). Survival signalling in Alzheimer's disease. *Biochem Soc Trans* *34*, 1277-1282.

Maccougall, I.C. (1995). Poor response to erythropoietin. *BMJ* *310*, 1424-1425.

Maccougall, I.C., and Cooper, A.C. (2002). Erythropoietin resistance: the role of inflammation and pro-inflammatory cytokines. *Nephrol Dial Transplant* *17 Suppl 11*, 39-43.

Maddika, S., Ande, S.R., Panigrahi, S., Paranjothy, T., Weglarczyk, K., Zuse, A., Eshraghi, M., Manda, K.D., Wiechec, E., and Los, M. (2007). Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: implications for cancer therapy. *Drug Resist Updat* *10*, 13-29.

Marcheselli, V.L., Hong, S., Lukiw, W.J., Tian, X.H., Gronert, K., Musto, A., Hardy, M., Gimenez, J.M., Chiang, N., Serhan, C.N., *et al.* (2003). Novel docosanoids inhibit brain ischemia-reperfusion-mediated leukocyte infiltration and pro-inflammatory gene expression. *The Journal of biological chemistry* *278*, 43807-43817.

Marchetti, L., Klein, M., Schlett, K., Pfizenmaier, K., and Eisel, U.L. (2004). Tumor necrosis factor (TNF)-mediated neuroprotection against glutamate-induced excitotoxicity is enhanced by N-methyl-D-aspartate receptor activation. Essential role of a TNF receptor 2-mediated phosphatidylinositol 3-kinase-dependent NF-kappa B pathway. *The Journal of biological chemistry* *279*, 32869-32881.

Marks, N., and Berg, M.J. (1999). Recent advances on neuronal caspases in development and neurodegeneration. *Neurochemistry international* *35*, 195-220.

Marte, B.M., and Downward, J. (1997). PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond. *Trends in biochemical sciences* *22*, 355-358.

Marti, H.H., Bernaudin, M., Petit, E., and Bauer, C. (2000). Neuroprotection and Angiogenesis: Dual Role of Erythropoietin in Brain Ischemia. *News Physiol Sci* *15*, 225-229.

Marti, H.H., Wenger, R.H., Rivas, L.A., Straumann, U., Digicaylioglu, M., Henn, V., Yonekawa, Y., Bauer, C., and Gassmann, M. (1996). Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain. *Eur J Neurosci* *8*, 666-676.

Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Susin, S.A., Beutner, G., Brdiczka, D., Remy, R., Xie, Z.H., Reed, J.C., and Kroemer, G. (1998). The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *The Journal of experimental medicine* *187*, 1261-1271.

Mattson, M.P. (2000). Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nature reviews* *1*, 120-129.

McKinney, M., and Robbins, M. (1992). Chronic atropine administration up-regulates rat cortical muscarinic m1 receptor mRNA molecules: assessment with the RT/PCR. *Brain Res Mol Brain Res* *12*, 39-45.

Michaelidis, T.M., Sendtner, M., Cooper, J.D., Airaksinen, M.S., Holtmann, B., Meyer, M., and Thoenen, H. (1996). Inactivation of bcl-2 results in progressive degeneration of motoneurons, sympathetic and sensory neurons during early postnatal development. *Neuron* *17*, 75-89.

Micheau, O., and Tschopp, J. (2003). Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* *114*, 181-190.

- Miyake, T., Kung, C.K., and Goldwasser, E. (1977). Purification of human erythropoietin. *The Journal of biological chemistry* *252*, 5558-5564.
- Monaghan, P., Robertson, D., Amos, T.A., Dyer, M.J., Mason, D.Y., and Greaves, M.F. (1992). Ultrastructural localization of bcl-2 protein. *J Histochem Cytochem* *40*, 1819-1825.
- Mookherjee, P., Quintanilla, R., Roh, M.S., Zmijewska, A.A., Jope, R.S., and Johnson, G.V. (2007). Mitochondrial-targeted active Akt protects SH-SY5Y neuroblastoma cells from staurosporine-induced apoptotic cell death. *J Cell Biochem* *102*, 196-210.
- Motoyama, N., Wang, F., Roth, K.A., Sawa, H., Nakayama, K., Negishi, I., Senju, S., Zhang, Q., Fujii, S., and et al. (1995). Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice. *Science (New York, NY)* *267*, 1506-1510.
- Mulcahy, L. (2001). The erythropoietin receptor. *Semin Oncol* *28*, 19-23.
- Muzio, M., Chinnaiyan, A.M., Kischkel, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhang, M., Gentz, R., et al. (1996). FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* *85*, 817-827.
- Myklebust, J.H., Smeland, E.B., Josefsen, D., and Sioud, M. (2000). Protein kinase C-alpha isoform is involved in erythropoietin-induced erythroid differentiation of CD34(+) progenitor cells from human bone marrow. *Blood* *95*, 510-518.
- Naffakh, N., Henri, A., Villeval, J.L., Rouyer-Fessard, P., Moullier, P., Blumenfeld, N., Danos, O., Vainchenker, W., Heard, J.M., and Beuzard, Y. (1995). Sustained delivery of erythropoietin in mice by genetically modified skin fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *92*, 3194-3198.
- Nagai, A., Nakagawa, E., Choi, H.B., Hatori, K., Kobayashi, S., and Kim, S.U. (2001). Erythropoietin and erythropoietin receptors in human CNS neurons, astrocytes, microglia, and oligodendrocytes grown in culture. *J Neuropathol Exp Neurol* *60*, 386-392.
- Nakanishi, C., and Toi, M. (2005). Nuclear factor-kappaB inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* *5*, 297-309.
- Nedwin, G.E., Naylor, S.L., Sakaguchi, A.Y., Smith, D., Jarrett-Nedwin, J., Pennica, D., Goeddel, D.V., and Gray, P.W. (1985). Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization. *Nucleic acids research* *13*, 6361-6373.
- Nicholson, D.W., Ali, A., Thornberry, N.A., Vaillancourt, J.P., Ding, C.K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P.R., Labelle, M., Lazebnik, Y.A., et al. (1995). Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* *376*, 37-43.
- Noguchi, C.T., Asavaritikrai, P., Teng, R., and Jia, Y. (2007). Role of erythropoietin in the brain. *Crit Rev Oncol Hematol* *64*, 159-171.
- Olanow, C.W., and Tatton, W.G. (1999). Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Annual review of neuroscience* *22*, 123-144.
- Old, L.J. (1985). Tumor necrosis factor (TNF). *Science (New York, NY)* *230*, 630-632.

- Oliver, F.J., de la Rubia, G., Rolli, V., Ruiz-Ruiz, M.C., de Murcia, G., and Murcia, J.M. (1998). Importance of poly(ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis. Lesson from an uncleavable mutant. *The Journal of biological chemistry* *273*, 33533-33539.
- Omura, S., Tanaka, H., Oiwa, R., Awaya, J., Masuma, R., and Tanaka, K. (1977). New antitumor antibiotics, OS-4742 A1, A2, B1 and B2 produced by a strain of *Streptomyces*. *J Antibiot (Tokyo)* *30*, 908-916.
- Oppenheim, R.W. (1991). Cell death during development of the nervous system. *Annual review of neuroscience* *14*, 453-501.
- Ovbiagele, B., Kidwell, C.S., Starkman, S., and Saver, J.L. (2003). Neuroprotective agents for the treatment of acute ischemic stroke. *Curr Neurol Neurosci Rep* *3*, 9-20.
- Panka, D.J., Mano, T., Suhara, T., Walsh, K., and Mier, J.W. (2001). Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activity regulates c-FLIP expression in tumor cells. *The Journal of biological chemistry* *276*, 6893-6896.
- Papadaki, H.A., Kritikos, H.D., Valatas, V., Boumpas, D.T., and Eliopoulos, G.D. (2002). Anemia of chronic disease in rheumatoid arthritis is associated with increased apoptosis of bone marrow erythroid cells: improvement following anti-tumor necrosis factor-alpha antibody therapy. *Blood* *100*, 474-482.
- Papp, H., Czifra, G., Bodo, E., Lazar, J., Kovacs, I., Aleksza, M., Juhasz, I., Acs, P., Sipka, S., Kovacs, L., *et al.* (2004). Opposite roles of protein kinase C isoforms in proliferation, differentiation, apoptosis, and tumorigenicity of human HaCaT keratinocytes. *Cell Mol Life Sci* *61*, 1095-1105.
- Pawlowski, J., and Kraft, A.S. (2000). Bax-induced apoptotic cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *97*, 529-531.
- Pelletier, S., Gingras, S., Funakoshi-Tago, M., Howell, S., and Ihle, J.N. (2006). Two domains of the erythropoietin receptor are sufficient for Jak2 binding/activation and function. *Molecular and cellular biology* *26*, 8527-8538.
- Pennica, D., Nedwin, G.E., Hayflick, J.S., Seeburg, P.H., Derynck, R., Palladino, M.A., Kohr, W.J., Aggarwal, B.B., and Goeddel, D.V. (1984). Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* *312*, 724-729.
- Peter, M.E., and Krammer, P.H. (2003). The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell death and differentiation* *10*, 26-35.
- Pregi, N., Vittori, D., Perez, G., Leiros, C.P., and Nesse, A. (2006). Effect of erythropoietin on staurosporine-induced apoptosis and differentiation of SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Biochimica et biophysica acta* *1763*, 238-246.
- Prince, J.A., and Orelund, L. (1997). Staurosporine differentiated human SH-SY5Y neuroblastoma cultures exhibit transient apoptosis and trophic factor independence. *Brain Res Bull* *43*, 515-523.
- Putcha, G.V., Deshmukh, M., and Johnson, E.M., Jr. (1999). BAX translocation is a critical event in neuronal apoptosis: regulation by neuroprotectants, BCL-2, and caspases. *J Neurosci* *19*, 7476-7485.

Raff, M.C., Barres, B.A., Burne, J.F., Coles, H.S., Ishizaki, Y., and Jacobson, M.D. (1993). Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science (New York, NY)* *262*, 695-700.

Raguenez, G., Desire, L., Lantrua, V., and Courtois, Y. (1999). BCL-2 is upregulated in human SH-SY5Y neuroblastoma cells differentiated by overexpression of fibroblast growth factor 1. *Biochemical and biophysical research communications* *258*, 745-751.

Reed, J.C., and Paternostro, G. (1999). Postmitochondrial regulation of apoptosis during heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *96*, 7614-7616.

Rinsch, C., Regulier, E., Deglon, N., Dalle, B., Beuzard, Y., and Aebischer, P. (1997). A gene therapy approach to regulated delivery of erythropoietin as a function of oxygen tension. *Hum Gene Ther* *8*, 1881-1889.

Rippo, M.R., Moretti, S., Vescovi, S., Tomasetti, M., Orecchia, S., Amici, G., Catalano, A., and Procopio, A. (2004). FLIP overexpression inhibits death receptor-induced apoptosis in malignant mesothelial cells. *Oncogene* *23*, 7753-7760.

Robinson, D.R., Wu, Y.M., and Lin, S.F. (2000). The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* *19*, 5548-5557.

Rokudai, S., Fujita, N., Hashimoto, Y., and Tsuruo, T. (2000). Cleavage and inactivation of antiapoptotic Akt/PKB by caspases during apoptosis. *Journal of cellular physiology* *182*, 290-296.

Rommel, C., Clarke, B.A., Zimmermann, S., Nunez, L., Rossman, R., Reid, K., Moelling, K., Yancopoulos, G.D., and Glass, D.J. (1999). Differentiation stage-specific inhibition of the Raf-MEK-ERK pathway by Akt. *Science (New York, NY)* *286*, 1738-1741.

Ruscher, K., Freyer, D., Karsch, M., Isaev, N., Megow, D., Sawitzki, B., Priller, J., Dirnagl, U., and Meisel, A. (2002). Erythropoietin is a paracrine mediator of ischemic tolerance in the brain: evidence from an in vitro model. *J Neurosci* *22*, 10291-10301.

Ruvolo, P.P., Deng, X., and May, W.S. (2001). Phosphorylation of Bcl2 and regulation of apoptosis. *Leukemia* *15*, 515-522.

Sadamoto, Y., Igase, K., Sakanaka, M., Sato, K., Otsuka, H., Sakaki, S., Masuda, S., and Sasaki, R. (1998). Erythropoietin prevents place navigation disability and cortical infarction in rats with permanent occlusion of the middle cerebral artery. *Biochemical and biophysical research communications* *253*, 26-32.

Sakanaka, M., Wen, T.C., Matsuda, S., Masuda, S., Morishita, E., Nagao, M., and Sasaki, R. (1998). In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *95*, 4635-4640.

Sambrook, J., and Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3rd edn (Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Satoh, M.S., and Lindahl, T. (1992). Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair. *Nature* *356*, 356-358.



Saunders, J.W., Jr. (1966). Death in embryonic systems. *Science (New York, NY)* *154*, 604-612.

Scheid, M.P., and Duronio, V. (1998). Dissociation of cytokine-induced phosphorylation of Bad and activation of PKB/akt: involvement of MEK upstream of Bad phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *95*, 7439-7444.

Schellekens, H. (2008). The first biosimilar epoetin: but how similar is it? *Clin J Am Soc Nephrol* *3*, 174-178.

Schmidt, E.K., Fichelson, S., and Feller, S.M. (2004). PI3 kinase is important for Ras, MEK and Erk activation of Epo-stimulated human erythroid progenitors. *BMC Biol* *2*, 7.

Schwartzberg, S., Ben-Shoshan, J., Keren, G., and George, J. (2006). The role of erythropoietin in myocardial protection: potential mechanisms and applications. *Expert Rev Cardiovasc Ther* *4*, 41-50.

Shams, I., Nevo, E., and Avivi, A. (2005). Erythropoietin receptor spliced forms differentially expressed in blind subterranean mole rats. *FASEB J* *19*, 1749-1751.

Shimizu, R., Komatsu, N., and Miura, Y. (1999). Dominant negative effect of a truncated erythropoietin receptor (EPOR-T) on erythropoietin-induced erythroid differentiation: possible involvement of EPOR-T in ineffective erythropoiesis of myelodysplastic syndrome. *Exp Hematol* *27*, 229-233.

Shingo, T., Sorokan, S.T., Shimazaki, T., and Weiss, S. (2001). Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells. *J Neurosci* *21*, 9733-9743.

Shinners, N.P., Carlesso, G., Castro, I., Hoek, K.L., Corn, R.A., Woodland, R.T., Scott, M.L., Wang, D., and Khan, W.N. (2007). Bruton's tyrosine kinase mediates NF-kappa B activation and B cell survival by B cell-activating factor receptor of the TNF-R family. *J Immunol* *179*, 3872-3880.

Signore, A.P., Weng, Z., Hastings, T., Van Laar, A.D., Liang, Q., Lee, Y.J., and Chen, J. (2006). Erythropoietin protects against 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic cell death. *J Neurochem* *96*, 428-443.

Sikole, A., Spasovski, G., Zafirov, D., and Polenakovic, M. (2002). Epoetin omega for treatment of anemia in maintenance hemodialysis patients. *Clin Nephrol* *57*, 237-245.

Silva, M., Grillot, D., Benito, A., Richard, C., Nunez, G., and Fernandez-Luna, J.L. (1996). Erythropoietin can promote erythroid progenitor survival by repressing apoptosis through Bcl-XL and Bcl-2. *Blood* *88*, 1576-1582.

Siren, A.L., and Ehrenreich, H. (2001). Erythropoietin--a novel concept for neuroprotection. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* *251*, 179-184.

Siren, A.L., Fratelli, M., Brines, M., Goemans, C., Casagrande, S., Lewczuk, P., Keenan, S., Gleiter, C., Pasquali, C., Capobianco, A., *et al.* (2001). Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *98*, 4044-4049.

- Skibeli, V., Nissen-Lie, G., and Torjesen, P. (2001). Sugar profiling proves that human serum erythropoietin differs from recombinant human erythropoietin. *Blood* *98*, 3626-3634.
- Sola, A., Rogido, M., Lee, B.H., Genetta, T., and Wen, T.C. (2005). Erythropoietin after focal cerebral ischemia activates the Janus kinase-signal transducer and activator of transcription signaling pathway and improves brain injury in postnatal day 7 rats. *Pediatr Res* *57*, 481-487.
- Spinowitz, B.S., and Pratt, R.D. (2006). Epoetin delta is effective for the management of anaemia associated with chronic kidney disease. *Curr Med Res Opin* *22*, 2507-2513.
- Spitaler, M., and Cantrell, D.A. (2004). Protein kinase C and beyond. *Nat Immunol* *5*, 785-790.
- Stewart, V.C., Sharpe, M.A., Clark, J.B., and Heales, S.J. (2000). Astrocyte-derived nitric oxide causes both reversible and irreversible damage to the neuronal mitochondrial respiratory chain. *J Neurochem* *75*, 694-700.
- Sytkowski, A.J. (2007). Does erythropoietin have a dark side? Epo signaling and cancer cells. *Sci STKE* *2007*, pe38.
- Tamaoki, T., Nomoto, H., Takahashi, I., Kato, Y., Morimoto, M., and Tomita, F. (1986). Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca<sup>++</sup>-dependent protein kinase. *Biochemical and biophysical research communications* *135*, 397-402.
- Tang, G., Minemoto, Y., Dibling, B., Purcell, N.H., Li, Z., Karin, M., and Lin, A. (2001). Inhibition of JNK activation through NF-kappaB target genes. *Nature* *414*, 313-317.
- Tang, P., Hung, M.C., and Klostergaard, J. (1996). Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer. *Biochemistry* *35*, 8216-8225.
- Testa, U. (2004). Apoptotic mechanisms in the control of erythropoiesis. *Leukemia* *18*, 1176-1199.
- Thome, M., Schneider, P., Hofmann, K., Fickenscher, H., Meinel, E., Neipel, F., Mattmann, C., Burns, K., Bodmer, J.L., Schroter, M., *et al.* (1997). Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* *386*, 517-521.
- Thuret, G., Chiquet, C., Herrag, S., Dumollard, J.M., Boudard, D., Bednarz, J., Campos, L., and Gain, P. (2003). Mechanisms of staurosporine induced apoptosis in a human corneal endothelial cell line. *Br J Ophthalmol* *87*, 346-352.
- Um, M., Gross, A.W., and Lodish, H.F. (2007). A "classical" homodimeric erythropoietin receptor is essential for the antiapoptotic effects of erythropoietin on differentiated neuroblastoma SH-SY5Y and pheochromocytoma PC-12 cells. *Cell Signal* *19*, 634-645.
- Ushio-Fukai, M., Alexander, R.W., Akers, M., Yin, Q., Fujio, Y., Walsh, K., and Griendling, K.K. (1999). Reactive oxygen species mediate the activation of Akt/protein kinase B by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry* *274*, 22699-22704.
- Vander Heiden, M.G., and Thompson, C.B. (1999). Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nature cell biology* *1*, E209-216.

Vaux, D.L., Cory, S., and Adams, J.M. (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* *335*, 440-442.

Vittori, D., Pregi, N., Perez, G., Garbossa, G., and Nesse, A. (2005). The distinct erythropoietin functions that promote cell survival and proliferation are affected by aluminum exposure through mechanisms involving erythropoietin receptor. *Biochimica et biophysica acta* *1743*, 29-36.

Wang, L., Chen, R.F., Liu, J.W., Yu, H.R., Kuo, H.C., and Yang, K.D. (2007a). Implications of dynamic changes among tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), membrane TNF receptor, and soluble TNF receptor levels in regard to the severity of dengue infection. *Am J Trop Med Hyg* *77*, 297-302.

Wang, M.J., Liu, S., Liu, Y., and Zheng, D. (2007b). Actinomycin D enhances TRAIL-induced caspase-dependent and -independent apoptosis in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neurosci Res* *59*, 40-46.

Wen, J., You, K.R., Lee, S.Y., Song, C.H., and Kim, D.G. (2002). Oxidative stress-mediated apoptosis. The anticancer effect of the sesquiterpene lactone parthenolide. *The Journal of biological chemistry* *277*, 38954-38964.

Wiessner, C., Allegrini, P.R., Ekato-dramis, D., Jewell, U.R., Stallmach, T., and Gassmann, M. (2001). Increased cerebral infarct volumes in polyglobulic mice overexpressing erythropoietin. *J Cereb Blood Flow Metab* *21*, 857-864.

Wright, G.L., Hanlon, P., Amin, K., Steenbergen, C., Murphy, E., and Arcasoy, M.O. (2004). Erythropoietin receptor expression in adult rat cardiomyocytes is associated with an acute cardioprotective effect for recombinant erythropoietin during ischemia-reperfusion injury. *FASEB J* *18*, 1031-1033.

Wyllie, A. (1998). Apoptosis. An endonuclease at last. *Nature* *391*, 20-21.

Wyllie, A.H., Beattie, G.J., and Hargreaves, A.D. (1981). Chromatin changes in apoptosis. *The Histochemical journal* *13*, 681-692.

Xie, Z., Wu, X., Qiu, Q., Gong, Y., Song, Y., Gu, Q., and Li, C. (2007). Expression pattern of erythropoietin and erythropoietin receptor in experimental model of retinal detachment. *Curr Eye Res* *32*, 757-764.

Yang, L., Lindholm, K., Konishi, Y., Li, R., and Shen, Y. (2002). Target depletion of distinct tumor necrosis factor receptor subtypes reveals hippocampal neuron death and survival through different signal transduction pathways. *J Neurosci* *22*, 3025-3032.

Yeh, W.C., Itie, A., Elia, A.J., Ng, M., Shu, H.B., Wakeham, A., Mirtsos, C., Suzuki, N., Bonnard, M., Goeddel, D.V., *et al.* (2000). Requirement for Casper (c-FLIP) in regulation of death receptor-induced apoptosis and embryonic development. *Immunity* *12*, 633-642.

Yim, S.V., Kim, K.H., Kim, C.J., and Chung, J.H. (2000). Serotonin induces apoptosis in PGT-beta pineal gland tumor cells. *Jpn J Pharmacol* *84*, 71-74.

Yokomizo, R., Matsuzaki, S., Uehara, S., Murakami, T., Yaegashi, N., and Okamura, K. (2002). Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* *8*, 441-446.

Yuan, J., and Yankner, B.A. (2000). Apoptosis in the nervous system. *Nature* *407*, 802-809.

Yuste, V.J., Sanchez-Lopez, I., Sole, C., Encinas, M., Bayascas, J.R., Boix, J., and Comella, J.X. (2002). The prevention of the staurosporine-induced apoptosis by Bcl-X(L), but not by Bcl-2 or caspase inhibitors, allows the extensive differentiation of human neuroblastoma cells. *J Neurochem* *80*, 126-139.

Zamzami, N., Brenner, C., Marzo, I., Susin, S.A., and Kroemer, G. (1998). Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins. *Oncogene* *16*, 2265-2282.

Zhande, R., and Karsan, A. (2007). Erythropoietin promotes survival of primary human endothelial cells through PI3K-dependent, NF-kappaB-independent upregulation of Bcl-xL. *American journal of physiology* *292*, H2467-2474.

Zhang, F., Wang, S., Cao, G., Gao, Y., and Chen, J. (2007). Signal transducers and activators of transcription 5 contributes to erythropoietin-mediated neuroprotection against hippocampal neuronal death after transient global cerebral ischemia. *Neurobiol Dis* *25*, 45-53.

Zhang, J., Alter, N., Reed, J.C., Borner, C., Obeid, L.M., and Hannun, Y.A. (1996). Bcl-2 interrupts the ceramide-mediated pathway of cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *93*, 5325-5328.

Zhang, J., and Bowden, G.T. (2007). Targeting Bcl-X(L) for prevention and therapy of skin cancer. *Mol Carcinog* *46*, 665-670.

Zhang, M.Y., Sun, S.C., Bell, L., and Miller, B.A. (1998). NF-kappaB transcription factors are involved in normal erythropoiesis. *Blood* *91*, 4136-4144.

Zhang, X.D., Gillespie, S.K., and Hersey, P. (2004). Staurosporine induces apoptosis of melanoma by both caspase-dependent and -independent apoptotic pathways. *Mol Cancer Ther* *3*, 187-197.

Zheng, W.H., Kar, S., and Quirion, R. (2002). Insulin-like growth factor-1-induced phosphorylation of transcription factor FKHRL1 is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase/Akt kinase and role of this pathway in insulin-like growth factor-1-induced survival of cultured hippocampal neurons. *Molecular pharmacology* *62*, 225-233.

Zhou, H., Summers, S.A., Birnbaum, M.J., and Pittman, R.N. (1998). Inhibition of Akt kinase by cell-permeable ceramide and its implications for ceramide-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry* *273*, 16568-16575.