

Tesis Doctoral

Mecanismos moleculares de la degeneración de las motoneuronas en el contexto de la esclerosis lateral amiotrófica

Ricart, Karina Claudia

2010

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. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Ricart, Karina Claudia. (2010). Mecanismos moleculares de la degeneración de las motoneuronas en el contexto de la esclerosis lateral amiotrófica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Ricart, Karina Claudia. "Mecanismos moleculares de la degeneración de las motoneuronas en el contexto de la esclerosis lateral amiotrófica". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**MECANISMOS MOLECULARES DE LA
DEGENERACIÓN DE LAS MOTONEURONAS EN EL
CONTEXTO DE LA ESCLEROSIS LATERAL
AMIOTRÓFICA**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires en el área de **Ciencias Biológicas**

Karina Claudia Ricart

Director de Tesis: Dr. Alvaro G. Estévez
Consejero de Estudios: Dr. Osvaldo Uchitel
Lugar de trabajo: Departamento de Fisiología y Biofísica,
Universidad de Alabama en Birmingham, Birmingham, Alabama, E.E.U.U.

Buenos Aires, 2010

A mis hijos Martina y Santiago

Lo importante es no dejar
de hacerse preguntas

Albert Einstein
(1879-1955)

MECANISMOS MOLECULARES DE LA DEGENERACIÓN DE LAS MOTONEURONAS EN EL CONTEXTO DE LA ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA

Resumen

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa que se caracteriza por la degeneración gradual y muerte de las neuronas motoras de la médula espinal. Aunque en estos últimos años se han producido muchos adelantos sobre las posibles causas de la ELA, todavía no se conoce la fisiopatología de la enfermedad. El objetivo de este trabajo fue profundizar el conocimiento sobre los mecanismos celulares y moleculares que contribuyen a la muerte celular de las motoneuronas, para así entender su muerte selectiva en la ELA. Para el estudio de las características específicas a nivel de células individuales, utilizamos cultivos puros de motoneuronas espinales de rata. En esta tesis doctoral demostramos que, a pesar de que las motoneuronas exhiben una alta dependencia de los factores tróficos para su supervivencia, ciertas combinaciones de factores tróficos desencadenan una muerte apoptótica similar a la descrita para las motoneuronas crecidas en ausencia total de factores tróficos. Dicha muerte celular apoptótica es mediada por el receptor de neurotrofinas p75^{NTR} y depende de la inhibición de la vía de PI3K/Akt y de la activación de la vía JNK, seguidas de la producción de especies reactivas del nitrógeno y la posterior formación de nitrotirosina. Asimismo, demostramos que la formación de nitrotirosina en proteínas de las motoneuronas desencadena la muerte celular apoptótica observada en ausencia total de factores tróficos, ya que la presencia de péptidos que contienen tirosina en su secuencia disminuye la nitración endógena y previene la apoptosis, siendo los derivados radicales de la descomposición del peroxinitrito los agentes causantes de esta nitración. Nuestros estudios también demuestran que una de las proteínas nitradas en estas condiciones es la proteína de choque térmico 90 (HSP90), siendo las motoneuronas particularmente sensibles a la inhibición de la actividad ATPasa de la HSP90. La HSP90 también está nitrada en médulas espinales de pacientes de ELA y en ratones transgénicos usados como modelo experimental de la enfermedad. De estos resultados podemos concluir que la decisión de las motoneuronas de vivir o morir está altamente regulada y que un mismo factor trófico puede producir efectos tan opuestos como activar la apoptosis o inhibirla, dependiendo de su entorno celular.

MOLECULAR MECHANISMS OF MOTONEURON DEGENERATION IN THE CONTEXT OF AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS

Abstract

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disorder characterized by the gradual degeneration and death of motor neurons of the spinal cord. Despite many recent advances regarding the potential causes of ALS, the pathophysiology of the disease is not yet known. The aim of this Doctoral Thesis work was to extend our basic knowledge of the cellular and molecular mechanisms that contribute to motor neuron cell death and to better understand their selective degeneration and loss in ALS. The use of pure spinal motor neurons culture allows for the study of specific characteristics at the single cell level. In this Doctoral Thesis dissertation, we demonstrate that despite the strong dependency of motor neuron survival on trophic factors, certain combinations of those same trophic factors trigger apoptotic cell death, which is similar to that observed in motor neurons grown in the absence of trophic factors. This apoptotic motor neuron death is mediated by the neurotrophin p75^{NTR} receptor, being dependent on the inhibition of the PI3K/Akt signaling cascade and on the activation of the JNK signaling cascade, followed by the production of reactive nitrogen species and the subsequent formation of nitrotyrosine in motor neuron proteins. In addition, we demonstrated that nitrotyrosine formation in motor neuron proteins triggers the apoptotic cell death observed in motor neurons grown in the total absence of trophic factors, since introducing peptides rich in tyrosine prevents apoptotic cell death. We also showed that the derivatives of peroxynitrite decomposition are responsible for nitration of tyrosine residues in motor neuron proteins during apoptotic cell death induced by the absence of trophic factors. Furthermore, our studies indicate that HSP90 is one of the nitrated proteins in motor neurons cultured under these conditions, an intriguing observation considering that motor neurons are particularly sensitive to the inhibition of the ATPase activity of HSP90. Consistently, HSP90 is also nitrated in the spinal cord of ALS patients and in transgenic mice used as experimental models of this disorder. From our results, we conclude that motor neuron survival and apoptotic cell death is a highly regulated process, during which the same trophic factor could have opposite effects depending on the cellular context of intracellular signaling.

Indice

Páginas

Resumen.....iv

Abstract.....v

Introducción general

La Esclerosis Lateral Amiotrófica.....2

La motoneurona.....5

Las motoneuronas y su entorno.....7

Neurotrofinas.....8

Receptores de las neurotrofinas (ErbB/HER).....9

Neuregulinas.....13

Receptores de las neuregulinas.....18

Cascadas o redes de señalización celular.....24

Apoptosis.....31

-Vía intrínseca o mitocondrial.....33

-Vía extrínseca o mediada por receptores de muerte.....34

Las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno en la muerte
celular programada.....37

Las proteínas de choque térmico y la sobrevida celular.....40

Objetivos general y específicos.....43

Materiales y Métodos.....45

Capítulo I: Interacción de la neuregulina y las neurotrofinas en la sobrevida de las motoneuronas

Resultados

1- Estudio de la expresión de los receptores de neuregulina
(receptores ErbB) en la médula espinal de rata.....76

2- Estudio de la expresión de los receptores ErbB en los cultivos de motoneuronas	79
3- Efecto del dominio EGF de la NRG-β1 en cultivos primarios de motoneuronas	80
4- Análisis del efecto protector de las NRG-β1 en los cultivos de Motoneuronas	
4.1- Activación del receptor específico de NRG-β1	82
4.2- Efecto dosis-dependiente de la NRG-β1 en los cultivos de motoneuronas	84
4.3- Estudio de la participación de las distintas cascadas de fosforilación en la protección mediada por la NRG-β1 en los cultivos de motoneuronas	85
4.4- Estudio de la participación de las distintas cascadas de fosforilación con agentes farmacológicos	88
5- Interacción de la NRG-β1 con otros factores tróficos en la supervivencia de las motoneuronas	
5.1- Estudio de la interacción de la NRG-β1 con el factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF).....	90
5.2- Estudio de la interacción de la NRG-β1 con las neurotrofinas	92
6- Análisis de la participación de los receptores de las neurotrofinas en la muerte de las motoneuronas cultivadas en presencia de NRG-β1 y neurotrofinas	95
7- Participación del receptor p75 ^{NTR} en la muerte de las motoneuronas	
7.1- Neutralización del receptor p75 ^{NTR} en la muerte de las motoneuronas	97
7.2- Disminución de la expresión del receptor p75 ^{NTR}	99
8- Análisis de las cascadas activadas por el tratamiento de NRG-β1 y BDNF	
8.1- Estudio de la participación de las cascadas PI3K/Akt y ERK1/2 en la muerte de las motoneuronas cultivadas en presencia de NRG-β1 y BDNF	101
8.2- Estudio de la participación de la cascada JNK en la muerte de las motoneuronas cultivadas en presencia de NRG-β1 y BDNF	103
9- Determinación del tipo de muerte celular inducida por el tratamiento de NRG-β1 y BDNF en las motoneuronas.....	105
10- Análisis de la inducción de la proteína nNOS y de la formación de peroxinitrito en los cultivos tratados con NRG-β1 y BDNF.....	106
Discusión	111

Capítulo II: Rol del peroxinitrito y la nitrotirosina en la muerte de las motoneuronas

Resultados

- 1- Prevención de la muerte apoptótica con péptidos que contienen tirosina.....124
- 2- El peroxinitrito causa la nitración de residuos de tirosina en los cultivos de motoneuronas crecidas en ausencia de factores neurotróficos.....127
- 3- Péptidos que contienen tirosina disminuyen los niveles de nitrotirosina en los cultivos de motoneuronas crecidos en ausencia de factores tróficos.....131
- 4- Medición de la cinética de descomposición del peroxinitrito en presencia de péptidos que contienen tirosina133
- 5- Proteínas nitradas en los cultivos de motoneuronas crecidos en ausencia de factores tróficos135

Discusión141

Capítulo III: Importancia de la proteína HSP90 en la sobrevivencia de las motoneuronas en cultivo

Resultados

- 1- Rol de la proteína HSP90 en la sobrevivencia de las motoneuronas cultivadas en presencia de factores tróficos149
- 2- Expresión de HSP90 en diferentes tejidos153
- 3- Análisis de la muerte de motoneuronas causada por la inhibición de la HSP90 con geldanamicina.....156
- 4- El tratamiento con geldanamicina induce la síntesis de ligando de Fas (Fas-L).....160
- 5- Cascadas afectadas por la inhibición de la proteína HSP90162

Discusión165

Conclusiones Generales175

Referencias178

Trabajos Publicados.....203

Agradecimientos204

INTRODUCCIÓN GENERAL

El desarrollo evolutivo de un sistema nervioso es una propiedad exclusiva de aquellos organismos biológicos que ejecutan movimientos activos. Estrechamente ligada con esta motricidad es la necesidad de percibir el ambiente por donde el organismo se desplaza. De esta manera, el sistema nervioso central ha evolucionado para generar un plan de acción motor compuesto de múltiples predicciones de corto plazo que son verificadas a través de un proceso continuo de chequeo sensorial. Obviamente, los organismos que predijeron con mayor precisión las consecuencias reales de sus planes motores internos pudieron desarrollar las mejores estrategias de movimiento, lo que les dió una mayor ventaja evolutiva. Así, la capacidad de predecir el resultado de las acciones futuras necesarias para un movimiento exitoso es la razón fundamental para la evolución de todas las funciones del sistema nervioso. Ha sido postulado que el sofisticado y preciso control del movimiento por parte de las motoneuronas en la médula espinal dio origen a funciones más complejas del sistema nervioso central como la conciencia y la mente, a través de construcciones promotoras internas necesarias para emular la realidad externa y así predecir las consecuencias de las acciones motoras. De esta manera, los conjuntos de patrones oscilatorios motores responsables de las respuestas de escape, caminar, tragar, etc., evolucionaron en el cerebro para generar los pensamientos, percepciones y los sueños, todo parte de la mente como función del cerebro (Llinás, 2002). Creemos que avanzar en el conocimiento básico de los mecanismos de sobrevivencia de las neuronas motoras (motoneuronas) de la médula espinal no sólo contribuye a futuras estrategias aplicables a enfermedades neurodegenerativas como la Esclerosis Lateral Amiotrófica

(ELA), sino que también aporta información fundamental para el entendimiento del sistema nervioso en su conjunto.

La Esclerosis Lateral Amiotrófica

La ELA es una enfermedad degenerativa de tipo neuromuscular que afecta la célula motora, y que provoca una parálisis muscular progresiva que determina la muerte de quien la padece por falla respiratoria. Esta enfermedad fue descrita por primera vez por Jean-Martin Charcot en el año 1869, por lo cual también se la conoce como enfermedad de Jean-Martin Charcot (Charcot, 1869). En los Estados Unidos se la conoce como la enfermedad de Lou Gehrig, en honor a un famoso jugador de béisbol que padeció esta enfermedad. La ELA afecta a las motoneuronas de la corteza, tronco cerebral y médula espinal, manteniéndose intactas las motoneuronas del núcleo de Onuf, del núcleo motor ocular y del núcleo troclear. Además, esta pérdida neuronal es acompañada por astrocitosis y acumulación de neurofilamentos fosforilados (Munoz y col., 1988).

La ELA afecta a personas de edades comprendidas entre 40-70 años, con una mayor incidencia en los hombres que en las mujeres. En la actualidad, se describen dos casos nuevos por cada 100.000 habitantes por año (incidencia anual 2/100.000 habitantes) por lo que se estima que sólo en Estados Unidos existen 30.000 pacientes de ELA. La expectativa de vida promedio es de 1-6 años de realizado el diagnóstico, aunque hay casos de lenta evolución que sobreviven más de 10 años.

Si bien la mayoría de los casos de ELA son esporádicos (ELA esporádico), sin poderse relacionar ningún factor de riesgo, el 10% de los casos totales presentan una relación hereditaria (ELA familiar) con un perfil típicamente autosómico dominante. A pesar de que no se conoce el origen de la enfermedad, se han propuesto diferentes hipótesis que involucran tanto a procesos de excitotoxicidad mediada por glutamato, estrés oxidativo, daño mitocondrial, alteraciones en el citoesqueleto y transporte axoplasmático, así como también fenómenos de neuroinflamación y autoinmunidad (Brown, 2000).

En 1993 se descubrió que ciertos pacientes con ELA familiar presentaban mutaciones en la enzima superóxido dismutasa dependiente de cobre-zinc (SOD1); sin embargo sólo el 20% de los pacientes con ELA familiar presentan dichas mutaciones (aproximadamente el 2% de los casos totales de ELA). Este descubrimiento brindó la oportunidad de producir modelos animales de la enfermedad. Los ratones transgénicos que expresan distintas mutaciones de SOD1 humana desarrollan una parálisis progresiva causada por la degeneración de las motoneuronas y seguida por la pérdida de músculo, características similares a las observadas en los pacientes de ELA. A casi 20 años de la descripción de las primeras mutaciones en la SOD1, ya han sido documentadas más de 130 mutaciones en dicha proteínas relacionadas a la patología de la ELA familiar. La mayoría de las mutaciones en la SOD1 de pacientes de ELA son mutaciones puntuales que llevan al cambio de un aminoácido en la estructura primaria de la proteína, salvo algunas que afectan el extremo c-terminal y generan una proteína truncada (Deng y col., 1993; Rosen y col., 1993). Las mutaciones en la SOD1 asociadas a la ELA ocurren a lo largo de todos los elementos funcionales de su estructura proteica (**Figura I.1**) (Bruijn y

col., 2004; Okado-Matsumoto y I., 2002), indicando que no es un sitio en particular el afectado en la ELA.

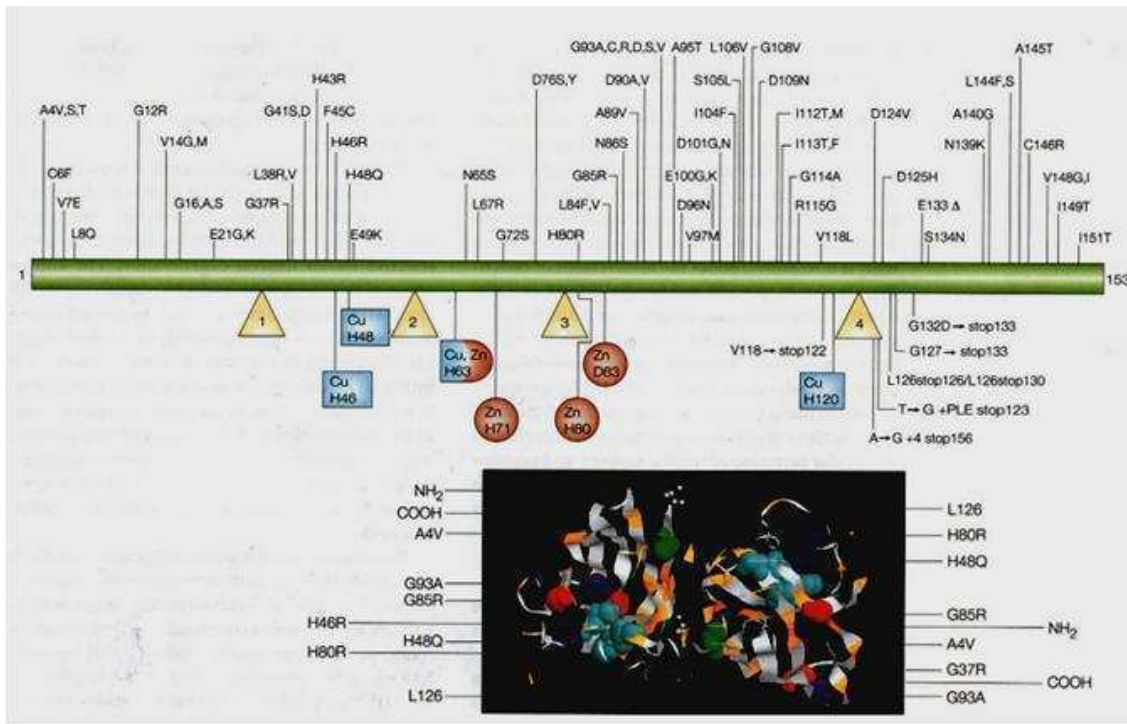


Figura 1.1: Mutaciones en el gen de la SOD1.

Debido a que (1) la ELA es una enfermedad autosómica dominante, (2) la expresión de SOD1 mutadas en ratones produce una enfermedad similar a la ELA (Gurney y col., 1994), y (3) el animal knockout para la SOD1 no presenta defectos en las motoneuronas (Reaume y col., 1996) indica que las mutaciones en SOD1 confieren una ganancia de función más que una pérdida de función. Además, no se ha observado una disminución en la actividad dismutasa de la SOD1 en la mayoría de los tejidos o fluidos de pacientes de ELA (Bowling y col., 1995; Cohen y col., 1996; Fisman y col., 1999; Robberecht y col., 1994). Si bien casi no se han descrito mutaciones de la SOD1 asociadas a casos esporádicos de la enfermedad, la SOD1 WT (del inglés wild type) es

tóxica para los cultivos de motoneuronas si es deficiente en Zinc (Estevez y col., 1999a). Por lo tanto, deficiencias de zinc en la SOD1 podrían causar la ganancia de la función tóxica en los casos de ELA esporádicos. De esta manera se podría explicar el hecho de que todos los pacientes (estén o no asociados a una mutación en la SOD1) poseen las mismas manifestaciones clínicas de la enfermedad. Beckman y colaboradores han propuesto que las mutaciones de la SOD1 permiten un mayor acceso del peroxinitrito (ONOO^-) al sitio de unión del cobre, generándose el ion nitronio (NO_2^+), el cual es capaz de nitrar residuos de tirosina (ver estrés oxidativo). Asimismo, la SOD1 WT tiene las mismas propiedades cuando es deficiente en zinc (Beckman y col., 1993; Crow y col., 1997a; Estevez y col., 1999b). Aquí debemos destacar que se ha descrito un aumento en la nitrotirosina en médulas espinales tanto de pacientes con ELA familiar como en pacientes con ELA esporádico. Los animales transgénicos que presentan la SOD1 mutada también exhiben este aumento en la nitrotirosina (Abe y col., 1995; Beal y col., 1997; Ferrante y col., 1997; Tohgi y col., 1999).

La motoneurona

El entendimiento de la biología básica de la motoneurona es clave para una mejor comprensión de las enfermedades que tienen a esta célula como blanco, siendo la ELA la enfermedad más común dentro de las enfermedades que afectan a este tipo neuronal (85%). Es particularmente interesante que, si bien la SOD1 mutada se expresa en todas las células del organismo, en los pacientes que padecen ELA familiar asociada a una mutación en SOD1, la muerte celular sólo se observa en un grupo particular de células: las motoneuronas. Otra característica particular de esta enfermedad es su inicio tardío en

la vida de los pacientes que poseen la mutación (cuarta o quinta década de vida). De esta manera, el entendimiento de la estructura neuronal y la neuroquímica de la motoneurona es una pieza fundamental para responder las incógnitas planteadas por esta enfermedad neurodegenerativa.

Las motoneuronas se encuentran entre las células más grandes del sistema nervioso central, poseyendo axones que pueden llegar a medir más de un metro de longitud en el caso de las motoneuronas lumbares que inervan los pies. Debido a esta característica, las motoneuronas requieren un alto metabolismo y una robusta estructura citoesquelética con un alto contenido de neurofilamentos. A diferencia de la mayoría de las neuronas, las motoneuronas hacen contacto sináptico fuera de la barrera hematoencefálica, en la placa neuromuscular. Aunque las motoneuronas poseen una alta expresión de los receptores de glutamato, expresan muy bajos niveles de la subunidad GluR2 del receptor AMPA (subtipo de receptor de glutamato). Cuando esta subunidad se encuentra presente, el receptor es impermeable al calcio, determinando así la especial vulnerabilidad de la motoneurona a la excitotoxicidad mediada por calcio (Van Damme y col., 2002). Asimismo, los niveles de las proteínas parvalbumina y calbindina que unen calcio con alta afinidad y que son determinantes en la amortiguación de las elevaciones de calcio intracelular, se encuentran disminuídas en las motoneuronas que son afectadas en la ELA (motoneuronas corticales y espinales). Por otro lado, las motoneuronas menos afectadas (motoneuronas del núcleo de Onuf, núcleo motor ocular y núcleo troclear) poseen una alta expresión de parvalbumina y calbindina (Alexianu y col., 1994). Además, las motoneuronas poseen una alta expresión de la enzima SOD1 (Pardo y col., 1995), posiblemente por su alto metabolismo. Todas estas características hacen que las

motoneuronas córtico-espinales sean diferentes a otras neuronas del sistema nervioso central.

Las motoneuronas y su entorno

La interacción de las motoneuronas con el medio que las rodea no sólo es determinante en el desarrollo sino que también podría serlo en la patología de ELA. Si bien en la ELA la única célula afectada es la motoneurona, su interacción con las células aledañas y los factores secretados por ellas, serían un paso fundamental para el desencadenamiento de la enfermedad (Pehar y col, 2005).

Los trabajos pioneros de Hamburger y Levi-Montalcini en los años 40s (Levi-Montalcini, 1951; Levi-Montalcini, 1953) y los trabajos sobre la muerte celular durante el desarrollo en los años 50s por Oppenheim (Oppenheim, cita en Purves 1988) dieron lugar a la postulación de la “hipótesis de los factores neurotróficos” (del inglés, Neurotrophic Factor Hypothesis) (Oppenheim, 1991; Purves, 1988). Esta hipótesis postula que durante el desarrollo, las neuronas compiten por factores limitantes provistos por el tejido blanco. Las neuronas que reciben estos factores sobreviven, mientras las que no reciben estos factores activan un programa molecular de muerte celular. Aunque importantes aspectos de la neurobiología de los factores neurotróficos y sus señales biológicas han sido predichos precisamente por esta hipótesis, estudios recientes indican que la determinación de las neuronas en vivir o morir es mucho más compleja que la inicialmente predicha. En la decisión de una neurona en morir o vivir juegan un papel importante no sólo el tejido blanco sino también las células vecinas. Asimismo, no sería

la acción de un solo factor neurotrófico sino la acción conjunta de diferentes factores tróficos la que determina la supervivencia de las neuronas.

Los factores neurotróficos son definidos como proteínas que apoyan el desarrollo, supervivencia y diferenciación neuronal. Debido a esta amplia definición, se podría incluir a una variedad de factores en dicha clasificación, siendo las neurotrofinas los factores neurotróficos prototípicos. Otros factores neurotróficos son el factor neurotrófico derivado de las células gliales (GDNF, del inglés Glial cell line Derived Neurotrophic Factor), el factor de crecimiento insulínico (IGF, del inglés Insulin-like Growth Factor) y el factor neurotrófico ciliar (CNTF, del inglés Ciliary Neurotrophic Factor).

Neurotrofinas

El factor de crecimiento nervioso (NGF, del inglés Nerve Growth Factor) fue la primera neurotrofina en ser descubierta ya hace más de 40 años atrás (Cohen y Levi-Montalcini, 1956; Cohen y Levi-Montalcini, 1957; Cohen y col., 1954), y estos resultados valieron que los autores fueran galardonados con el premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1986. Otros miembros de esta familia de proteínas son el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, del inglés Brain Derived Neurotrophic Factor), la neurotrofina-3 (NT-3), y la neurotrofina-4/5 (NT-4/5). Las neurotrofinas son sintetizadas en una amplia variedad de tejidos como precursores (pro-neurotrofinas), luego son clivadas para formar las proteínas maduras. Cabe destacar que la proteína inmadura también puede ejercer una función biológica (Chao y Bothwell, 2002). Todas las neurotrofinas presentan una distribución diferente tanto en el sistema nervioso central como en el periférico,

observándose diferencias de expresión en las distintas neuronas dependiendo de la etapa del desarrollo (Dawbarn y Allen, 2003).

Si bien originalmente las neurotrofinas fueron descritas como factores que promueven la supervivencia neuronal, esta acción sería primordial en el desarrollo, mientras que después ejercen otras funciones en la biología neuronal. Entre otras, las neurotrofinas participan en la plasticidad sináptica, en la formación de la memoria de largo plazo, en el remodelamiento de los axones y las dendritas, y en el ensamblado y desensamblado del citoesqueleto neuronal (Enokido y col., 1999; Hu y Reichardt, 1999; McAllister y col., 1999). Paradójicamente, las neurotrofinas también podrían desencadenar la muerte celular por apoptosis durante el desarrollo y en ciertas patologías (Kalb, 2005).

Las neurotrofinas y sus receptores han sido asociadas a varias enfermedades neurodegenerativas, generando varios estudios clínicos, que hasta el momento no han tenido resultados significativos (Dawbarn y Allen, 2003). Específicamente en la ELA, se ha observado en distintos tejidos de pacientes un aumento en la expresión de las neurotrofinas y sus receptores (Kust y col., 2002; Mutoh y col., 2000); sin embargo, los estudios clínicos usando neurotrofinas como agente terapéutico en pacientes con ELA no fueron exitosos (Beck y col., 2005; Group, 1999; Ochs y col., 2000).

Receptores de las neurotrofinas

El primer paso en la cascada de eventos que forman parte de la transducción de señales celulares es la formación del complejo ligando:receptor. Las neurotrofinas pueden ejercer su acción a través de dos clases diferentes de receptores. Los receptores Trk (del inglés Tropomyosin-related kinase) y el receptor p75^{NTR} (del inglés p75 neurotrophin

receptor). La familia de los receptores Trk posee tres miembros: TrkA, TrkB y TrkC, que cuando se unen a las neurotrofinas se dimerizan y activan un dominio de tirosina kinasa. Los distintos receptores Trk poseen distinta afinidad para las diferentes neurotrofinas: el receptor TrkA se une con mayor afinidad al NGF, mientras que el TrkB se une a BDNF y NT-4/5 y el TrkC se une a NT-3. La especificidad por la cual una neurotrofina promueve la supervivencia neuronal en una subpoblación específica sería determinada por la presencia o ausencia de los diferentes miembros de la familia de receptores Trk y/o la presencia del receptor $p75^{\text{NTR}}$. En los ganglios dorsales, las neuronas de diámetro pequeño no mielinizadas expresan predominantemente el receptor TrkA, mientras que las de gran diámetro expresan TrkC. Curiosamente, las motoneuronas no expresan el receptor TrkA (Henderson y col., 1993).

El ARNm de los receptores Trk puede procesarse alternativamente y de esta manera generar varias isoformas del receptor. Los procesamientos que afectan al dominio juxtamembrana podrían perturbar la interacción con el ligando, mientras que la omisión de los exones que codifican para la porción intracelular generan un receptor truncado. Los receptor truncados para TrkB y TrkC no poseen actividad tirosina kinasa, ejerciendo una función de dominante negativo, ya que se unen al ligando pero no tienen actividad biológica (Eide y col., 1996).

El receptor $p75^{\text{NTR}}$ pertenece a la familia de los receptores de muerte (como el receptor para el factor de necrosis tumoral (TNF, del inglés Tumor Necrosis Factor), o el receptor Fas. El dominio extracelular del $p75^{\text{NTR}}$ posee repeticiones de cisteína características de la familia de los receptores de TNF, mientras que la región intracelular posee un dominio de muerte (Liepinsh y col., 1997). Sin embargo, el mecanismo por el

cual el p75^{NTR} desencadena la muerte apoptótica es diferente al desencadenado por los receptores de TNF (Kong y col., 1999). A diferencia de los receptores Trk, el receptor p75^{NTR} se une a todas las neurotrofinas con similar afinidad (Carter y col., 1996), poseyendo una mayor afinidad por las pro-neurotrofinas (Lee y col., 2001). Sin embargo, cabe destacar que bajo algunas circunstancias, el p75^{NTR} no responde a todas las neurotrofinas por igual. Por ejemplo, el NGF causa una activación de NFκ-B mediada por p75^{NTR} en las células de Schwann, mientras que las otras neurotrofinas no (Carter y col., 1996). Similarmente, sólo la interacción NGF/p75^{NTR} induce muerte apoptótica en los oligodendrocitos (Casaccia-Bonnet y col., 1996). Por otro lado, todas las neurotrofinas inducen la hidrólisis de esfingomielina mediante la activación de p75^{NTR} (Dobrowsky y col., 1995). Además, la interacción del NGF/p75^{NTR} incrementa la muerte celular programada en cultivos organotípicos de médula espinal (Sedel y col., 1999).

Existe una interacción física y funcional entre los receptores Trk y el receptor p75^{NTR}, siendo primordial para las distintas respuestas biológicas de las neurotrofinas (Bibel y col., 1999; Hempstead y col., 1991; Huber y Chao, 1995; Wiese y col., 1999; Wolf y col., 1995). El receptor p75^{NTR} ejerce una cooperación positiva con los receptores TrkA, y TrkB, aumentando la afinidad por el NGF en el primer caso y la especificidad por el BDNF en el segundo (Bibel y col., 1999; Hempstead y col., 1991; Huber y Chao, 1995; Wolf y col., 1995). Las consecuencias funcionales de la interacción del p75^{NTR} con los receptores Trk son múltiples y específicas para cada neurotrofina (**Figura I.2**). El sitio de unión del NGF y el BDNF es diferente para el p75^{NTR} que para el TrkA y TrkB, respectivamente; por otro lado el NT-3 y el NT-4/5 utilizan el mismo sitio de unión para los dos tipos de receptores (Ryden y Ibanez, 1996; Ryden y col., 1995). Esta interacción

entre las dos clases de receptores es determinante para algunas respuestas biológicas (Kaplan y Miller, 2000; Mamidipudi y Wooten, 2002). Un ejemplo de la alta complejidad entre la interacción $p75^{NTR}$ /Trk se observa en los oligodendrocitos, donde la activación del receptor TrkA reduce la actividad JNK (del inglés Jun amino-terminal kinase) activada por el receptor $p75^{NTR}$, pero no afecta la habilidad del $p75^{NTR}$ en inducir NF κ -B (Yoon y col., 1998).

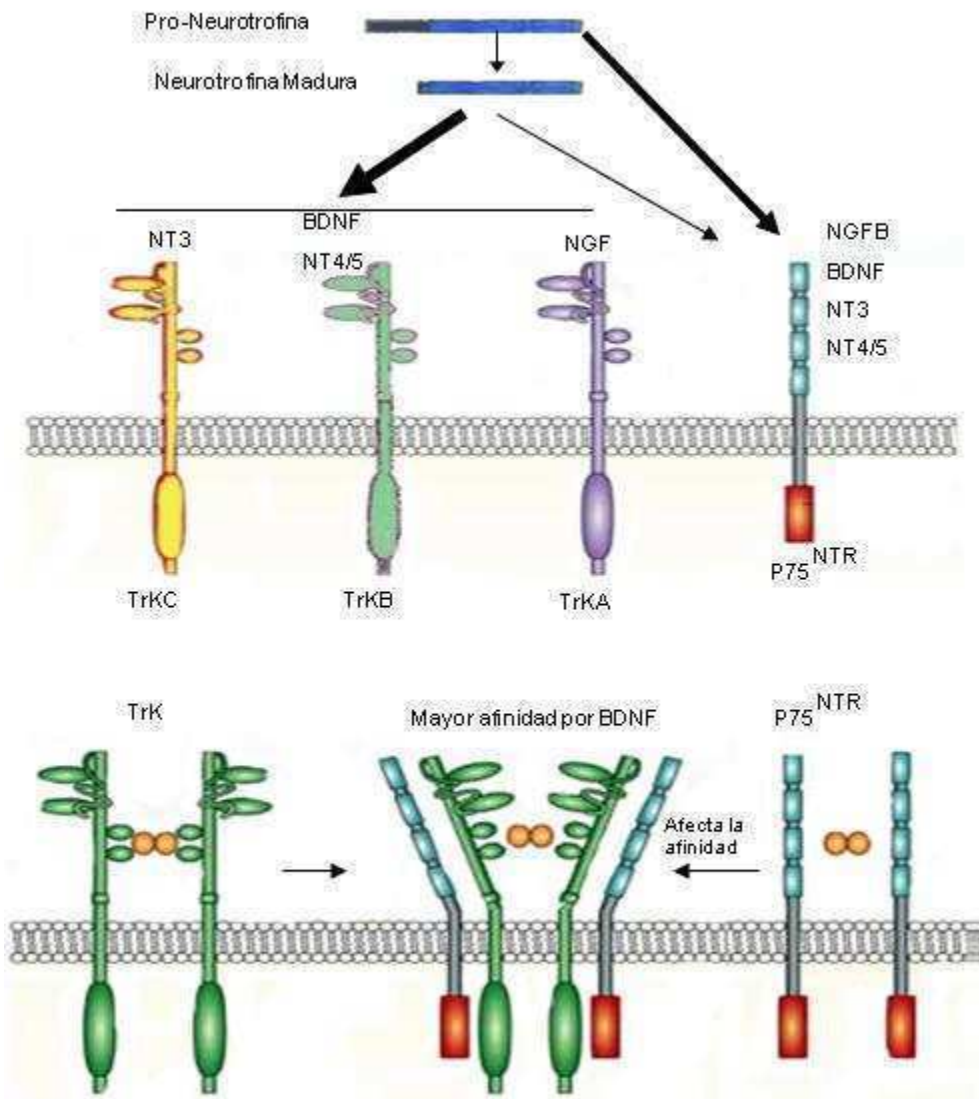


Figura I.2: Receptores de neurotrofinas e interacciones entre los mismos.

Las neurotrofinas luego de unirse al receptor son internalizadas, y las vesículas de endosomas formadas pueden tomar distintos destinos: reaparecer en la membrana, degradarse o ser transportadas hacia el cuerpo celular (transporte retrógrado). El tipo de respuesta biológica dependerá de la ruta tomada, ya que los receptores internalizados o en la superficie están expuestos a microambientes que difieren en la composición de lípidos y proteínas de señalización. Existe evidencia de que tanto el receptor p75^{NTR} como los receptores Trk pueden ser transportados retrógradamente solos o combinados.

En el desarrollo, las motoneuronas expresan el p75^{NTR}, y su expresión es máxima a la misma edad gestacional en la que se produce la muerte celular programada; sin embargo, su expresión en roedores disminuye al momento del nacimiento (Ernfors y col., 1989; Urschel y Hulsebosch, 1992). A pesar de que el p75^{NTR} no se expresa en la etapa madura en las motoneuronas, puede ser inducido por una injuria (Koliatsos y col., 1991; Rende y col., 1995; Wu, 1996). Cabe destacar que se ha observado un aumento de este receptor en pacientes con ELA (Seeburger y col., 1993).

Neuregulinas

Si bien la neuregulinas no son consideradas factores neurotróficos y en algunos casos se clasifican como factores gliotróficos por su acción en las células gliales, en este trabajo de tesis demostramos que las neuregulinas ejercen una acción en la supervivencia de las motoneuronas in vitro.

Las neuregulinas (NRGs) forman parte de la familia de los ligandos similares al factor de crecimiento epidérmico (EGF, del inglés Epidermal Growth Factor-like ligands)

que ejercen su acción a través de los receptores ErbB. Han sido identificadas cuatro neuregulinas diferentes (Neuregulina 1, 2, 3, 4), con un dominio EGF que es esencial para la unión y activación de los receptores ErbB (Buonanno y Fischbach, 2001; Yarden y Sliwkowski, 2001). Las isoformas codificadas por el gen de neuregulina 1 (NRG1) han sido las más ampliamente estudiadas y caracterizadas debido a su importancia durante el desarrollo embrionario y sus participaciones en diferentes procesos patológicos. Todas las isoformas de NRG están codificadas por un mismo gen (uno de los más grandes del genoma de los mamíferos), que genera varias isoformas por la acción de diferentes promotores y un procesamiento alternativo del ARNm que contribuye a la heterogeneidad de las proteínas (Falls, 2003b). Las cuatro isoformas más estudiadas de la NRG1 son la de tipo II y secretoria, o las asociadas a membrana (tipo I, III, IV), que pueden ser cortadas y secretadas (**Figura I.3**). Todas las isoformas comparten una región en común, que es el dominio EGF, el cual es necesario y suficiente para unirse a los receptores ErbB y activarlos, como se ha comprobado con la proteína recombinante (Holmes y col., 1992) y la versión sintética del mismo (Barbacci y col., 1995). Sin embargo, se han descrito tres formas del dominio EGF (alfa, beta o gamma) que comparten una secuencia característica (región de especificidad al receptor); una región específica les otorga características concretas como la afinidad de unión al receptor ErbB (**Figura I.4**). La gran variedad de isoformas de NRG y la heterogeneidad en la distribución en diferentes tejidos hacen que estas proteínas estén implicadas en múltiples etapas del desarrollo así como en distintos procesos fisiológicos del sistema nervioso, el corazón y las células epiteliales de diferentes órganos (Burden y Yarden, 1997). Asimismo, la expresión de NRG está desregulada en patologías tan diversas como la

esquizofrenia, alteraciones de las arterias coronarias y cáncer. Por otro lado, las neuregulinas participan en la regulación de diversos procesos biológicos como la proliferación, diferenciación, migración, apoptosis, supervivencia, angiogénesis y destino celular (Breuleux, 2007), determinando que la NRG1 sean un factor crítico en el desarrollo y la vida de un organismo.

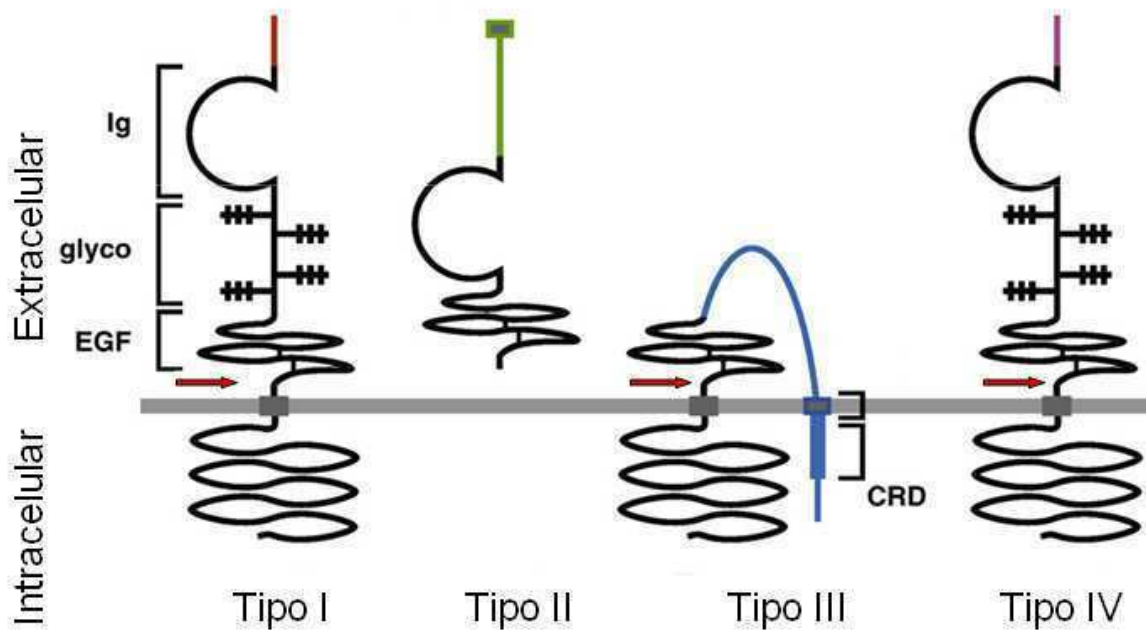


Figura I.3: Tipos de neuregulina 1.

Por su diversidad de acción, las distintas isoformas de NRG1 han sido caracterizadas y denominadas por distintos autores de diferentes maneras, dependiendo de la acción que ejercen: factor de crecimiento de la glia (GGF, del inglés: Glial Growth

Factor), que produce proliferación en las células gliales (Goodearl y col, 1993); factor inductor del receptor de acetilcolina (ARIA, del inglés: Acetylcholine Receptor Inducing Activity) ya que estimula la síntesis del receptor de acetilcolina en el músculo esquelético y promueve el desarrollo de la placa neuromuscular (Falls y col., 1990; Falls y col., 1993); factor de diferenciación Neu (NDF, del inglés Neu Differentiation Factor), que produce la diferenciación y el arresto del ciclo celular de cultivos de células de cáncer de mama (Peles y col., 1992); heregulina (HRG) por su capacidad de inducir la fosforilación del receptor ErbB2/Her2 (Holmes y col., 1992). Posteriormente, otro grupo de investigadores purificó un factor al cual denominaron factor derivado de neuronas motoras o sensoriales (SMDF, del inglés Sensory and Motorneuron-Derived Factor) que es la isoforma predominante en neuronas sensoriales y motoras, participando en la regulación de la proliferación de las células de Schwann y del receptor de acetilcolina en el sistema nervioso periférico (SNP) (Ho y col., 1995). Como mencionamos anteriormente, todas estas proteínas homólogas son expresadas en una gran variedad de tejidos y poseen funciones diferentes aunque provienen de un solo gen (NRG1) que por procesamiento alternativo del ARN mensajero, da lugar a un mínimo de quince isoformas (Ben-Baruch y Yarden, 1994; Breuleux, 2007).

La NRG1 se expresa en SNP en estados tempranos de la embriogénesis (Corfas y col., 1995; Marchionni y col., 1993; Meyer y Birchmeier, 1994) y es importante en distintos aspectos del desarrollo. En la cresta neural, las neuregulinas promueven la diferenciación glial, y la inhibición de la diferenciación neuronal (Shah y col., 1994). En etapas más tardías del desarrollo, las neuregulinas promueven la proliferación y la supervivencia de los precursores de las células de Schwann, así como también de las

células de Schwann en sí mismas (Brockes, 1997; Dong y col., 1995; Goodearl y col., 1993; Grinspan y col., 1996; Syroid y col., 1996; Trachtenberg y Thompson, 1996).

La generación de ratones deficientes en todas o algunas de las formas de NRG1 o de sus receptores ErbB ha sido útil en la descripción de la función biológica de estas proteínas, demostrando que la expresión de las neuregulinas es imprescindible para el correcto desarrollo embrionario cardíaco y neuromuscular (Britsch y col., 1998; Meyer y Birchmeier, 1995; Meyer y col., 1997). Llamativamente, los animales que no pueden expresar la isoforma de tipo III se observó un defecto en la diferenciación de las células de Schwann. La deficiencia de NRG1 tipo II no es letal durante el desarrollo, pero los ratones mueren al nacer por una formación incorrecta de las placas neuromusculares y una incapacidad para respirar de forma autónoma (Lee y col., 1995; Meyer y Birchmeier, 1995). De estos estudios experimentales podemos concluir que la isoformas I, II y III beta de la NRG1 son imprescindibles para el correcto desarrollo del sistema nervioso y cardíaco.

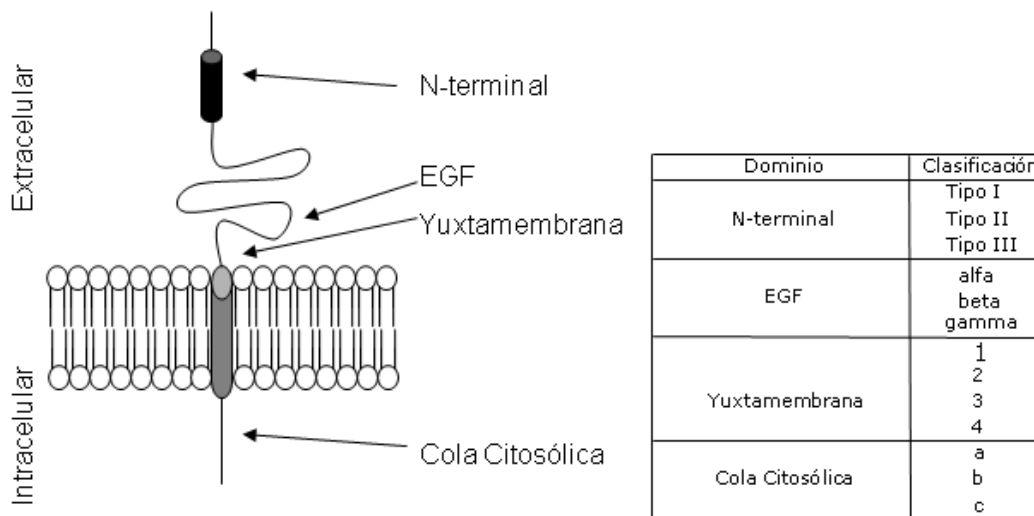


Figura I.4: Regiones de las neuregulinas.

Las neuregulinas también ejercen una acción en el SNP maduro, ya que regulan la expresión de los receptores de acetilcolina en la placa neuromuscular (Falls y col., 1990; Tansey y col., 1996). Asimismo, las neuregulinas secretadas en la matriz extracelular de la placa neuromuscular controlan la reinervación luego de una lesión de los nervios (Jo y col., 1995). La expresión de las neuregulinas en las células de Schwann también produce un aumento en la proliferación de estas células cuando existe una lesión de los nervios (Carroll y col., 1997; Raabe y col., 1996). Además, la expresión de las neuregulinas disminuye en las motoneuronas luego de una axotomía (Bermingham-McDonogh y col., 1997).

Como fue descrito para las neurotrofinas, las neuregulinas se expresan de manera diferencial y se unen con diferente afinidad a combinaciones de receptores ErbB activando así rutas intracelulares que pueden resultar en destinos tan opuestos como la diferenciación, la proliferación, la sobrevida o la muerte celular.

Receptores de las neuregulinas (ErbB/HER)

Los receptores de las neuregulinas ErbB forman la subclase I de los receptores tirosina kinasa. Estos receptores son glicoproteínas de membrana que presentan una estructura modular compuesta por una región extracelular a la que se une el ligando, una única región transmembrana, y una larga cola citoplasmática que contiene el dominio con actividad de tirosina kinasa; esta última región está seguida de secuencias reguladoras no catalíticas con residuos de tirosina fosforilables (**Figura I.5**). Los receptores ErbB

regulan importantes funciones durante el desarrollo embrionario así como también en la etapa adulta, siendo importantes en las células normales y en diferentes células de origen cancerígeno.

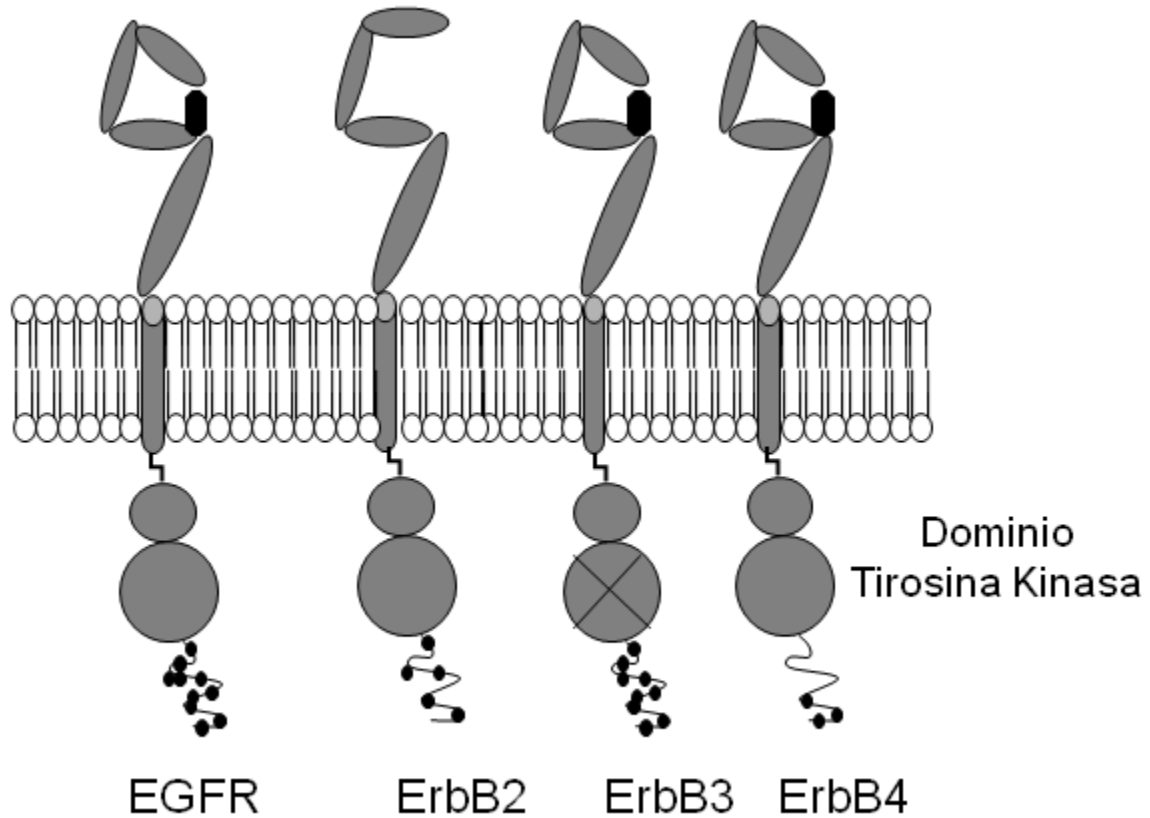


Figura I.5: Receptores ErbB.

El primer miembro de los receptores ErbB descrito fue un receptor que se fosforila en presencia del factor de crecimiento epidérmico (EGF, del inglés Epidermal Growth Factor), se lo denominó receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR,

del inglés Epidermal Growth Factor Receptor); otros nombres en la literatura para este receptor son ErbB1 y HER1 (Carpenter y col., 1975). Luego del clonado del ErbB1, se describió otro receptor tirosina kinasa que presentaba una gran homología con el ErbB1 y se lo denominó receptor humano de tipo 2 relacionado con el EGFR (del inglés, Human EGFR-Related 2, HER2) (Coussens y col., 1985); simultáneamente se describió un receptor tirosina kinasa en carcinomas mamarios humanos y se lo denominó ErbB2 por su homología con el ErbB1 (King y col., 1985). Posteriormente se descubrieron los otros dos miembros de la familia, ErbB3/HER3 (Kraus y col., 1989) y ErbB4/HER4 (Plowman y col., 1993).

Los receptores ErbB1, 3 y 4 poseen dos conformaciones, “cerrada” y “abierta” que estarían en equilibrio. La conformación cerrada sería favorecida en ausencia del ligando (Cho y Leahy, 2002; Ferguson y col., 2003), mientras que la unión con un ligando estabilizaría la conformación abierta, permitiendo que el receptor interacte con otros receptores de la misma familia (Burgess, 2008; Burgess y col., 2003; Garrett y col., 2002). Por otro lado, el receptor ErbB2 presenta una activación particular, ya que presenta una conformación semiabierta y no se ha descrito hasta el momento un ligando capaz de unírsele con alta afinidad (**Figura I.5**). El ErbB2 ejercería su actividad luego de unirse a otros miembros de la misma familia (Citri y col., 2003), presentando una mayor afinidad por los otros miembros que se encuentran en su conformación abierta, es decir unidos al ligando (Graus-Porta y col., 1997; Karunagaran y col., 1996). Se ha propuesto que el dominio kinasa de los receptores ErbB se mantiene normalmente inactivo, siendo necesaria la dimerización con otros receptores para que el dominio intracelular se autofosforile (Mohammadi y col., 1993; Posner y col., 1992; Wedegaertner y Gill, 1989;

Yarden y Schlessinger, 1985; Yarden y Schlessinger, 1987). La fosforilación de los residuos de tirosina en el dominio citoplasmático de los receptores ErbB permite su interacción con diferentes moléculas adaptadoras que desencadenan una red de cascadas de señalización intracelular, entre las cuales se destacan la Ras/MAPK, PKC, PI3K/Akt y SAT (Scaltriti y Baselga, 2006; Schlessinger, 2000) (**Figura I.6**).

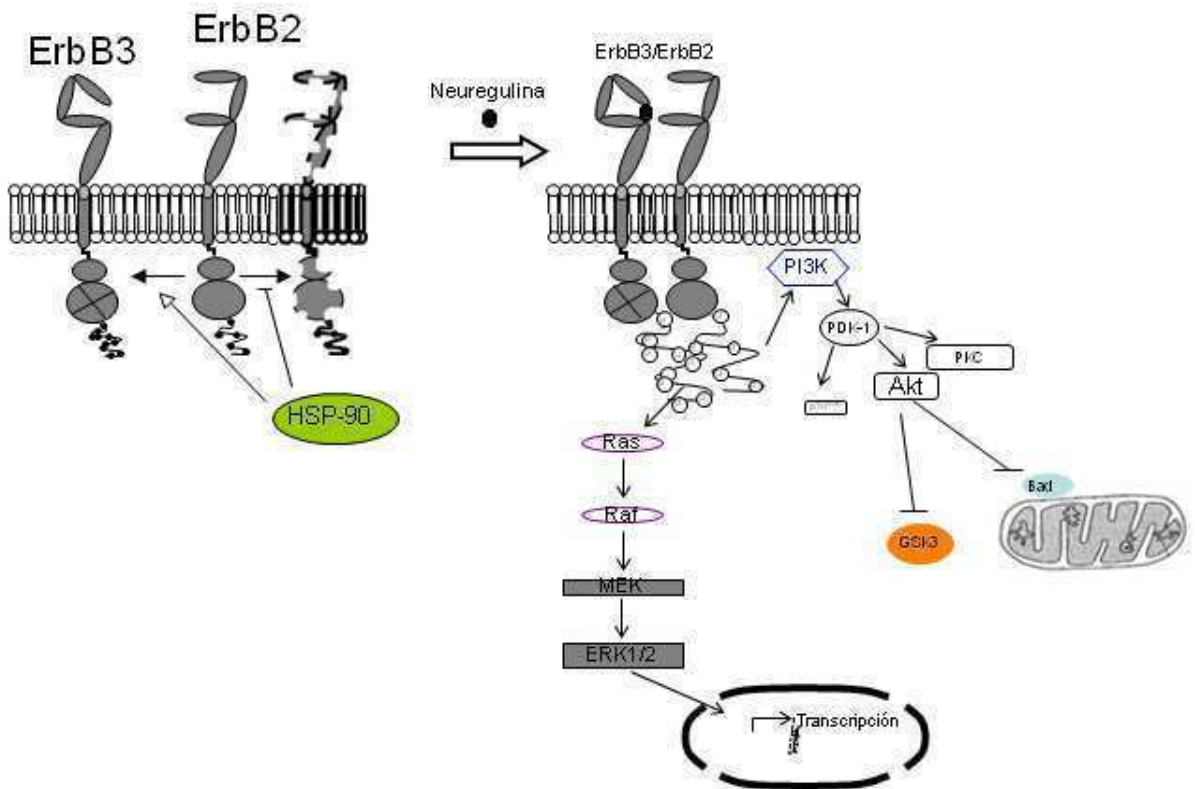


Figura I.6: Esquema de señalización de los receptores ErbB.

Los receptores EGFR y ErbB4 pueden formar homodímeros y autofosforilarse con su dominio tirosina kinasa luego de ser activados por un ligando. Por otro lado, el ErbB3 no presenta actividad tirosina kinasa, necesitando la formación de un heterodímero para la transducción de la señal. Cabe destacar que, si bien este receptor carece de

actividad kinasa, puede reclutar PI3K cuando forma un heterodímero con el ErbB2; de hecho, ErbB3 es considerado el principal miembro de la familia encargado de activar esta vía de supervivencia celular (Waterman y col., 1999). Como se ha mencionado anteriormente, para el receptor ErbB2 no se ha descrito ningún ligando, siendo la dimerización con los otros miembros de la familia la única manera conocida hasta el momento para su activación (Citri y col, 2003, Graus-Porta y col 1997), aunque se ha observado una cierta actividad constitutiva (Citri y col., 2003; Graus-Porta y col., 1997). Asimismo, el receptor ErbB2 posee otra característica particular que es relevante para los resultados de esta Tesis. El receptor ErbB2 es una proteína cliente de la proteína HSP90 (ver más adelante), necesitando de ésta para su estabilización en la membrana (**Figura I.6**).

La especificidad de ligando como así también las combinaciones de los distintos receptores y la expresión en los tejidos, hacen que las señales activadas por esta familia de receptores sea muy diversa. Los factores EGF, ampiregulina y TGF- α (del inglés Transforming Growth Factor alfa) se unen solamente al receptor ErbB1, mientras que las neuregulinas 1 y 2 se unen a los receptores ErbB3 y ErbB4. Las NRG3, NRG4 y la tomoregulina se unen solamente al ErbB4. Asimismo, los receptores EGFR y ErbB4 unen HB-EGF (del inglés Heparin-Binding EGF-like Growth Factor), betacelulina, epiregulina y epigenina (Chang y col., 1997; Cohen, 1965; Derynck y col., 1984; Harari y col., 1999; Higashiyama y col., 1997; Jones y col., 1999; Kinugasa y col., 2004; Marquardt y col., 1984; Strachan y col., 2001; Wieduwilt y Moasser, 2008).

Los ratones deficientes en la familia de los receptores ErbB muestran un variado rango de fenotipos consistente con su rol en la diferenciación, proliferación, migración y

sobrevida celular. Los ratones deficientes en el receptor ErbB2 mueren en la mitad de la etapa gestacional, debido a una malformación de la trabécula cardíaca. Además, estos animales presentan defectos en los ganglios craneales y en la cresta neural, demostrando que el ErbB2 juega un rol importante en la diferenciación de los oligodendrocitos y en la mielinización de los nervios periféricos por parte de las células de Schwann (Lin y col., 2000; Morris y col., 1999; Woldeyesus y col., 1999). En los modelos animales donde se previno la muerte embrionaria, por la expresión de receptor ErbB2 exclusivamente en el miocardio, se observaron severos defectos en las células de Schwann y pérdida de neuronas motoras y sensoriales (Morris y col., 1999; Woldeyesus y col., 1999). El ratón deficiente en el receptor ErbB3 también presenta defectos cardíacos y muere en la edad gestacional de 13.5 días, presentando neuropatías por una deficiencia en la mielinización de los nervios periféricos debido a defectos en la proliferación y diferenciación de las células de Schwann; además, estos ratones presentan defectos en el cerebelo y en los ganglios craneales (Erickson y col., 1997; Riethmacher y col., 1997). Las similitudes en las deficiencias cardíacas y neurológicas entre los ratones deficientes de NRG1 y los ratones deficientes de distintos receptores ErbB sugieren que la interacción entre estos componentes desencadena los distintos procesos biológicos que contribuyen a sus patologías, mostrando en algunos casos una redundancia en las señales activadas y en otros casos una alta especificidad.

La interacción entre las neuregulinas y sus receptores posee una característica diferente a otros complejos ligando/receptor tirosina kinasa, ya que el ligando no actúan como dímeros que promueven la dimerización de sus receptores (como por ejemplo las neurotrofinas). De hecho, las neuregulinas se unen como monómeros al receptor y la

dimerización del receptor es mediada enteramente por los receptores (Garrett y col., 2002).

El hecho de que las neuregulinas se sinteticen como moléculas transmembrana amplía su capacidad de generar respuestas diferentes, función que actúa también como un mecanismo de su control regulatório. Por otro lado, la liberación del factor soluble debe producirse en el momento y contexto adecuado, generando esto una mayor regulación (Montero y col., 2008). La neuregulina puede liberarse al medio extracelular y así interactuar con receptores de otra célula (señalización parácrina), o puede interactuar con receptores de su propia célula (señalización yuxtácrina).

Tras la unión de las neuregulinas a los receptores ErbB3 o ErbB4, estos interactúan con otro receptor formando homodímeros o heterodímeros, produciéndose la activación de su dominio kinasa intrínseco y fosforilándose en diferentes tirosinas de la porción citoplasmática (Heldin, 1995; Weiss y Schlessinger, 1998). A partir de allí, existe una gran diversificación de la señal, ya que los residuos fosforilados se pueden unir con gran afinidad a distintas proteínas y así activar diferentes cascadas de señalización intracelular. La unión de un ligando específico a un determinado receptor y la formación del homo o heterodímero determina la combinación de tirosinas fosforiladas, así como también las proteínas adaptadoras y las cascadas de señalización intracelular (Olayioye y col., 1998; Olayioye y col., 2000).

Cascadas o redes de señalización celular

A partir de la interacción del ligando con su respectivo receptor se produce la activación de rutas específicas de transducción. Cada señal extracelular es transducida a

través de múltiples vías, o cascadas de señalización. En estas intervienen numerosas proteínas que ganan y/o pierden su actividad biológica mediante modificaciones tales como fosforilación, desfosforilación y translocación intracelular. Las células poseen (han diseñado) un complejo entramado de vías de señalización, en el cual diversas rutas pueden ser activadas por distintos estímulos en un mismo contexto celular. Por lo tanto, las distintas respuestas celulares dependerán en gran medida del conjunto de rutas, presentes en las células que cada señal extracelular sea capaz de estimular. Estas redes ofrecen por lo tanto, múltiples posibilidades de modulación de las respuestas celulares en base a la regulación cualitativa, cuantitativa o temporal de los diversos componentes de la red en cada tipo celular.

Entre las distintas cascadas de señalización celular, la familia de las protein kinasas activadas por mitógenos (MAPK, del inglés Mitogen Activated Protein Kinases) es una de las más estudiadas. Las MAPKs son proteínas kinasas de serina y treonina, las cuales requieren la fosforilación simultánea de un residuo de treonina y uno de tirosina para su activación (Derkinderen y col., 1999). En los mamíferos se expresan al menos cuatro miembros de MAPKs: las ERK1/2; las p38MAPK, las kinasa del amino terminal de jun (JNK, del inglés Jun amino-terminal kinases) y la recientemente descrita ERK5. Estas proteínas se agrupan de acuerdo a sus mecanismos de regulación, a su sensibilidad para activar distintas proteínas kinasas y en base a la naturaleza de los aminoácidos dentro de la región de activación. Las cuatro familias poseen un mismo esquema de activación que consiste en tres niveles estructurales que involucran diferentes proteínas kinasas (**Figura I.7**). Las ERKs, JNKs y p38MAPs son activadas por diferentes proteínas kinasas de las MAPK específicas (MAPKK, del inglés Mitogen-Activated Protein Kinase

Kinase): la MEK1/2 activa a ERK1/2, la MKK3/6 a las p38MAPKs, las MKK4/7 a las JNKs y la MEK5 a la ERK5. Cada una de estas MAPKK es activada por más de una proteína kinasa de la proteína kinasa de MAPK (MAPKKK, del inglés Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase) aumentando así la diversidad y la complejidad de la señalización de las MAPKs. Tiempo atrás, se analizaba la funcionalidad de estas proteínas kinasas asociando a las ERK1/2 con los procesos de supervivencia celular, mientras que las JNKs y las p38MAPKs estaban relacionadas con la inducción de apoptosis. Sin embargo, más recientemente se ha demostrado que esta dicotomía inicial es una simplificación y que en realidad los roles de cada una de las cascadas de MAPKs depende fundamentalmente del tipo y del contexto celular. Estas proteínas se encuentran altamente expresadas tanto durante el desarrollo del sistema nervioso, como en el sistema nervioso adulto, se especula que en una primera etapa (desarrollo) estas proteínas jugarían un papel primordial en la división, diferenciación, maduración, supervivencia y muerte neuronal, mientras que en neuronas maduras jugarían un papel primordial en la plasticidad sináptica y memoria (Sweatt, 2001).

Las isoformas ERK1 y ERK 2 forman parte de la familia ERK1/2. Estas proteínas están expresadas en todos los tejidos de los mamíferos, pero son especialmente abundantes en los sistemas nerviosos central y periférico. Distintos factores neurotróficos activan la vía Ras-Raf, con la consecuente activación de las proteínas ERK1/2 (Kaplan y Miller, 1997; Marsh y Palfrey, 1996; Miyasaka y col., 1990). En algunos casos esta activación previene la muerte apoptótica (Owada y col., 1999; Xia y col., 1995).

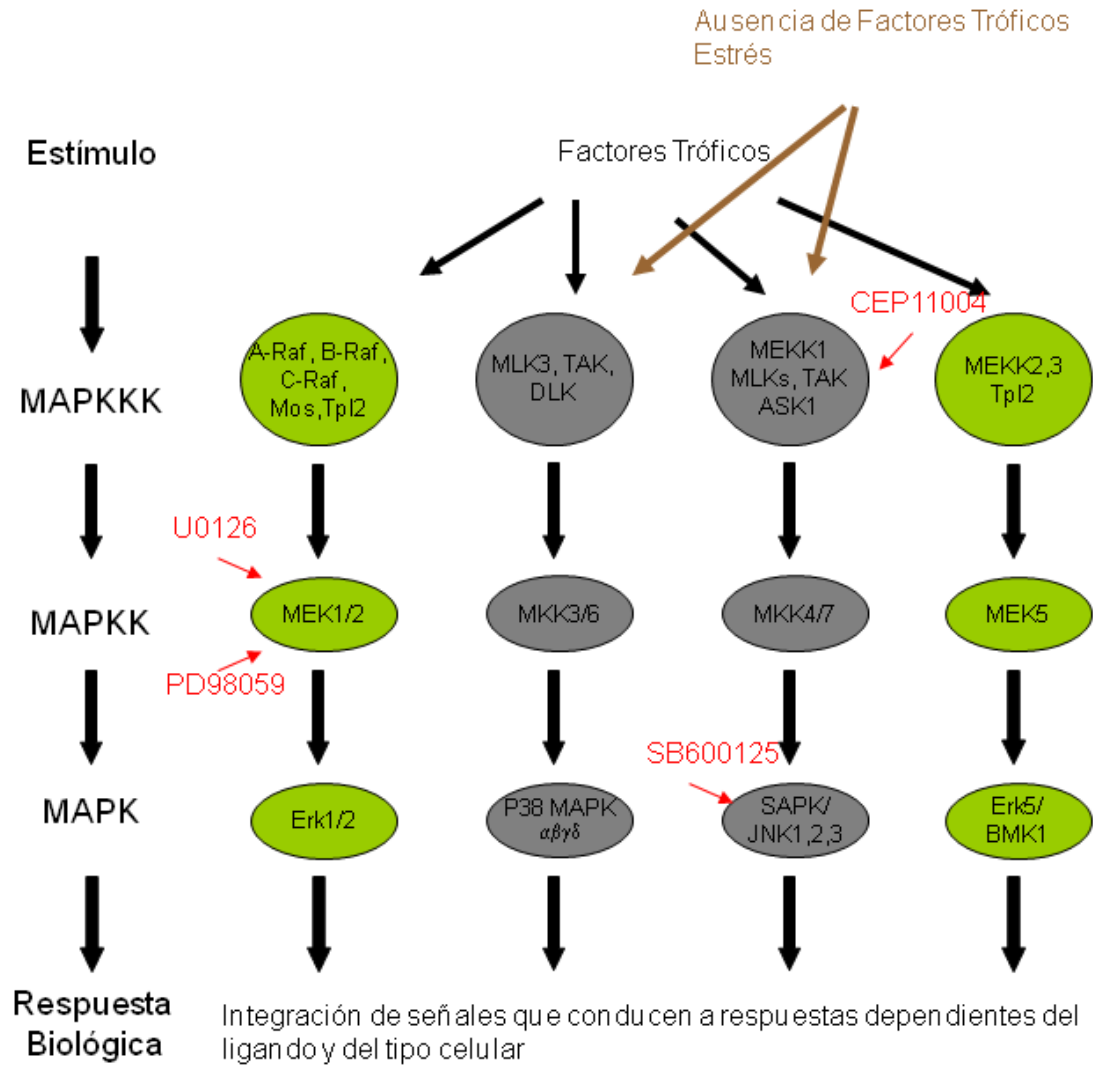


Figura I.7: Cascada de señalización de las MAPKs.

Existen cuatro isoformas diferentes de la proteína p38, de las cuales solo la alfa y la beta se expresan en el sistema nervioso central (Jiang y col., 1996). La isoforma gama se expresa en el músculo esquelético (Li y col., 1996b) mientras la epsilon se expresa en hígado y pulmón (Jiang y col., 1997). En ciertas circunstancias, las motoneuronas en cultivo desencadenan la muerte apoptótica por una vía que depende de la fosforilación de

p38 (Locatelli y col., 2007; Raoul y col., 2002). Asimismo, se ha documentado la participación de esta cascada en la muerte de las motoneuronas observada en los animales transgénicos para la SOD1 (Dewil y col., 2007).

En la vía JNK se han descrito tres miembros. JNK1 y JNK2 se encuentran en todo el organismo, mientras que JNK3 es exclusiva de cerebro, corazón y testículo (Davis, 2000). Sin embargo, por procesamiento alternativo de el ARNm que codifica para las distintas JNK, se genera una mayor diversidad (diez isoformas). Las JNK poseen numerosos sustratos, pero son la kinasa preferida por c-jun in vivo (Kyriakis y Avruch, 2001). La activación de JNK es mediada principalmente por MKK4 y MKK7 (Tournier y col., 2001), por encima de estas MAPKK en la cascada, se encuentran las MAPKKK. Entre las MAPKKK más destacadas se encuentran la ASK1 (del inglés Apoptosis Singaling Kinase-1); TAK1 (del inglés Transforming-Growth Factor Beta Activated Kinase 1), TPL-2 (del inglés Tumor progression locus-2) y la MLK (Davis, 2000; Kyriakis y Avruch, 2001). Tanto la ASK1, como la MLK se activan en la muerte apoptótica de diferentes neuronas (Maroney y col., 1999; Maroney y col., 1998; Raoul y col., 2002; Xu y col., 2001). La neutralización con anticuerpos anti- c-jun disminuye significativamente la muerte celular en neuronas simpáticas, cuando son cultivada en medio sin NGF (Estus y col., 1994). Similares resultados se han observados en células granulares del cerebelo cultivadas en ausencia de factores tróficos (Watson y col., 1998) y en células PC12 diferenciadas (Mesner y col., 1992). La activación de la vía JNK lleva a la inducción de la proteína ligando de Fas (Fas-L), promoviendo la activación de la vía extrínseca de la apoptosis (Le-Niculescu y col., 1999; Suhara y col., 2002). En las

motoneuronas esta vía se encuentra activada cuando las células son cultivadas en medios sin factores neurotróficos (Raoul y col., 2002; Ricart y col., 2006).

Finalmente y con respecto al miembro más joven de la familia conocida como la gran MAPK o ERK5, se ha demostrado que esta proteína kinasa se expresa de forma abundante en el cerebro de ratones durante el desarrollo, pero declina a medida que el cerebro madura, hasta llegar a niveles indetectables alrededor del día post-natal 49 (Liu y col., 2003).

Otra vía de señalización muy estudiada es la vía del fosfatidil-inositol 3 kinasa (PI3K, del inglés Phosphoinositide 3-Kinase). Existen distintas isoformas de la PI3K; la mejor caracterizada es el heterodímero formado por una subunidad reguladora de 85KDa (p85) y una subunidad catalítica 110KDa (p110). Los factores tróficos se asociarían con la subunidad p85 ya sea por un sitio específico de fosfotirosina o mediante una proteína adaptadora. También se ha descrito que la PI3K puede ser activada por proteínas G pequeñas, como por ejemplo Ras (Kodaki y col., 1994; Rodriguez-Viciano y col., 1994). Las proteínas blanco de la PI3K son Akt y PDK1. La proteína Akt puede ser activada directamente por PI3K o mediante la activación de la proteína PDK1. Luego, estas proteínas pueden activar o inhibir diversas proteínas en las células (**Figura I.8**).

Se encuentra ampliamente demostrado que la vía PI3K/Akt está involucrada en los mecanismos de supervivencia de las células, así como también en la inhibición de la apoptosis, siendo en general la mediadora de la sobrevida celular ante diversos estímulos (factores de crecimiento, hormonas, etc.) en una variedad de tipos celulares (Brunet y col., 2001). Se ha demostrado que Akt ejerce una acción inhibitoria sobre la activación de

las proteína BAD, inhibiendo de este modo la activación de la cascada apoptótica (Datta y col., 1997) (**Figura I.8**).

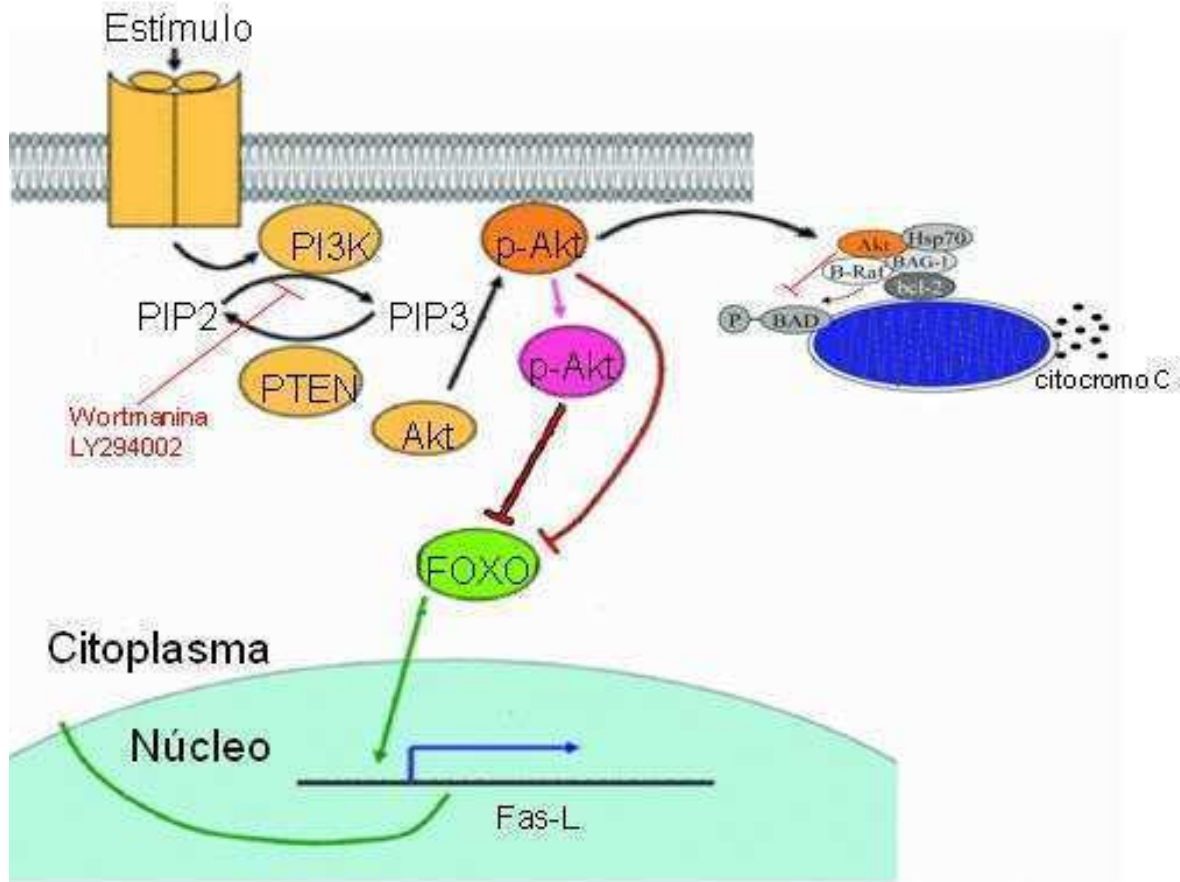


Figura I.8: Cascada de señalización PI3K/Akt.

Las familias de las neuregulinas, y de las neurotrofinas activan tanto la vía de ERK1/2, como la vía PI3K/Akt, las cuales son necesarias para desencadenar distintos efectos biológicos en las células. Las neuregulinas promueven la supervivencia y la función neuronal y no neuronal de diferentes tipos celulares mediante la activación de la cascada PI3K/Akt (Bermingham-McDonogh y col., 1996; Buonanno y Fischbach, 2001; Falls, 2003a; Vaskovsky y col., 2000; Verdi y col., 1996). La vía PI3K es imprescindible para la proliferación, la supervivencia y la mielinización de las células de Schwann

(Maurel y Salzer, 2000). La activación de la vía ERK1/2 también es necesaria para la progresión del ciclo celular en las células de Schwann cuando se cultivan en presencia de neuregulina (Monje y col., 2006). En la línea celular PC12, el tratamiento con NGF produce la activación sostenida de ERK1/2, lo que arresta las células y determina su diferenciación. Por otro lado, el factor de crecimiento epidérmico (EGF, del inglés Epidermal Growth Factor) produce una activación transitoria de ERK1/2 que induce la proliferación celular (Cowley y col., 1994; Marshall, 1995). También en cultivos de células PC12, se ha observado que las neuregulinas protegen de la apoptosis inducida por el factor de necrosis tumoral (TNF, del inglés Tumor Necrosis Factor) o por el crecimiento en ausencia total de factores tróficos (deprivación de suero), activando la vía PI3K/Akt (Erlich y col., 2001), también la prevención de la apoptosis por el NGF es mediada por dicha cascada (Yao y Cooper, 1995). Interesantemente, en algunas circunstancias específicas y para determinadas respuestas biológicas es necesaria la activación de las dos cascadas (Monje y col., 2006; Owada y col., 1999; Xia y col., 1995).

Apoptosis

Aunque el desarrollo usualmente se asocie con procesos de creación, producción y construcción, la muerte celular durante este período juega un papel fundamental. Por ejemplo, más del 80% de las neuronas producidas en muchas regiones del sistema nervioso central están destinadas a morir durante el desarrollo en un proceso denominado muerte celular programada. De hecho, la muerte celular rediseña la morfología corporal,

desde el corazón a los vasos sanguíneos, del aparato digestivo al sistema nervioso (Glucksmann 1951, citado en Oppenheim, 1991).

Apoptosis es el término con que se designa a la forma más frecuente de muerte celular programada. Esta última es un proceso biológico imprescindible para el correcto desarrollo y funcionamiento del organismo, por lo cual se encuentra conservada en todos los eucariotas multicelulares. Tiene lugar tanto durante el desarrollo como a lo largo de la vida adulta, controlando en todo momento la correcta homeostasis tisular. El desajuste de este proceso está asociado con el desarrollo de patologías: un incremento desmesurado de la apoptosis llevaría al desencadenamiento de enfermedades neurodegenerativas tales como Alzheimer, Parkinson, ELA, etc; cardiovasculares (muerte celular post-isquemia) o inmunodeficiencias (HIV). En el caso de un déficit en este mecanismo, se produce la supervivencia anómala de células con diferenciación incompleta o defectuosa y este fenómeno se encuentra en la base de enfermedades autoinmunes o de diversos tipos de leucemias.

Apoptosis es un término que describe una muerte celular con características específicas tales como: la generación de burbujas celulares (“blebbing”), la condensación de la cromatina y la translocación de fosfatidilserina a la cara externa de la membrana plasmática. Esto último convierte a las células apoptóticas en blanco para los macrófagos los cuales las fagocitan rápidamente. En el caso de los cultivos celulares, este paso no se produce y existe una muerte secundaria con lisis celular. Diversos estímulos como la radiación, ausencia de los factores de crecimiento, desregulación del ciclo celular o activación de los receptores de muerte pueden iniciar la cascada apoptótica (Ashkenazi y Dixit, 1998; Basu y Haldar, 1998; Wang, 2001). En los mamíferos existen dos vías

principales de inducción de apoptosis. La vía intrínseca o mitocondrial y la vía extrínseca o por receptores de muerte.

La vía intrínseca o mitocondrial. Como su nombre lo indica, la mitocondria desempeña un papel clave en este proceso. Esta vía puede ser activada por daño celular, fármacos quimioterapéuticos, radiaciones ionizantes, neurotoxinas, estrés térmico u oxidativo, etc. La proteínas afectadas pertenecen a la superfamilia Bcl-2. Esta familia de proteínas esta formada por alrededor de 25 miembros, los cuales se agrupan en tres subfamilias. La primera subfamilia ejerce una actividad anti apoptótica (Bcl-2), mientras que las familias restantes poseen miembros que activan la apoptosis (Bax, BH3) permeabilizando la membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) y produciendo la apertura del poro de transición, la liberación del citocromo c, así como también de Smac/Diablo, AIF (del inglés, ApoptosisInducing Factor), Endo G. El citocromo c, una vez en el citoplasma, se une a la proteína adaptadora Apaf-1 que se oligomeriza formando un gran complejo heptamérico (1,4MDa) llamado apoptosoma. Este apoptosoma, a través de sus dominios CARD, recluta a una cisteín-proteasa llamada caspasa 9, la que sufre un cambio conformacional y se activa dando inicio a una serie de reacciones proteolíticas conocidas como la “cascada de las caspasas” (**Figura I.9**). Las caspasas activas desencadenan la proteólisis controlada de proteínas a partir del reconocimiento de secuencias de al menos cuatro aminoácidos y cortando en el extremo carboxilo de un residuo de aspartato. De esta manera y de forma ordenada se va produciendo la descomposición de las células y aparece el fenotipo apoptótico. Por otro lado, también desde la mitocondria se libera la proteína Smac/Diablo, la que se une a las proteínas IAP (del inglés Inhibitors of Apoptosis), que son inhibidoras de las caspasas. De esta manera la Smac/Diablo anula la

inhibición ejercida por las IAP sobre las caspasa, permitiendo la activación de las mismas. También son liberados el factor inductor de apoptosis (AIF) y la endonucleasas Endo G que son translocados al núcleo, induciendo la condensación periférica de la cromatina y la hidrólisis del ADN en fragmentos de alto peso molecular.

Las caspasas, son cisteinil-aspartato proteasas, que se pueden diferenciar en tres grupos: las caspasas iniciadoras que poseen un prodominio grande (caspasas, 2, 4, 8, 9,10) las cuales se subdividen en dos, las que tiene un prodominio CARD (del inglés Caspase Activation Recruitment Domain) (caspasas 2, 9) y las que tienen un dominio DED (del inglés Death Efector Domain) (caspasas 8,10). Este prodominio les permite interactuar con proteínas adaptadoras con dominios homólogos lo cual causa su activación por autoproteólisis. Los principales sustratos de las caspasas iniciadoras suelen ser las caspasas con prodominios pequeños, que pertenecen al segundo grupo: caspasas ejecutoras (caspasa 3, 6, 7). Estas últimas son las que desmontan las estructuras celulares.

La vía extrínseca o mediada por receptores de muerte se induce tras la unión de una proteína extracelular (ligando de muerte) a su receptor (receptor de muerte). Los receptores de muerte poseen una domino denominado dominio de muerte (DD, del inglés Death Domain) que se encuentra en la parte intracelular y es necesario para transmitir la señal de muerte. Los receptores de muerte pertenecen a la superfamilia del receptor para TNF (TNFR) e incluyen al TNFR1, FasR (CD95), p75^{NTR}, DR3/WSL y los receptores del ligando inductor de apoptosis relacionado con el TNF (del inglés, TNF-related apoptosis inducing ligand, TRAIL receptors) (TRAIL-R1; TRAIL-R2). Los miembros de esta familia se caracterizan por presentar de dos a cinco copias de un dominio extracelular rico en cisteína, además del dominio intracelular de muerte (DD).

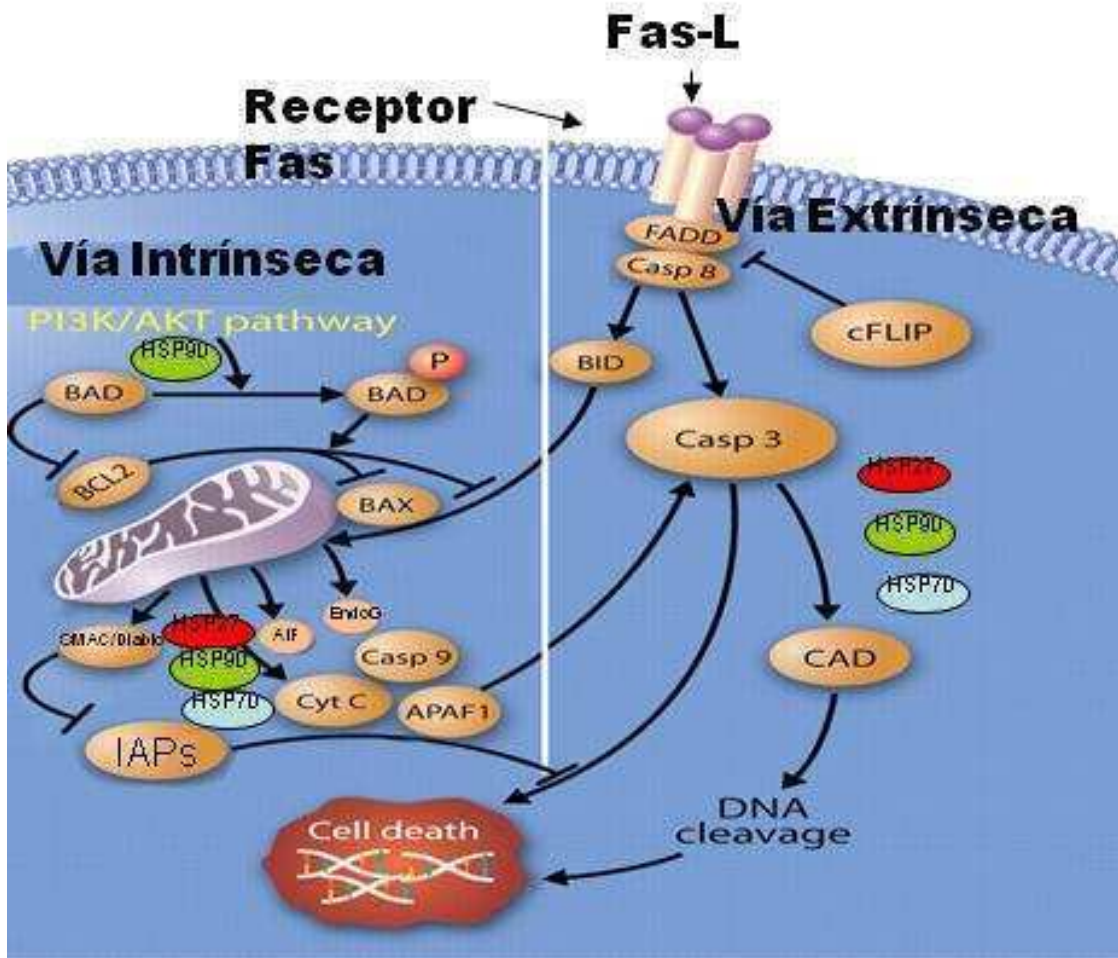


Figura I.9: Vías de la apoptosis.

La vía mejor caracterizada es la iniciada por el ligando de Fas (Fas-L), una proteína de membrana de unos 40 kDa, cuya unión con su receptor (Fas-R; receptor Fas), induce la apoptosis, promoviendo la unión de la proteína adaptadora FADD (del inglés, Fas-associated death domain) a su dominio DD. Este complejo, también por interacciones homólogas, se une a la caspasa-8, la cual se activa proteolíticamente y es liberada al citoplasma (**Figura I.9**). Allí rompe varias proteínas de la célula incluyendo la procaspasa-3, la cual ejecuta la apoptosis cortando diversas proteínas celulares. Ambas vías, la de los receptores de muerte (extrínseca) y la vía mitocondrial (intrínseca)

convergen a nivel de la activación de la caspasa-3. Sin embargo la caspasa-8 también puede activar la proteólisis de la proteína Bid, un miembro proapoptótico de la superfamilia de Bcl-2. Luego de la proteólisis, Bid se transloca a la mitocondria donde promueve la liberación del citocromo c, conectando así la vía extrínseca con la vía mitocondrial. De esta manera, se pueden activar distintas cascadas que desencadenen la apoptosis lo cual depende del tipo de estímulo, duración, tipo celular y/o la edad celular, **(Figura I.9)**.

Si bien existen pocos reportes que involucren a los receptores de muerte con la muerte celular programada que ocurre en el desarrollo, se ha demostrado que el receptor $p75^{NTR}$ podría ejercer un rol primordial en esta última. Por otro lado, los receptores de muerte han sido ampliamente relacionados con los procesos de muerte neuronal desencadenados por enfermedades neurodegenerativas tales como Alzheimer (Sotthibundhu y col., 2008), así como también en lesiones de la médula espinal e isquemia (Ackery y col., 2006; Ugolini y col., 2003; Wetzel y col., 2008). Específicamente en la ELA, tanto el TNFR, Fas-R como el $p75^{NTR}$ juegan un papel importante en la progresión de la enfermedad. Se han observado aumentos en $TNF\alpha$ y su receptor en los animales transgénicos para la SOD (Hensley y col., 2003; Hensley y col., 2006; Veglianese y col., 2006). Asimismo, se han observado incrementos en $TNF\alpha$ en el plasma de pacientes de ELA (Cereda y col., 2008). Astrocitos reactivos provenientes de animales transgénicos para la SOD producen muerte celular en las motoneuronas in vitro, por un mecanismo que involucra al $p75^{NTR}$ (Pehar y col., 2004a). Además, el complejo $NGF/p75^{NTR}$ desencadena la muerte celular programada en motoneuronas provenientes de los animales transgénicos pero no en los animales control (Pehar y col., 2007).

También existen evidencias que relacionan el complejo Fas-L/FasR con la ELA. Las motoneuronas en cultivo sufren una muerte apoptótica que involucra a Fas-L (Raoul y col., 2002). Los cultivos de motoneuronas de animales transgénicos son extremadamente más sensibles al Fas-L, y se observa una protección en las motoneuronas y una prolongación de la esperanza de vida en los animales transgénicos para SOD1 cuando son tratados intratecalmente con secuencias de interferencia de Fas (siRNA Fas) (Locatelli y col., 2007; Raoul y col., 2006). Interesantemente, el litio, una droga ampliamente utilizada para tratar los desordenes del comportamiento, es un bloqueante del complejo Fas/FADD/caspasa-8 y promueve la sobrevivencia de las motoneuronas, mejora la función motora y extiende la esperanza de vida (Shin y col., 2007). Se ha observado un retraso en la progresión de la enfermedad cuando los pacientes de ELA son tratados con litio (Fornai y col., 2008).

Las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno en la muerte celular programada

Las especies reactivas del oxígeno (ERO), así como las especies reactivas del nitrógeno (ERN) han sido vinculadas a la muerte neuronal apoptótica, tanto en el desarrollo como en las enfermedades neurodegenerativas. Las ERO comprenden a los radicales libres del oxígeno (anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxilo ($\bullet OH$), radical perhidroxilo (HO_2^{\bullet}) y los derivados oxigenados de naturaleza no radical que están relacionados con la producción de radicales del oxígeno (peróxido de hidrógeno (H_2O_2)). La principal fuente de ERO es la mitocondria debido a la reducción parcial del oxígeno en la cadena de transferencia de electrones. La proporción de ERO formados dependerá de las

condiciones de la célula, observándose un incremento de éstos en circunstancias tales como la muerte celular programada y en situaciones patológicas.

Por otra parte, el óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$) es un radical libre del nitrógeno y forma parte de las ERN. Las enzimas responsables de sintetizar $\cdot\text{NO}$ en las células son las óxido nítrico sintasas (NOS, del inglés), que usan como substrato arginina y NADPH (Knowles, 1996; Knowles y Moncada, 1994). Hasta el momento, se han descrito tres isoformas: la inducible (iNOS), la endotelial (eNOS) y la neuronal (nNOS). La diferente expresión de las distintas isoformas hace que el aumento de la concentración de NO esté estrictamente regulado y dependa de cada tipo celular. $\cdot\text{NO}$ puede reaccionar con el $\text{O}_2^{\cdot-}$ para formar el poderoso oxidante peroxinitrito (ONOO^-) (Beckman, 1996b). En la mayoría de los casos, éste sería el compuesto responsable de la toxicidad de las ERO y ERN en los sistemas biológicos. El ONOO^- puede reaccionar con el grupo tiol (Radi, 1996a), formar puentes disulfuro (Moreno y Pryor, 1992), centros hierro-sulfurados (Castro y col., 1994; Tortora y col., 2007), dedos de zinc (Crow y col., 1995), etc. Asimismo, el ONOO^- puede iniciar el mecanismo de lipoperoxidación (Radi, 1996b), oxidación de la metionina (Moreno y Pryor, 1992), oxidación de la deoxiribosa (Beckman y col., 1990). Además, puede reaccionar con metales de transición para formar especies muy reactivas (ión nitronio), las cuales pueden atacar el anillo fenólico de la tirosina, lo que resulta en la formación de 3-nitrotirosina (Beckman y col., 1992; Ischiropoulos y col., 1992; Radi, 1996a). También el peroxinitrito reacciona rápidamente con dióxido de carbono conduciendo a la formación de radicales secundarios como radicales carbonato ($\text{CO}_3^{\cdot-}$) y dióxido de nitrógeno ($\cdot\text{NO}_2$). Finalmente, una pequeña fracción del ONOO^- se homoliza, dando lugar a la formación del radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) y $\cdot\text{NO}_2$. Los procesos de nitración involucran al

$\cdot\text{NO}_2$ con las moléculas blanco. Como se describirá en los resultados, esta última acción del $\cdot\text{NO}_2$ es de particular interés para esta tesis. La nitración de los residuos de tirosina modifica la función de algunas proteínas afectando su actividad biológica, como es el caso de la proteína surfactante A (Haddad y col., 1994), neurofilamento L (Crow y col., 1997b); citocromo c (Cassina y col., 2000), proteína kinasa C ϵ (Balafanova y col., 2002), glutatión S transferasa (Ji y col., 2006), entre otras.

Estudios realizados en médulas espinales de ratones en la edad gestacional E11-E15, indican que las ERO y ERN participarían en la señal que desencadena la muerte de las motoneuronas en el desarrollo, ya que se observa una correlación entre el aumento de la muerte celular y el aumento del peroxinitrito (Sanchez-Carbente y col., 2005). En los cultivos de motoneuronas crecidos en ausencia de factores tróficos se observa una muerte celular apoptótica en la cual intervienen el peroxinitrito o sus derivados, ya que es necesaria la presencia de óxido nítrico y anión superóxido para desencadenar la muerte de la célula motora. También se observa un aumento en la inmunoreactividad para la nitrotirosina (Estevez y col., 1998a). Por otro lado, las motoneuronas cultivadas en presencia de BDNF necesitan de la presencia del $\cdot\text{NO}$ para su sobrevivencia, por su aporte en la producción de cGMP. En este último caso, el $\cdot\text{NO}$ sería producido por la enzima eNOS (Estevez y col., 1998b). También en los cultivos de motoneuronas el peroxinitrito transforma al NGF en un factor apoptótico posiblemente por la nitración en sus tirosinas (Pehar y col., 2006). Asimismo, en los cultivos de motoneuronas tratados con la enzima SOD deficiente en Zn se induce un aumento en la nNOS y una acumulación de proteínas nitradas, desencadenando una muerte apoptótica (Estevez y col., 1999b).

Estos resultados en su conjunto indican que la concentración de $\cdot\text{NO}$ y de $\text{O}_2\cdot^-$ en las células motoras, determina si la célula activa un mecanismo de supervivencia o un mecanismo de muerte.

Las proteínas de choque térmico y la supervivencia celular

Las proteínas de choque térmico o proteínas de respuesta al estrés (HSPs, del inglés Heat Shock Proteins) se encuentran muy conservadas evolutivamente, sugiriendo que su función es fundamental en los procesos celulares (Diller, 2006; Kregel, 2002). Estas proteínas se expresan básicamente en las células y son importantes para el mantenimiento del metabolismo celular. Las HSPs poseen la función de chaperonas ya que estabilizan proteínas, ayudan al re-plegado de las proteínas mal conformadas, y promueven la degradación de proteínas dañadas. Asimismo son inducidas por diferentes estímulos tales como hipotermia, hipertermia, isquemia, hipoxia y estrés oxidativo. Las HSPs se han clasificado en cinco familias de acuerdo a su estructura, secuencia de aminoácidos, peso molecular y su grado de homología: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 y HSPs pequeñas (Diller, 2006; Hightower y Hendershot, 1997; Kregel, 2002; Schlesinger, 1990; Schlesinger, 1996). La familia de HSP90 y HSP70 son dependientes de ATP ya que poseen un dominio ATPasa en su región N-terminal, el cual es necesario para su función (Freeman y col., 1995; Pearl y Prodromou, 2000; Pearl y Prodromou, 2001; Pearl y Prodromou, 2006). Las HSPs ejercen una regulación en las vías apoptóticas, impidiendo la activación de componentes de la cascada extrínseca e intrínseca (Beere, 2004; Beere, 2005; Didelot y col., 2006; Garrido y col., 2001) (**Figura I.9**).

En el contexto de esta tesis es de particular interés la proteína HSP90, como se describirá en el capítulo III. Las HSP90 citosólicas se presentan en dos isoformas, alfa y beta, las cuales constituyen el 1-2% de las proteínas totales de la célula en condiciones basales (Didelot y col., 2006). Su función más destacada es la de estabilizar y promover la activación de sus proteínas clientes, muchas de las cuales forman parte de las cascadas de transducción de señales en la célula (Richter y Buchner, 2001) y también ejercen una función en el ensamblado de las proteínas. El mecanismo por el cual la unión y la hidrólisis de ATP es fundamental para que la HSP90 ejerza su función en las proteínas clientes no ha sido totalmente establecido. Al parecer, la unión e hidrólisis del ATP produce un cambio conformacional en la proteína que es imprescindible para su función biológica (Pearl y Prodromou, 2001; Pearl y col., 2008).

La geldanamicina, un producto natural de la familia de los antibióticos antramidas, es un inhibidor específico de la HSP90 (Roe y col., 1999). Este compuesto ejerce su acción uniéndose con alta afinidad al sitio de unión del ATP, lo cual produce estabilización y degradación de las proteínas blanco mediante ubiquitinación y degradación proteasomal (Mimnaugh y col., 1996). Este inhibidor ha sido ampliamente utilizado en el campo de la oncología, y sus derivados sintéticos se encuentran involucrados en varios estudios clínicos. Sin embargo, en este trabajo la geldanamicina ha sido utilizada como una herramienta farmacológica para estudiar la función de la HSP90 en las motoneuronas y en los procesos de supervivencia y muerte neuronal.

Basándonos en las evidencias presentadas en esta introducción, en este trabajo de tesis nos proponemos demostrar que las interacciones de diferentes factores tróficos en

las motoneuronas pueden desencadenar respuestas tan dispares como la sobrevida o la muerte celular.

OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICOS

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es el de profundizar el conocimiento sobre los mecanismos moleculares y celulares que determinan la sobrevida o la muerte de las motoneuronas. Nos interesamos específicamente en este tipo celular ya que es el grupo celular afectado en la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), siendo ésta una enfermedad inhabilitante y mortal que afecta a 2 personas de cada 100.000 habitantes. Para ello nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

Capítulo I

- **Investigar la interacción entre distintos factores tróficos producidos por las motoneuronas y otras células aledañas (glia, células musculares) en la sobrevida y la muerte de la motoneurona:** Para cumplir con este objetivo, se utilizaron cultivos de motoneuronas de embriones de rata de 15 días de gestación. Los cultivos fueron expuestos a distintos factores tróficos (BDNF, GDNF, Neuregulinas) y se evaluó la sobrevida o la muerte de las motoneuronas. También se estudio el efecto producido por la combinación de dichos factores.
- **Caracterizar los mecanismos moleculares activados por los factores previamente investigados.** Se analizó la participación de las cascadas de señalización ERK1/2, JNK y PI3K/Akt en los efectos celulares producidos por los factores tróficos cuando fueron agregados a los cultivos de motoneuronas de forma individual o en combinación.

Capítulo II

- **Evaluar el rol de la nitración de las proteínas en la muerte de la motoneurona.** Para llevar a cabo este objetivo, los cultivos fueron expuestos a péptidos que contenían o no tirosina en su secuencia y luego se evaluó la sobrevivencia de las motoneuronas y se cuantificaron las proteínas nitradas presentes en los distintos tratamientos.
- **Investigar la presencia de nitración de la proteína de choque térmico HSP90 en los cultivos de motoneuronas crecidos en ausencia de factores tróficos.** Se analizó la presencia de HSP90 nitrada por la técnica de Western blotting e inmunocitoquímica, utilizando un anticuerpo desarrollado en nuestro laboratorio que sólo reconoce a dicha proteína cuando se encuentra nitrada.
- **Determinar la presencia de la proteína HSP90 nitrada en distintas etapas y distintas estructuras (médula espinal, cerebro) de los animales transgénicos SODG93A (modelo para la ELA) y en médulas espinales de pacientes de ELA.**

Capítulo III

- **Determinar la participación de la proteína HSP90 en la sobrevivencia de la motoneurona.** Abordamos este objetivo inhibiendo farmacológicamente la actividad de la proteína HSP90 utilizando un inhibidor específico.
- **Estudiar los mecanismos moleculares involucrados en la cascada de señalización de la proteína HSP90.** Se analizó la participación de la HSP90 en la activación o inhibición de diferentes cascadas de señalización relacionadas a la sobrevivencia o la muerte de la motoneurona.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales:

Los reactivos generales de cultivo de células fueron obtenidos de Gibco BRL (Grand Island, NY, USA), hoy parte de Invitrogen (San Diego, CA, USA). En general, los reactivos químicos fueron comprados en Sigma (St. Luis, MO, USA). Los anticuerpos primarios fueron obtenidos en Santa Cruz Biotechnology Inc (Santa Cruz, CA, USA), Chemicon (Temecula, CA, USA) y Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). El material de plástico necesario para los cultivos celulares fue de las firmas Greiner y Nalge (Fisher Scientific, MA, USA), mientras que los filtros de policarbonato y las membranas para la esterilización de soluciones pertenecen a Millipore Corporation (Billerica, MA, USA). Las membranas de nylon, PVDF y nitrocelulosa para Western blot fueron obtenidas de la empresa Bio Rad (Hercules, CA, USA).

Métodos:

Cultivo de Motoneuronas

Los cultivos de motoneuronas se realizaron de acuerdo a Camu y colaboradores (1993) y Henderson y col (1994) (Camu y col., 1993; Henderson y col., 1993) con algunas modificaciones (Ricart y col., 2006).

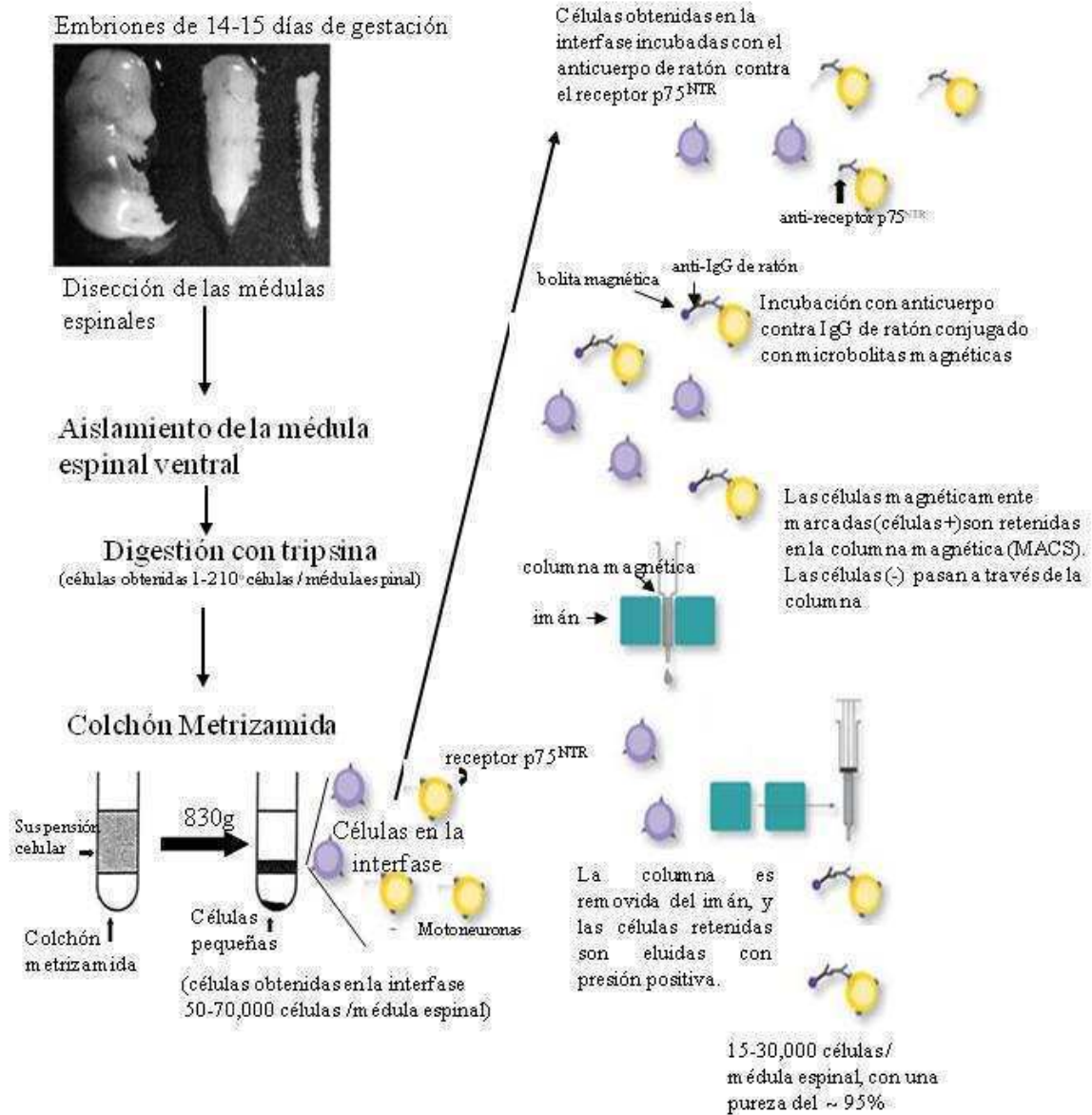


Figura M.1: Esquema del procedimiento de purificación para el cultivo de motoneuronas.

Disección de las médulas espinales: Se utilizaron ratas Sprague-Dawley preñadas de 14 o 15 días de gestación (E14-E15). Las ratas fueron sacrificadas por asfixia con alotan o dióxido de carbono (CO₂), luego se les realizó una dislocación cervical. Inmediatamente después, el útero conteniendo los embriones fue removido y colocado en

PBS bajo condiciones de esterilidad. Para una mayor conservación del tejido, hasta que se finalizó la disección, los embriones fueron colocados en medio Hybermate E (Brain Bits, Springfield, IL, USA). Cada embrión fue colocado en una placa de Petri en medio modificado Ham F10 (Invitrogen, San Diego, CA, USA) (sin: calcio, magnesio, L-glutamina o rojo fenol). Luego se procedió a la remoción de la cabeza y la cola de cada embrión. Las médulas espinales fueron disecadas introduciendo una pinza de microcirugía en el canal central de la médula por la parte anterior, luego de la extracción de la médula espinal se procedió a la remoción de las meninges y los ganglios dorsales (**Figura M.1**). Posteriormente se cortó la parte dorsal de la médula espinal con bisturí. Las médulas ventrales fueron cortadas en pequeños fragmentos y colectadas en un tubo (4 médulas por tubo) con 1 ml del medio modificado Ham F10.

Tabla M.1

Composición de L15 completo	
Medio L-15 (Invitrogen 11415-064)	76,3 ml
Glucosa (tabla 2)	5,0 ml
Penicilina-Estreptomicina (tabla 2)	1,0 ml
Progesterona (tabla 2)	0,1 ml
IPCS (mezcla) (tabla 3)	3,1 ml
Suero de caballo (tabla 2)	2,0 ml
Bicarbonato de sodio (tabla 2)	2,5 ml
Luego se corrigió el pH 7,4 y se esterilizó por filtración.	

Preparación de la suspensión celular de las médulas espinales: A los tubos conteniendo los fragmentos de las médulas espinales en Ham F10 se les agregó 10 µl de una solución de tripsina 2.5% (concentración final 0.025%) y se incubó 10 minutos en baño a 37°C con agitación frecuente. Luego de la incubación, los fragmentos fueron transferidos a un tubo con la solución A: 0,8 ml L15 completo (**Tabla M.1**); 0,1 ml 4%

BSA y 0,1 ml ADNasa (**Tabla M.2**), y luego de agitar vigorosamente se disgregó el tejido dos veces con un punta azul de pipeta automática. La suspensión se dejó decantar por 2 minutos y se trasvasó el sobrenadante a otro tubo. El tejido remanente se disgregó nuevamente con la solución B: 0,9 ml L15 completo (**Tabla M.1**); 0,1 ml 4% BSA y 20 μ l ADNanza (**Tabla M.2**), luego se disgregó pasando el tejido 8 a través de una punta azul de pipeta automática, luego de 2 minutos de decantación se trasvasó el sobrenadante que fue mezclado con el sobrenadante obtenido anteriormente. Se repitió el procedimiento una vez más. Los sobrenadantes fueron diluídos con L15 completo (**Tabla M.1**) y sembrados suavemente sobre un colchón de 1 ml de BSA al 4% (**Tabla M.2**), se centrifugó por 5 minutos a 470g a 16°C. El sobrenadante conteniendo la tripsina y los detritos celulares fue aspirado y descartado. El precipitado celular fue resuspendido en 1 ml de L15 completo al cual se le agregó 20 μ l de una solución 1 mg/ml de ADNasa (**Tabla M.2**).

Tabla M.2

Producto	Fuente (compañía)	Solución	Procedimiento
BSA	Sigma (A9418)	4% (W/V) en L15	Dializar (membrana MWCO 25.000, spectrum 132127) contra PBS por un día y luego dializar contra L15 por 2 o 3 días. Almacenar a 4° C por 1 o 2 meses.
ADNasa	Sigma (DN-25)	1 mg/ml en L15	
Glucosa	Invitrogen (15023-013)	72 mg/ml en L15	
Suero de Caballo	Invitrogen (26050-070)		
Bicarbonato de sodio	Invitrogen (25080-094)	7,5% (w/v) en agua	
Penicilina Estreptomicina	Invitrogen (15070-089)		
Progesterona		20 μ M en etanol	

Tabla M.3

Mezcla de IPCS Se almacenaron tubos conteniendo (1 ml de Insulina, 1 ml de Putrescina, 1 ml de Conalbúmina y 100 µl de selenito de sodio) a -20°C.		
Suplemento	Solución	Procedimiento
Insulina	500 µg/ml (100x)	Disolver 2,5 mg en 0,5 ml de HCl (0,1 M), agregar 4,5 ml H ₂ O
Putrescina	1 x 10 ⁻² M en PBS (100X)	
Conalbúmina	10 mg/ml en PBS (100X)	
Selenito de Sodio	3 x 10 ⁻⁵ M (1000X)	Disolver 1 mg en 19,3 de H ₂ O. Ajustar el pH a 7,4 y diluir 10 veces en H ₂ O.

Purificación de Motoneuronas por centrifugación sobre colchón de

metrizamida: El equivalente a 4 médulas espinales se sembraron en un colchón de 2 ml de metrizamida (Serva, Heidelberg, Alemania) al 6,5% preparada en L15 completo o sobre un colchón de Optiprep (Axis-Shield, Oslo, Noruega) al 6%. Se centrifugó por 15 minutos a 830g a 16°C. Una vez finalizada la centrifugación se observa un pellet en el fondo del tubo (células pequeñas) y una banda turbia en la interfase medio-metrizamida o optiprep (células grandes). Se procedió a la recolección de las células grandes con una punta azul de pipeta automática, recolectando 1ml en la interfase (**Figura M.1**). Se diluyó en 10 ml de L15 completo y se sembró nuevamente en un colchón de BSA al 4%, centrifugándose a 470g por 5 minutos, luego de la centrifugación se aspiró el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en una solución de BSA al 0.5% en L15.

Purificación de motoneuronas por inmunoafinidad utilizando el método

indirecto con microbolitas magnéticas: Se incubó 200 µl de la suspensión celular, obtenida en el paso anterior, con 200 µl de sobrenadante del cultivo de hibridoma

MC192 que contiene la IgG 192 anti-rata p75 (ver cultivo de hibridoma MC192), por 20 minutos a 10°C. Luego se lavaron las células con 10 ml de solución BSA al 0.5% en L15 y se centrifugaron en un colchón de BSA al 4% (mismas condiciones que en los pasos anteriores). Luego de descartar el sobrenadante, las células se resuspendieron en 240 μ l de la solución BSA 0.5 % en L15 y se incubaron con 60 μ l IgG de cabra anti-ratón absorbidas en micro bolitas magnéticas (MACS Miltenyi Biotec, Auburn, CA), por 15 minutos a 10°C. Se procedió al lavado y centrifugado de las células bajo las mismas condiciones anteriores. Se procedió al armado de la columna para seleccionar células con anticuerpos, siguiendo las instrucciones de la compañía (MACS Miltenyi Biotec, Headquarters, Bergisch Gladbach, Alemania). Se sembró 500 μ l de una solución BSA 0.5 % en L15 para humedecer la columna, se descartó el efluente. Luego se sembró la suspensión celular con las bolitas magnéticas (500 μ l) y se descartó el efluente (fracción negativa), se lavó la columna 3 veces con 500 μ l de la misma solución. Se removió la columna del imán y se removió la aguja que disminuye el flujo, posteriormente se aplicó 1 ml de BSA 0.5 % en L15 en la columna y se colectó el efluente (fracción positiva). Se lavó con 500 μ l aplicando una presión positiva utilizando el suplemento provisto por la compañía (**Figura M.1**). La fracción positiva se sembró en un colchón de BSA y se procedió a su centrifugación bajo las condiciones anteriores. Las células fueron resuspendidas en medio de cultivo Neurobasal completo (**Tabla M.4**) para su posterior plaqueo. Las células obtenidas son células grandes, redondas y brillantes en el contraste de fase, con una pureza en motoneuronas mayor del 95 % (ver determinación de la pureza del cultivo). Las células fueron contadas con un hemocitómetro (cámara de Neubauer), siendo el rendimiento de 15.000 a 30.000 motoneuronas por médula espinal.

Tabla M.4

Medio Neurobasal completo			
Producto	Fuente	Solución	100 ml
Medio Neurobasal	Invitrogen (21103-049)		90 ml
Suplemento B27	Invitrogen (17504-036)		500 µl
L-Glutamina	Invitrogen (25030)		500 µl
Glutamato	Invitrogen (11048)		500 µl
2-mercaptoetanol	Invitrogen (31350-010)	25mM in L15 (1000X)	500 µl
Suero de caballo inactivado por calor	Invitrogen (26050-039)		10 ml

Cultivo de Motoneuronas: Para los conteos celulares, las motoneuronas fueron sembradas a una concentración de 4.000 células/ml de medio Neurobasal completo (**Tabla M.4**) en multiplaca Nunclon de 4 posillos (Nalge) o a una concentración de 2.500 motoneuronas/ml en una multiplaca Greiner de 96 posillos (Greiner), previamente preparadas con poli-L-ornitina-laminina (ver preparación de placa de cultivo) y mantenidas a 37°C en una atmosfera 5% CO₂, 95% aire, saturada de humedad. A menos que se mencione lo contrario todos los tratamientos fueron realizados en el momento del sembrado de las células. En los experimentos en que fue necesario utilizar otra densidad celular esto se especificó en el pie de figura.

Cultivo de Hibridoma MC192: El hibridoma MC192 (Chandler y col., 1984) que produce el anticuerpo monoclonal IgG 192 contra el receptor de baja afinidad para el factor de crecimiento nervioso (p75^{NTR}) fue obtenido del Dr. C. Henderson (INSERM Unite´ 382, Developmental Biology Institute of Marseille (IBDM) Universite´ de la Mediterraneé, France, ahora en Columbia University, New York, USA). El hibridoma fue crecido en frascos de cultivo (75 cm²) en 40 ml de medio RPMI 1640, suplementado

con 15% de SFB. El medio de cultivo fue cambiado cada 2-3 días hasta que la densidad de las células aumentó al punto de tener que cambiarlo 2 veces al día. En este momento se agregó medio de cultivo hasta alcanzar los 200 ml y cuando el pH del medio comenzó a cambiar se agregaron 5 ml de glucosa (100 mM) y se dejó en la incubadora hasta que todas las células murieran. El medio de cultivo fue centrifugado a 1.500g por 10 minutos y el sobrenadante se usó como fuente del anticuerpo.

Preparación de Placas con sustratos para la siembra de las

motoneuronas: La superficie de las placas de petri fueron cubiertas con una solución acuosa de poli-L-ornitina (5 μ g/ml) (Sigma, San Luis, MO, USA), por una hora a temperatura ambiente. La solución fue removida y se lavaron las placas dos veces con agua bidestilada. Se dejó secar por al menos 2 horas. Luego, se agregó una solución de laminina (3 μ g/ml)(Invitrogen, San Luis, MO, USA) en L15 suplementado con bicarbonato de sodio (1.25 ml/50 ml de medio) y se incubó a 37°C con atmósfera de 5% CO₂ en aire saturado de humedad durante toda la noche. Se retiró el medio con la laminina inmediatamente antes de la siembra de las células.

Cultivo Primario de Neuronas de Corteza de Rata: Se emplearon embriones de rata Sprague-Dawley de 18-19 días de edad gestacional. Luego de realizar la eutanasia, se colocaron los embriones en placas de petri con solución salina de Earle's (EBSS) a 4°C. Los hemisferios cerebrales se separaron del resto del tronco encefálico, se eliminaron meninges y vasos sanguíneos. El tejido se cortó en pequeños trozos que

fueron digeridos mediante método enzimático con papaína. Se utilizó el protocolo de (Huettner y Baughman, 1986) con algunas modificaciones (Ricart y Fiszman, 2001). Los trozos de tejidos se incubaron en solución EBSS suplementado con papaína 20 U/ml, 0,5 mM de EDTA, 1 mM cisteína y 2,2 g/l de bicarbonato de sodio durante 35 minutos a 37°C, en agitación continua. Luego de la incubación, la suspensión celular fue centrifugada, se eliminó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en solución EBSS suplementado con 0,05 mg/ml de DNAsa, 0,1% de BSA y 0,1% de inhibidor de tripsina; el tejido se trituró con pipeta Pasteur de dos diámetros diferentes, obteniéndose una suspensión celular. Esta suspensión remanente fue sembrada lentamente en un tubo con solución EBSS suplementada con BSA al 1% e inhibidor de tripsina al 1%. Luego se centrifugó a 70g durante 10 minutos y el precipitado fue resuspendido en medio Neurobasal suplementado con B27 y glutamina.

Cultivo de la línea celular NSC34: La NSC34 es una línea celular híbrida producto de la fusión de células de médulas espinales de embriones de ratón (enriquecidos en motoneuronas) con células de neuroblastoma de ratón. Estas células presentan varias características de las motoneuronas como la síntesis de acetilcolina, la expresión de la enzima colina acetiltransferasa y la expresión de las tres proteínas de neurofilamentos. Las células fueron cultivadas en medio DMEM con 4 mM L-glutamina y 1% de penicilina/estreptomicina, el medio fue remplazado cada 2-3 días y la densidad en la siembra dependió de cada experimento en particular. Las células fueron diferenciadas en medio DMEM/F12 con 1% de suero de caballo suplementado con 1ng/ml NGF y 1 ng/ml BDNF.

Neuregulina Recombinante: Para la producción del fragmento recombinante del dominio común de la familia del EGF de la β -neuregulina (neuregulina- β 1 168-237, NRG- β 1) presente en la médula espinal y el músculo esquelético, se usó el vector bacterial de expresión pSLC219, que contiene el fragmento indicado bajo el control del promotor T7lac en pET28b (+) (Frohnert y col., 2003). El pSLC219 fue transfectado en células competentes de E. Coli de la cepa BL21 (DE3) y la expresión fue inducida por la administración de 1 mM de isopropyl-1thio- β -D-galactopiranosido (IPTG, 1 mM) por tres horas. Las bacterias fueron centrifugadas y lisadas por sonicación con buffer de lisis (20 mM Tris, pH 7,9, 0,5 M NaCl, 5 mM imidazol, 6 M guanidinio isotiocianato). La proteína recombinante fue retenida en una columna de níquel (nichel chelate columns). Se lavó tres veces la columna con buffer (20 mM Tris, pH7,9, 0,5 M NaCl, 60 mM imidazol) y se eluyó la proteína con buffer (20 mM Tris, pH 7,9, 0,5 M NaCl, 1 M imidazol, 8 M urea). La proteína fue renaturalizada por diálisis secuencial con buffer (10 mM Tris, pH 7,9, 100 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, 3 mM cysteine, 10% glycerol, 0.02% Tween-20) conteniendo una concentración decreciente de urea (8 M, 4 M, 2 M, 1 M, 0,5 M) por 24 horas en cada concentración. Luego se dializó con PBS conteniendo 10% glicerol. La proteína fue analizada por cromatografía líquida obteniéndose una pureza mayor al 98%. Para confirmar la actividad biológica se estudió la inducción de la fosforilación del receptor de neuregulina ErbB en células de carcinoma mamario MCF-7 y la estimulación de la proliferación de las células Schwann (Minghetti y col., 1996) luego del tratamiento con la proteína recombinante.

Determinación de la pureza del cultivo de motoneurona: Identificación de motoneuronas con anticuerpo anti Islet-1 y p75^{NTR}:

Los cultivos de motoneuronas fueron fijados después de 24 horas in vitro mediante el agregado de 1 ml de paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS directamente al medio de cultivo durante 2 minutos, sobre hielo. Luego se lavaron los cultivos con L15 a 4°C (dos veces) y se incubaron con PFA 4% en PBS sobre hielo por 15 minutos. Luego de la fijación se lavó tres veces con PBS. Las células fijadas se incubaron con una solución de lisina (50 mM) para inactivar los grupos carbonilos, y Triton X100 (0.1%) en PBS por 15 minutos, para permeabilizar las membranas. Posteriormente se bloquearon los sitios de unión inespecífica con una solución de 10% de suero de cabra (SC) en PBS, debido a que el anticuerpo secundario es preparado en cabra. Luego del bloqueo los preparados fueron incubados con el anticuerpo anti-p75^{NTR} (Chemicon, Temecula, CA, USA) o con el sobrenadante del hibridoma 2D6 anti-Islet-1 (ATCC, American Type Culture Collection, VA, USA), diluído 1:500 y 1/2 respectivamente en 5% SC, Triton X100 (0,1%) en PBS. Se incubó toda la noche en atmósfera húmeda a 4°C. La incubación con el anticuerpo primario fue finalizada con tres lavados con una solución de Triton X100 (0,1%) en PBS. El anticuerpo secundario anti-Ig de ratón conjugado con los fluorocromos CY-3 o fluoresceína (Molecular Probes, San Luis, MO, USA) fue incubado por 30 minutos a temperatura ambiente. Se volvió a lavar tres veces con PBS por 5 minutos. Para la tinción de los núcleos se incubó los preparados con una solución 1 µg/ml de DAPI en PBS por 3 minutos. Antes de montar se realizó un lavado rápido con H₂O destilada. El medio de montaje utilizado fue el Antifadant Mounting media TM (Molecular Probes-Invitrogen, Eugene, OR, USA). Luego de la tinción se contaron las células teñidas para los dos

marcadores. El número total de células fue establecido mediante el conteo de los núcleos teñidos con DAPI. El porcentaje de pureza fue calculado como células teñidas para p75^{NTR} y Islet-1 sobre número total de células por 100. Los cultivos obtenidos tuvieron una pureza mayor al 95% (**Figura M.2**).

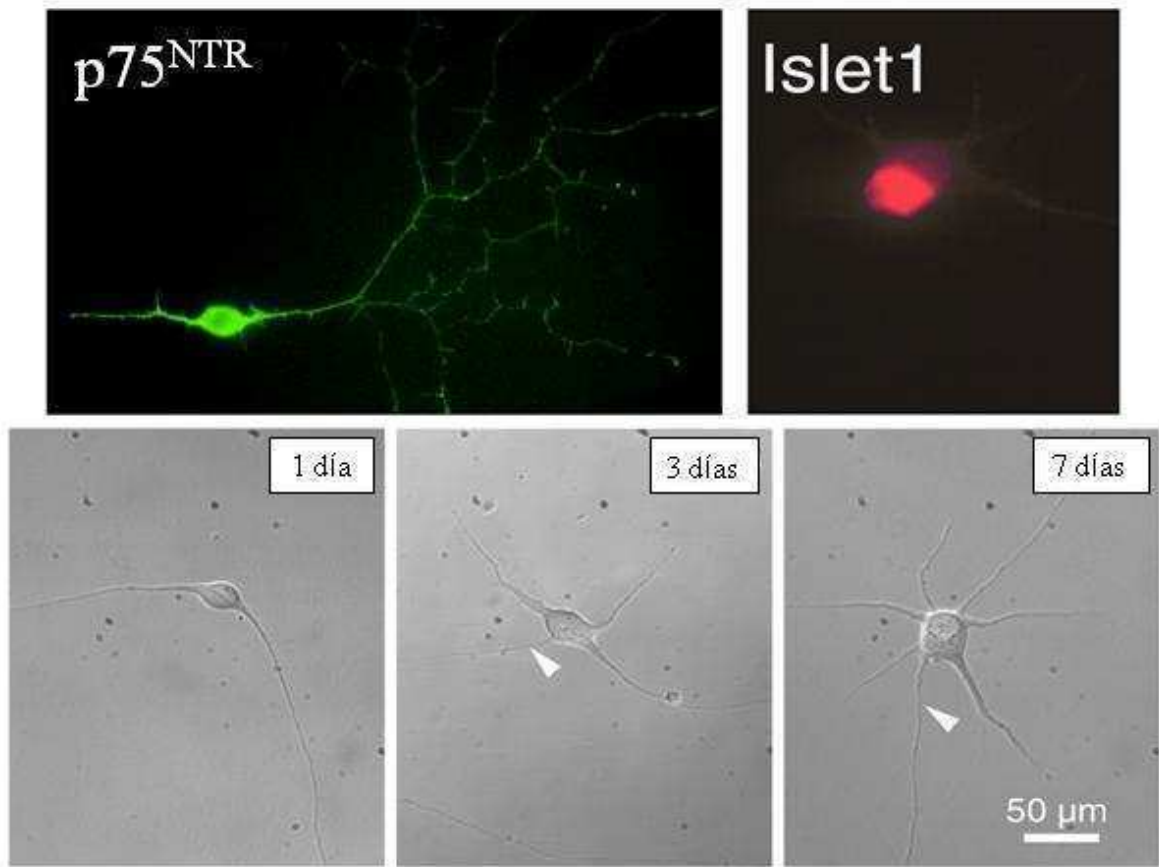


Figura M.2: Cultivo puro de motoneuronas: Inmunocitoquímica en cultivos de motoneuronas con los anticuerpos específicos para el receptor p75^{NTR} y proteína Islet-1. Contraste de fase de cultivos de motoneuronas luego de 1,3 o 7 días in vitro.

Exposición de los cultivos a los distintos tratamientos

Tratamiento con factores tróficos: Los factores tróficos fueron agregados inmediatamente después de la siembra de las células en las multiplacas, directamente al medio de cultivo. Las concentraciones utilizadas fueron BDNF 1ng/ml, GDNF 0,1ng/ml, NT3 y NT4 1 ng/ml, NGF a 50 ng/ml, carditrofina 1 (CT-1) 10 ng/ml. En el caso de la neuregulina se realizó una curva dosis respuesta determinando la concentración efectiva 50 (CL₅₀) (**Figura 1.5**), para los posteriores experimentos se utilizó una concentración de 10 nM.

Tratamiento con distintos inhibidores: Los inhibidores fueron agregados al mismo momento que los factores tróficos.

Tratamiento con péptidos: Los péptidos fueron agregados al mismo momento que las motoneuronas a la placa de cultivo, previamente incubados con un agente (Chariot) que ayuda a la penetración del péptido a la célula (Active Motif, Carlsbad, CA, USA). Brevemente, los péptidos fueron preparados en una solución 10 mM en agua, y diluidos a las concentraciones indicadas en PBS. Cincuenta μ l de péptido fueron incubados con 2 μ l de una dilución 1:10 del Chariot y 48 μ l de agua, por 30 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación, la mezcla (100 μ l) fue juntada con la suspensión celular (100 μ l) y se sembró en las placas de cultivo. Luego de 1 hora en el incubador, se agregó medio de

cultivo para alcanzar el volumen final. La viabilidad celular fue determinada luego de 24 horas (ver determinación de la viabilidad celular). El péptido RYEYA fue secuenciado a partir del estudio de las secuencias nitradas en el neurofilamento L (Crow y col., 1997b). Por otra parte, la secuencia EYTA fue elegido por poseer una carga diferente a la secuencia anteriormente mencionada. El di-péptido GY fue escogido para analizar la posible toxicidad de la nitrotirosina libre (Peluffo y col., 2004). Los di y tri homopéptidos (YY, YYY) (Sigma) fueron utilizados con el objetivo de analizar el efecto de los péptidos con más de una tirosina.

Entrega de la Superóxido Dismutasa al interior de la célula: Se prepararon liposomas conteniendo la enzima SOD1 (Estevez y col., 1999a; Estevez y col., 2000), y se agregaron a las motoneuronas que habían sido cultivados por dos días. En el momento del tratamiento se reemplazó el medio por un medio sin suero y sin glutamato, suplementado con antibióticos.

Determinación de la viabilidad celular: La viabilidad celular fue determinada por conteo directo de todas las células grandes que presentan neuritas de más de cuatro somas de diámetro en cuatro campos. El primer campo fue tomado en el centro de la placa y los otros tres fueron tomados moviéndose a la izquierda, derecha y abajo del campo inicial. Todos los conteos se realizaron por cuadruplicados en al menos tres experimentos independiente. La viabilidad celular se calcula, en la mayoría de los casos, como un porcentaje de las células respecto de la cantidad de células en los cultivos crecidos con BDNF (1 ng/ml) o en los cultivos crecidos en presencia de una combinación

de factores neurotróficos (FNT) (BDNF, 1 ng/ml; GDNF, 100 pg/ml; CT-1, 10 ng/ml). En ciertos experimentos la sobrevida se determinó usando captura de imágenes de alta velocidad usando un Flash Cytometer (Trophos, Marsella, Francia) en placas de 96 pocillos luego de teñir las motoneuronas con calceína di-acetato (2 µg/ml) por 1 h a 37°C. La calceína di-acetato es incorporada dentro de las células y una vez dentro, esterasas inespecíficas remueven los grupos acetato y el compuesto se torna polar e hidrofílico, por lo tanto las células con fluorescencia verde están vivas ya que presentan integridad de membrana. Previo a la obtención de las imágenes, se agregó hemoglobina (7.5 mg/ml) para eliminar la fluorescencia inespecífica extracelular. Las imágenes fueron analizadas usando el programa Metamorph y todas las neuronas con neuritas en cada posillo fueron contadas automáticamente una vez fijados los parámetros.

Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

(SDS-PAGE) y transferencia a membrana de nitrocelulosa o PVDF:

Se utilizó el sistema de electroforesis con minigeles de 9 cm (BioRad, Hercules, CA, USA). El gel de precorrida fue de 4% poliacrilamida, 2,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 1% SDS y el gel de separación con 10% poliacrilamida 1,5 Tris-HCl (pH 8,6), 1% SDS. El buffer utilizado para la corrida fue: 250 mM Glicina, 25 mM Tris-HCl (pH 8,6), 1% SDS. Las condiciones electroforéticas de separación de las muestras fueron 20 mA en el gel de precorrida y 25 mA en el gel de separación. La corrida se realizó a temperatura ambiente. Luego de finalizada la corrida se procedió a la transferencia de las proteínas desde el gel de poliacrilamida a la membrana de nitrocelulosa o PVDF. Se sumergió el gel, la membrana, los papeles de filtro (Whatman) y los paños absorbentes en buffer de

transferencia (25 mM Tris-HCl, 192 mM glicina, 20% metanol, 0,037% SDS) por 15 minutos y luego se procedió con el armado del dispositivo de transferencia húmeda siguiendo las instrucciones de la compañía (BioRad, Hercules, CA, USA). Se colocó el armado en la cuba de transferencia, se cargó la cuba con buffer de transferencia y se transfirió a 150 mA, por 1,5 horas. La transferencia se comprobó utilizando azul brillante de Coomassie para teñir el gel, observándose las proteínas remanentes y Rojo Ponceau (0,2 % rojo ponceau, 3% ácido tricloroacético (TCA), H₂O destilada) para teñir la membrana de nitrocelulosa.

Determinación de Proteínas por el método del ácido bicinonónico: Se utilizó una adaptación del método descrito por Smith y col (1985) utilizando un kit comercial que se basa en este principio (Smith y col., 1985) (PIERCE BCA method, Pierce, Rockford, IL, USA). Como curva de calibración se utilizó un solución de albúmina serica bovina (BSA) a concentraciones conocidas (mg/ml). Se procedió con el protocolo sugerido por la compañía. A partir de los valores obtenidos de la curva de calibración se calculó la concentración de las muestras.

Inmunoblot (Western Blot).

-Muestra de Tejido: El tejido de médula espinal y músculo de rata de 15 días de gestación fueron homogeneizados en 19 volúmenes de buffer de homogenización (20 mM HEPES (pH 7,4); 1 mM EDTA; 250 mM sacarosa; 2 µg/ml aprotinina; 10 µg/ml leupeptina y 2 mM fenilmetilsulfonilfluoride (PMSF)). La concentración de proteínas fue medida por el método del ácido bicinonónico (ver descripción previa). 45 µg de proteína

total fue corrida en un gel SDS-PAGE 4-8% y transferida a membranas de PVDF (Immobilon-P, Milipore, Bedford, MA, USA) a 30 mA toda la noche en buffer de transferencia (25 mM Tris (pH 8,3); 192 mM glycine; 20% methanol). Las membranas fueron bloqueadas en 5% leche TBS-T (20 mM Tris-HCL, pH 7,4, 150 mM NaCl, 0.05% v/v Tween 20) toda la noche a 4°C. Los anticuerpos primarios fueron incubados en 1% leche en TBS-T en las siguientes concentraciones: ErbB2 1:500; ErbB3 1:250; ErbB4 1:500, por una hora a temperatura ambiente. Luego de tres lavados, el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa de rabanito fue diluído en TBS-T (1/1.000) e incubado por 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente, se visualizaron los complejos antígeno-anticuerpo por un método de quimioluminiscencia utilizando como sustrato Super Signal West Femto (Pierce, Rockford, IL, USA).

-Cultivos celulares: En el caso de los inmunoblot para proteínas fosforiladas, las motoneuronas fueron plaqueadas a una densidad de 7000 células/cm² por 16 horas y luego fueron lisadas en Buffer de lisis (1% Triton X100, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 2 mM EGTA, 100 µg/ml leupetina, 25 mM NaF, 0,5 mM levamisole, 1 mM PMSF, 1 mM Na₃VO₄), luego de sonicar por 5 segundos se determinó la proteína total por el método del ácido bicinonínico (ver descripción previa). Se sembró 40 µg de proteína total en geles de gradiente de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE; 4-20%, Bio-Rad Hercules, CA, USA) y posteriormente las proteínas fueron transferidas electroforéticamente (14 horas, 40 V) a membranas de PVDF. Luego de una pre-incubación en buffer de bloqueo (20 mM Tris-HCL (pH 7.4), 10% leche en polvo, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20), estas membranas fueron incubadas durante toda la noche a 4°C con los siguientes anticuerpos: anti fosfo serina 473 Akt (fosfo-Akt 1/1.000);

anti-ERK1/2 en sus formas activadas, doblemente fosforiladas en Thr202/Tyr204 (fosfo-ERK1/2, 1/4.000); anti fosfo ErbB2 (1/500) en 5% albúmina serica bovina en TBS-T. Todos los anticuerpos fueron provistos por Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). Posteriormente, las membranas fueron lavadas 3 veces durante 15 minutos en buffer TBS-T y luego incubadas con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rabanita (1/10.000) (Bio Rad, Hercules, CA, USA) durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego de esta incubación, las membranas fueron nuevamente lavadas en buffer TBS-T (3 veces) durante 15 minutos. Finalmente, se visualizaron los complejos antígeno-anticuerpo por un método de quimioluminiscencia utilizando como sustrato Super Signal West Femto (Pierce, Rockford, IL, USA). Posteriormente, para un control de siembra y de expresión, los anticuerpos fueron removidos de la membranas con un buffer removedor (Restore Western Blot Stripping Buffer, Pierce) por 30 minutos a 37°C. Luego de 3 lavados con TBS-T, las membranas fueron nuevamente bloqueadas toda la noche en una solución de 10% leche en TBS-T, e incubadas en los anticuerpos correspondiente a las mismas proteínas totales sin fosforilar (Akt, ERK y Erb B2; 1:500). En todos los casos, los inmunoblots se revelaron para ser lineales en el rango utilizado para la densitometría. El análisis densitométrico de las imágenes fue realizado en un sistema de análisis de imágenes Quantity One (Bio-Rad). Para los inmunoblots de las proteínas p75^{NTR} (Chemicon, Temecula, CA), TrkA, TrkB (Santa Cruz Biotechnology) se utilizó el mismo procedimiento, solamente que los cultivos fueron crecidos por 24 horas. Para el caso de los inmunoblots de NO₂-HSP90 se utilizó el mismo protocolo anteriormente mencionado, los cultivos fueron crecidos por 24 horas y el anticuerpo utilizado fue desarrollado y caracterizado en nuestro laboratorio por el Dr Yaozu Ye

(2007). Para estos experimentos se utilizó una dilución de 1/1.000 de dicho anticuerpo incubandolo toda la noche a 4°C, posteriormente se siguió el método anteriormente descrito. Luego de finalizado el Western blot, se removió el anticuerpo (condiciones anteriores) y las membranas fueron incubadas con un anticuerpo anti-HSP90 (1/1.000) (Santa Cruz Biotechnology) para control de siembra y expresión. Estas mismas condiciones se utilizaron para los Western blot con el anticuerpo HSP70 (Upstate Biotechnology, Millipore). Los valores fueron normalizados por carga usando anticuerpos anti actina o anti GAPDH (Sigma). Para el caso de los Western blot utilizando anticuerpos secundarios fluorescentes, se utilizó un buffer de bloqueo específico: buffer de bloqueo Odyssey (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA) por 1 hora a temperatura ambiente. La incubación con el primer anticuerpo se realizó durante toda la noche a 4°C. Las membranas fueron lavadas e incubadas con los anticuerpos secundarios a (IR 680 cabra anti-conejo IgG y IR 800 cabra anti-ratón IgG (LI-COR Biosciences) a temperatura ambiente por 1 hora. Después de lavar, los anticuerpos fueron visualizados usando el sistema de captura de imágenes infrarrojas Odyssey (LI-COR Biosciences) y las bandas se cuantificaron usando un software del mismo sistema Odyssey.

Tratamiento de los cultivos con el anticuerpo neutralizante de p75^{NTR}: El anticuerpo anti p75^{NTR} (Chemicon) fue dializado contra PBS para retirar la azida del medio. Resumiendo, se le agregó 1,9 ml de PBS a 0,1 ml anti p75^{NTR} y se concentró en una columna Centricon (Millipore), lavándolo con 0,1 ml, aproximadamente. Luego de realizar este paso nuevamente, se midió el volumen y se lo ajustó a 0.1 ml para obtener la concentración inicial. El anticuerpo se utilizó en una dilución de 1/50.

Tratamiento de los cultivos con fosforotioato oligonucleótidos:

Fosforotioato oligonucleótidos fueron sintetizados por el Oligonucleotide Synthesis Core Facility de la Universidad de Alabama en Birmingham. Antisense: 5'-AGGCACGGGTCCACGTG-3' (AS1; secuencia propuesta por el Dr. B.M. Kuest, Universidad de Groningen, Holanda), 5'-AGTGGACTCGCTGCATAG-3' (AS2); sentido: 5'-CTATGCAGCGAGTCCACT-3' (SE); y sinsentido: 5'-TCTTCTTCAAGCTTTGGC-3' (SS) (Cheema y col., 1996). Los cultivos fueron crecidos en presencia de GDNF (0.1 ng/ml) y fosforotioato oligonucleotidos (15 µM), luego de 3 días el medio fue removido y reemplazado por medio completo sin glutamato. Posteriormente se agregó a los cultivos BDNF (1ng/ml) y NRG (10nM) más los fosforatioato oligonucleótidos (15 µM) correspondiente a cada tratamiento, luego de 24 horas se procedió al conteo celular.

Inmunocitoquímica: Los cultivos fueron crecidos en portaobjetos con cámaras para inmunocitoquímica (NUNC) en las condiciones y tiempo apropiado para cada experimento. Luego los cultivos fueron prefijados en una solución final de 2% de paraformaldehído (PFA) en PBS por 2 minutos, posteriormente se lavó con PBS Ca/Mg (dos veces) y se procedió al fijado en una solución 4% PFA (4% PFA, 0.1% glutaraldehído en PBS) por 20 minutos en hielo. Luego se lavó con PBS (3 veces) por 5 minutos. La permeabilización de la membrana se realizó incubando los cultivos por 30 minutos en una solución permeabilizante (100 mM lisina, 0.1% Triton X100 en PBS) a

temperatura ambiente. Luego los cultivos fueron bloqueados por una hora en una solución bloqueante (10% suero de cabra, 0,1% Triton X100 en PBS). Para el caso de la triple marcación, los cultivos fueron coincubados con los anticuerpos policlonales de conejo para ErbB2 (1/100; Santa Cruz Biotechnology), ErbB3 (1/200; Transduction Laboratories, Lexington, KY) o ErbB4 (1/200; Santa Cruz Biotechnology). El anticuerpo de conejo utilizado para la enzima óxido nítrico sintasa (nNOS) fue de Cayman Chemical (Ann Harbor, MI) y se utilizó a una dilución de 1/400. Para inmunofluorescencia de la proteína fosforilada Akt (p-Akt) se utilizó el mismo procedimiento añadiendo 20 mM de ortovanadato de sodio a las soluciones de fijación y de lavado. El anticuerpo policlonal de conejo para p-Akt (Cell Signaling) se utilizó a una dilución de 1/50. Para el caso de la tinción de nitrotirosina se utilizó un anticuerpo desarrollado previamente en el laboratorio del Dr Beckman (Viera y col., 1999; Ye y col., 1996) en una dilución 1/500. Todos los anticuerpos primarios fueron incubados en solución de bloqueo a 4°C toda la noche. Luego de 5 lavados con PBS a temperatura ambiente, los cultivos fueron incubados con los respectivos anticuerpos secundarios (IgG anti conejo conjugado con el fluoróforo Cy-3 (1:100), anti-conejo conjugado con el fluoróforo fluoresceína FITC (1:100); Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, PA) en un solución de PBS con 10% suero de cabra, por 30 minutos en oscuridad. Luego los preparados fueron lavados (3 veces) y se incubaron por 15 minutos con una solución en PBS de DAPI 1 µg/ml (Sigma) para teñir los núcleos, luego de los lavados (3X) con PBS y un lavado con agua destilada se procedió al montaje utilizando el medio de montaje Antifade (Molecular Probe, San Luis, MO, USA)

Inmunohistoquímica: Ratas Sprague-Dawley macho adultas (250-300 g) (Harlan, Indianapolis, IN) fueron mantenidas a una temperatura y humedad constante, manteniendo un ciclo de luz/ oscuridad de 12/12 horas. Los protocolos de experimentación fueron aprobados por el comité de cuidado de animales de la Universidad de Alabama en Birmingham.

Las ratas fueron anestesiadas por inhalación con éter y los tejidos fueron fijados por perfusión transcardíaca con 4% PFA en PBS. Las médulas espinales fueron disecadas y fijadas adicionalmente con 4% PFA, toda la noche a 4°C. Luego fueron lavadas con PBS por 15 minutos y deshidratadas en un gradiente de alcohol y xileno. Posteriormente, los tejidos fueron incluidos en parafina. Los tejidos fueron cortados en secciones de 8 µm de espesor y montados en portaobjetos SuperFrost Plus (Fisher Scientific, Atlanta, GA, USA). Las secciones fueron desparafinadas en xileno y re-hidratadas en un gradiente de alcohol. Se bloqueó la unión inespecífica con una solución bloqueante TNB (1 M Tris-HCl, 0,15 M NaCl, 5%; pH 7,5) (Renaissance TSA-Indirect kit, NEN Life Science Products, Boston, MA, USA). Luego las secciones fueron incubadas en anticuerpo primario en las siguientes diluciones en TNB toda la noche a 4°C: anticuerpos policlonales de conejo para erbB2 1/100; erbB3 1/500; and erbB4 1/200 (Santa Cruz Biotechnology); anticuerpo monoclonal en ratón p75^{NRT} 1/200 (obtenido del sobrenadante del hibridoma MC192 , IgG 192), el anticuerpo para la enzima colina acetiltransferasa (CAT) obtenido en cabra (1/200) (Chemicon International Inc, Temecula, CA, USA). Luego las secciones fueron lavadas (3 veces) con PBS conteniendo 0,05% Tween-20 (PBS/Tween) e incubadas con los anticuerpos secundarios a temperatura ambiente por 2 horas (anti-conejo conjugado con el fluoróforo rodamina

(1/100), anti-ratón conjugado con el fluoróforo fluoresceína (1/100) y anti-cabra conjugado con el fluoróforo Cy5 (1/100). Luego de 3 lavados con PBS/Tween, las secciones fueron montadas en 1/2 PBS/Glicerol con un cubreobjeto. Para adquirir las imágenes se utilizó un microscopio confocal Leica (Leica Microsystems, Bannockburn, IL) con láseres de Argon (488 nm), HeNe-Green (544 nm) y láser de UV.

RT- PCR: Para los cultivos celulares, el ARN total de 50.000 motoneuronas fue extraído con Trizol (Invitrogen, Rochville, MD) de acuerdo al protocolo del fabricante. Brevemente, las células fueron lisadas en 0,5 ml de Trizol por 5 minutos a temperatura ambiente y se les agregó una solución de cloroformo. Luego de una agitación vigorosa se incubó los lisados por 3 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12.000g por 15 minutos a 4°C. Posteriormente, se procedió a la recolección de la fase acuosa que contiene el ARN. Luego se procedió a la precipitación del ARN con una solución de isopropanol, incubando la muestra por 10 minutos y se centrifugó a 12.000g por 15 minutos a 4°C, inmediatamente después se descartó el sobrenadante y se lavó el ARN precipitado con una solución 75% etanol, seguido por una centrifugación a 7.500g por 5 minutos a 4°C. Se dejó evaporar los restos de etanol y el ARN extraído fue resuspendido en 20 µL de agua libre de RNasas. 10 µl del ARN total fue transcrito de forma reversa utilizando un kit RT-PCR (Retroscript, Ambion, Austin, TX, USA) y cebadores al azar. Para testear si había contaminaciones con ADN genómico, se utilizó el volumen restante de ARN en las mismas condiciones pero sin agregar transcriptasa reversa. El ADNc resultante fue amplificado con Taq PCR master mix kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). Los cebadores utilizados para la amplificación del ADNc de la proteína nNOS fueron:

sentido (5'-GAATACCAGCCTGATCCATGGAA-3'), anti-sentido (5'-TCCTCCAGGAGGGTGTCCACCGCATG-3') (Shaul y col., 1995). Para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), los cebadores fueron: sentido (5'-ATTCTACCCACGGCAAAGTTCAATGG-3') anti-sentido (5'-AGGGGGCGGATGATGACCC-3'). La GAPDH se utilizó para normalizar el nivel de ARN. Se realizaron 35 ciclos de 94°C por 1 minuto., 55°C por 1 minuto., y 72°C por 1 minuto. Los productos de la amplificación fueron separados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1,8% conteniendo 5 µg/µl de bromuro de etidio, durante 1 hora. Las bandas fueron visualizadas en un transiluminador UV (Biorad, Hercules, CA). Para el estudio de la expresión de Fas-L y el receptor Fas se utilizó una mezcla comercial (TaqMan Fast Universal PCR Mix) y unas sondas fluorescentes para el Fas-L, el receptor Fas, GAPDH y β-actina (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

En el caso de los tejidos de médula espinal y músculo de embriones de 15 días de gestación se extrajo el ARN con trizol en las mismas condiciones antes mencionadas. Se utilizaron oligo-dT para producir el ADNc. 2µl del ADNc extraído fue utilizado para realizar PCR. Los cebadores utilizados fueron: ErbB2: sentido (5'-CCTGGAGCCCTCGGAAGAAG-3'), anti-sentido (5'-GTTCAGCCTCAGCCTCCTTTAA-3'); ErbB3: sentido (5'-TAGAGAAGGGGGAGCGGTTGG-3'), anti-sentido (5'-CATCAGAGTCATCAGAGGGGAT-3'); ErbB4: sentido (5'-TGGTCCCTCAGGCTTTCAACATC-3'), anti-sentido (5'-CGAGGATGAGTATGTGAATGAGCCA-3'). Se realizaron 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, y 72°C por 1 minuto. Los productos de la amplificación

fueron separados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1,8% conteniendo 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de bromuro de etidio, durante 1 hora. Las bandas fueron visualizadas en un transiluminador UV (Biorad, Hercules, CA) y cuantificadas con el programa BioRad.

Dot-Blot: Se sembraron 30.000 motoneuronas por placa de 35 mm y luego de 24 horas fueron lisadas en buffer de lisis (ver Western blot). Se midió la proteína por el método del ácido bicinconínico y se sembró cantidades iguales de proteínas de cada muestra en un membrana de nitrocelulosa previamente hidratada en buffer TBS utilizando un aparato de microfiltrado Bio-Blot (Bio-Rad). Se sembraron cantidades conocidas de albumina nitrada para construir la curva estándar, medidas en espectrofotómetro (Gow y col., 1998). Luego de transferir las muestras y los estándares a la nitrocelulosa, se removió el vacío. Se lavó dos veces con buffer TBS-T y luego se removió la membrana del aparato de microfiltrado. Se bloqueó la membrana con 10% leche TBS-T a 4°C toda la noche, luego se incubó la membrana con un anticuerpo anti-nitrotirosina desarrollado en el laboratorio del Dr. Beckman por el Dr. Yaozu Ye (ver Western blot) en una dilución de 1/500 a 4°C toda la noche, luego de lavar (3 veces) con TBS-T, se incubó la membrana con un anticuerpo anti-rabbit-HRP (1/10.000) (Pierce) en 3% leche TBS-T por una hora a temperatura ambiente. Luego de lavar (3 veces) se procedió al revelado en una solución reveladora Super Signal West Femto (Pierce).

Purificación de la proteína HSP-90 de hígado de rata: 200 gramos de hígado de rata fueron disecados y homogenizados utilizando buffer de homogenización (50 mM Tris, 0,25 mM sacarosa, 25 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 3,3 mM CaCl_2 , 0,5 mM PMSF; pH

7,4) utilizando un homogenizador Elvehjem-Potter (GenScript, Piscataway, NJ, USA) . El homogenato fue centrifugado a 1.500g a 4°C por 15 minutos. El sobrenadante fue centrifugado a 10.000g a 4°C por 1 hora, luego se removió la grasa flotante y el sobrenadante fue dializado contra buffer de diálisis (50 mM Tris, 2,5 mM MgCl₂, 2,5 mM KH₂PO₄, 25 mM KCl, 2 mM DTT, 0,5 mM PMSF; pH 7,4). Luego de la diálisis, el sobrenadante fue centrifugado a 95.000g a 4°C por 14 horas y se removió la grasa flotante. El sobrenadante (citosol) fue filtrado con filtro de 0.45 µm. La fracción citosólica fue sembrada en una columna de intercambio iónico (Q Sepharose Fast Flow Amersham Biosciences 17-0510-01, XK16/40), unida a un sistema de cromatografía BioLogic LP Chromatography system (Bio-Rad). La columna fue equilibrada con buffer A (25 mM Tris, 1,25 mM MgCl₂, 1,25 mM KH₂PO₄, 12,5 mM KCl; pH 7,4). Luego de lavar la columna con 75% de buffer A y 25% de buffer B (25 mM Tris, 1,25 mM MgCl₂, 1,25 mM KH₂PO₄, 12,5 mM KCl, 1 M NaCl; pH 7,4), las proteínas absorbidas fueron eluidas con un gradiente lineal de 25% a 100% de buffer B. Las fracciones fueron colectadas y analizadas por SDS-PAGE. Las fracciones que contenían las concentraciones más altas de HSP90 fueron juntas y dializadas contra buffer de diálisis (pH 6,8). El conjunto de las fracciones fue sembrado en columna de hidroxapatita (BIO-RAD) que fue equilibrada con 10 mM KH₂PO₄ (pH 6,8). Luego de ser lavadas con 10 mM KH₂PO₄ (pH 6,8), las proteínas fueron eluidas con un gradiente lineal de 10-400 mM KH₂PO₄ (pH 6,8). Las fracciones fueron colectadas y analizadas en SDS-PAGE. Las fracciones que presentaron mayor concentración de HSP90 fueron juntas y dializadas contra buffer de diálisis (pH 7,4). La concentración de proteína fue ajustada a 5 mg/ml utilizando Centricon Plus-20 (Millipore). La HSP90 fue purificada por filtración de gel

utilizando una columna Superdex 200 HiLoad 16/60 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). La columna fue equilibrada con el buffer C (50 mM Tris, 2,5 mM MgCl₂, 150 mM KCl, 1, 25 mM KH₂PO₄; pH 7,4), las fracciones fueron colectadas y analizadas en SDS-PAGE (**Figura M.3**).

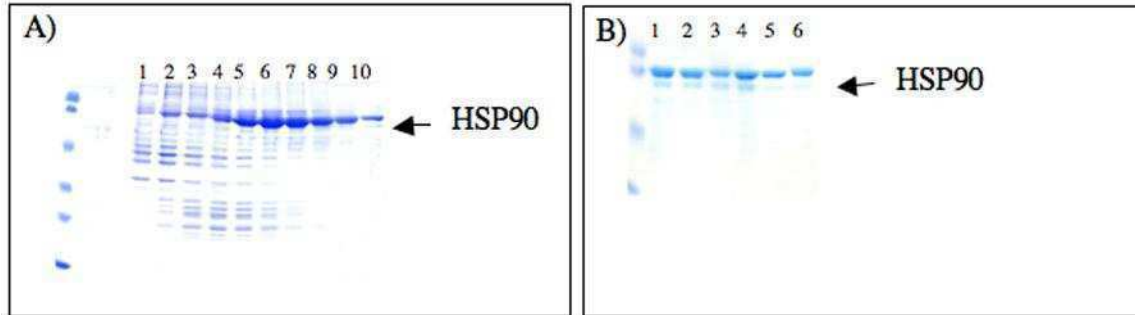


Figura M.3: Purificación de la HSP90 de hígado de rata. (A) Fracciones de la columna de Superdex 200. Los números indican las fracciones colectadas. (B) Comparación de la pureza de la HSP90. Líneas 1-2: HSP90 (Sigma), líneas 3-5: purificadas en el laboratorio.

Actividad ATPasa de la proteína HSP90: La actividad ATPasa se midió basandonos en el método de mediciones acopladas en multiplacas de 96 (**Figura M.4**) (Avila y col., 2006). Resumiendo, las mediciones fueron realizadas en un buffer A (100 mM Tris, 20 mM KCl, 6 mM MgCl₂, pH 7,4). El rojo de Amplex® (Invitrogen) fue diluido en DMSO a una concentración final de 10 mM. La maltosa fosforilasa, la maltosa, la glucosa oxidasa y la peroxidosa de rabanito (HRP) fueron diluídas en un buffer B (100 mM Tris-HCl, pH 7,5) a concentraciones de 200 U/mL, 40 mM, 200 U/mL y 100 U/mL, respectivamente. HSP90 (ver purificación HSP90) fue descongelada en hielo, y dilueída en buffer A a una concentración de 250 ng/μL. Las mediciones se

realizaron en 3 μl de buffer A, agregándole 25 μL de la proteína HSP90 y 50 μL de la solución de trabajo previamente mezclada. Solución de trabajo: 2 U/mL glucosa oxidasa, 4 U/mL maltosa fosforilasa, 0,4 mM maltosa, 100 μM de rojo de Amplex®, 0,4 U/mL HRP preparados en buffer B. En el momento previo a la medición se agregó 20 μl de ATP que fue previamente diluído en buffer A a una concentración de 2,5 mM. Se homogenizó la preparación con pipeta y se incubó por 3 horas a 37°C. La absorbancia fue medida a 563 nm. A la última fila de la multiplaca no se le agregó la solución de trabajo para determinar la absorbancia basal. Los datos reportados corresponden al promedio de al menos 3 determinaciones independientes realizadas por triplicado.

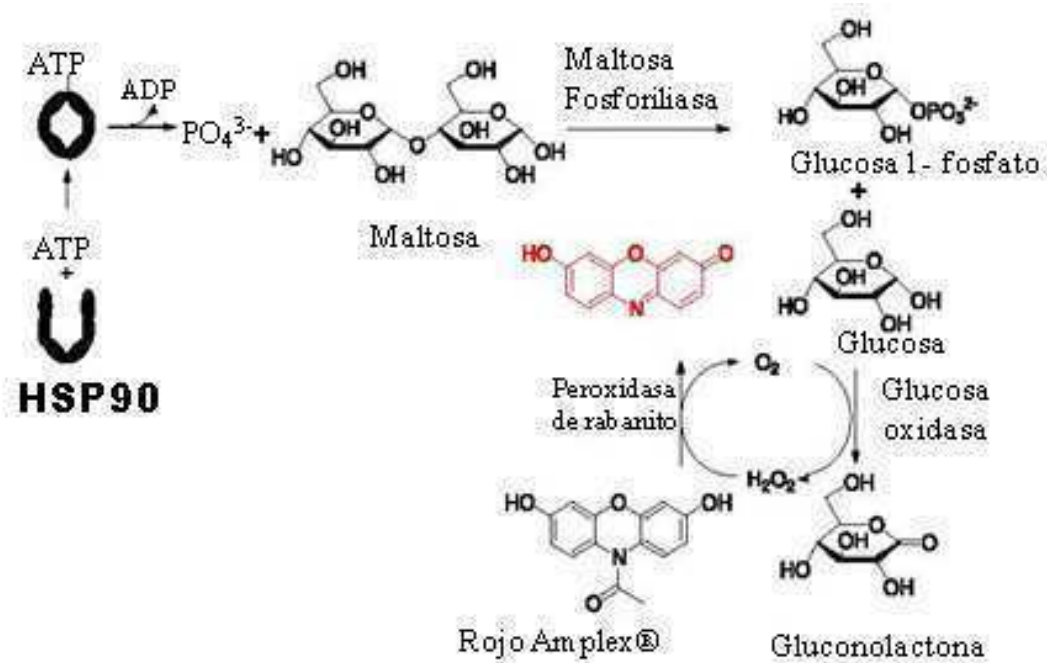


Figura M.4: Actividad ATPasa de la proteína HSP90. Método de mediciones acopladas.

Estudio de cinética de descomposición del peroxinitrito y formación de

nitrotirosina y nitrotriptofano: Estudios cinéticos: La cinética de descomposición

de peroxinitrito (a 302 nm, $\epsilon_{302}=1670 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) así como la formación de nitrotirosina (a 430 nm, $\epsilon_{430}=4400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y nitrotriptofano (a 400 nm, $\epsilon_{400}=5200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) fueron determinados por medio del uso de un espectrofotómetro de flujo detenido (Applied Photophysics, SF1.7MV, Leatherhead, UK) (Radi, 1996a). Las reacciones se realizaron en buffer fosfato (100 mM Na_3PO_4 , 100 μM DTPA; pH 7,4) a 37°C. Las curvas cinéticas obtenidas fueron ajustadas a una reacción de pseudo primer orden usando el programa provisto con el instrumento a fin de determinar la constante cinética de primer orden (definida como $k^{\text{obs}} \text{ s}^{-1}$). Un registro típico del instrumento consiste en 400 puntos de absorbancia en un período comprendido entre 0.1 y 10 segundos durante los cuales más del 99.9% del peroxinitrito se descompone. Los datos reportados corresponden al promedio de al menos 7 determinaciones cinéticas independientes. Los cambios espectrales en función del tiempo fueron registrados utilizando un rearrreglo de diodos de alta velocidad de respuesta (Applied Photophysics, Leatherhead, UK) acoplados al espectrofotómetro de flujo detenido. La concentración de nitrotirosina en los experimentos cinéticos se calculó usando un coeficiente de extinción molar (ϵ) a 430 nm del ión fenolato ($4400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Crow y Ischiropoulos, 1996) y la constante de ionización el pKa del fenol (pKa=7,5). Los rendimientos de la reacción de nitración fueron calculados a partir de la concentración inicial de peroxinitrito. La nitración de los péptidos fue estudiada en una buffer de fosfato: (200mM Na_2PO_4 , 100uM DTPA) a temperatura ambiente, y el rendimiento de nitrotirosina ($\epsilon_{430}=4400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) se determinó midiendo la absorbancia a 430 nm a pH 10 y sustrayéndole el valor obtenido a pH 4

(Crow y Ischiropoulos, 1996). La formación de nitrotriptofano ($\epsilon_{400}=5200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) se midió a 400 nm (Crow y Ischiropoulos, 1996). Todos los buffers que contenían bicarbonato fueron preparados inmediatamente antes de su utilización en los experimentos, para minimizar los cambios en la concentración del mismo debido a difusión y eliminación del dióxido de carbono hacia la atmósfera.

Análisis estadístico de los datos: En la mayoría parte de los datos se realizaron testeos paramétricos luego de practicar ensayos de normalidad y homocedacia de la varianza con el fin de confirmar los requerimientos estadísticos. Las diferencias significativas entre grupos fueron determinadas mediante el análisis de la varianza de un factor (ANOVA) de una vía, seguidas por el test de comparaciones múltiples de Bonferroni. En los casos en que las condiciones de homogeneidad de varianzas no se cumplían, se utilizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido del test de Mann-Whitney. Las curvas de concentración fueron ajustadas a una curva sigmoidea sin requerimientos previos. Todos los testeos fueron realizados utilizando el programa Prism (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA)

En todas las comparaciones, $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

CAPÍTULO I

Interacción de la neuregulina y las neurotrofinas en la sobrevida de las motoneuronas

Resultados

Desde hace más de dos décadas, el estudio de los factores neurotróficos han sido relacionados con la ELA; sin embargo, no existen estudios concluyentes sobre la participación de éstos en la fisiopatología de la enfermedad, ni sobre su posible eficacia terapéutica. El objetivo de este capítulo es el estudio de los mecanismos moleculares que estimulan a distintos factores tróficos a activar una señal de muerte o producir una señal de supervivencia. Estos conocimientos se podrían extrapolar al contexto de las enfermedades de la motoneurona. Basándonos en la hipótesis de que combinaciones o desequilibrios entre factores suministrados por el músculo u otras células podrían afectar la supervivencia o la muerte de la motoneurona, estudiamos la familia de las neuregulinas. Estas cumplen un rol importante en el desarrollo del sistema nervioso y en la formación de la placa neuromuscular (ver Introducción); pero interesantemente, no existen estudios sobre el rol de las neuregulinas en el contexto de la supervivencia de la motoneurona.

Asimismo, nos pareció importante estudiar la interacción de las neuregulinas con otros factores neurotróficos que coexisten durante el desarrollo y la etapa madura.

Llamativamente, Loeb y Fischbach (1997) observaron que los factores neurotróficos, especialmente BDNF, aumentan la expresión de las neuregulinas en cultivos de médula espinal disociada, así como también en las médulas espinales ventrales expuestas a BDNF (Loeb y Fischbach, 1997). Otra observación muy interesante es que las neuregulinas se expresan durante la muerte celular programada de las motoneuronas que ocurre durante el desarrollo (Corfas y col., 1995).

Debido a que no se conoce si las motoneuronas espinales de rata en estado embrionario expresan los receptores de neuregulinas, decidimos investigar la expresión de los receptores ErbB2, ErbB3 y ErbB4 de las neuregulinas en médulas espinales de embriones de rata.

1- Estudio de la expresión de los receptores de neuregulinas (receptores ErbB) en la médula espinal de rata

La expresión de los receptores de neuregulinas (receptores ErbB tirosina kinasa) fue estudiada en la médula espinal de rata de 15 días (E15) de edad gestacional, en la cual ocurre la muerte celular programada de las motoneuronas (Oppenheim, 1991). Además, esta edad gestacional coincide con la edad gestacional utilizada para realizar los cultivos primarios de motoneurona.

Como se puede observar en la **Figura 1.1A**, la médula espinal de rata E15 expresa una proteína de 185 kDa correspondiente a los receptores ErbB2, ErbB3, ErbB4, ya que los tres anticuerpos específicos utilizados para los respectivos receptores detectaron una proteína del correcto peso molecular. La presencia de ErbB en el músculo fue analizada

como control positivo (**Figura 1.1A**). Para corroborar la existencia de dichos receptores y determinar en qué tipo celular en la médula espinal se expresan, se utilizó la técnica de inmunohistoquímica en cortes de asta ventral de médula espinal de rata E15. Las imágenes obtenidas por microscopía confocal demuestran la inmunoreactividad para los receptores ErbB (rodamina, rojo) así como también inmunoreactividad para el receptor p75 de las neurotrofinas (p75^{NTR}, FITC, verde), y para la enzima colina acetiltransferasa (CAT, Cy5, azul). Estos dos últimos marcadores sólo son expresados por las motoneuronas en esta edad embrionaria (McManaman y col., 1990; Yan y Johnson, 1988) (**Figura 1.1B**). La co-localización de los receptores ErbB y los marcadores de motoneuronas (p75^{NTR}, CAT), sugieren que los receptores ErbB se expresan únicamente en las motoneuronas y no en otros tipos celulares presentes en la médula ventral. Los resultados histológicos y de Western blot fueron confirmados por medio del análisis de la presencia de los ARN mensajeros para los mismos receptores en las médulas espinales de rata E15 por la técnica de transcripción reversa (RT), seguida por la amplificación de fragmentos específicos correspondientes al dominio autofosforilable de cada receptor ErbB por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los fragmentos amplificados fueron separados por electroforesis en gel de agarosa y luego de la tinción del gel con bromuro de etidio, se observó un fragmento del tamaño correspondiente a los receptores ErbB (ErbB2: 269bp; ErbB3: 319bp; ErbB4: 284bp) (**Figura 1.1C**). Estos resultados indican que el ARN mensajero para los genes de los receptores ErbB está presente en la médula espinal en la edad gestacional donde se observa la mayor muerte celular programada de las motoneuronas durante el desarrollo.

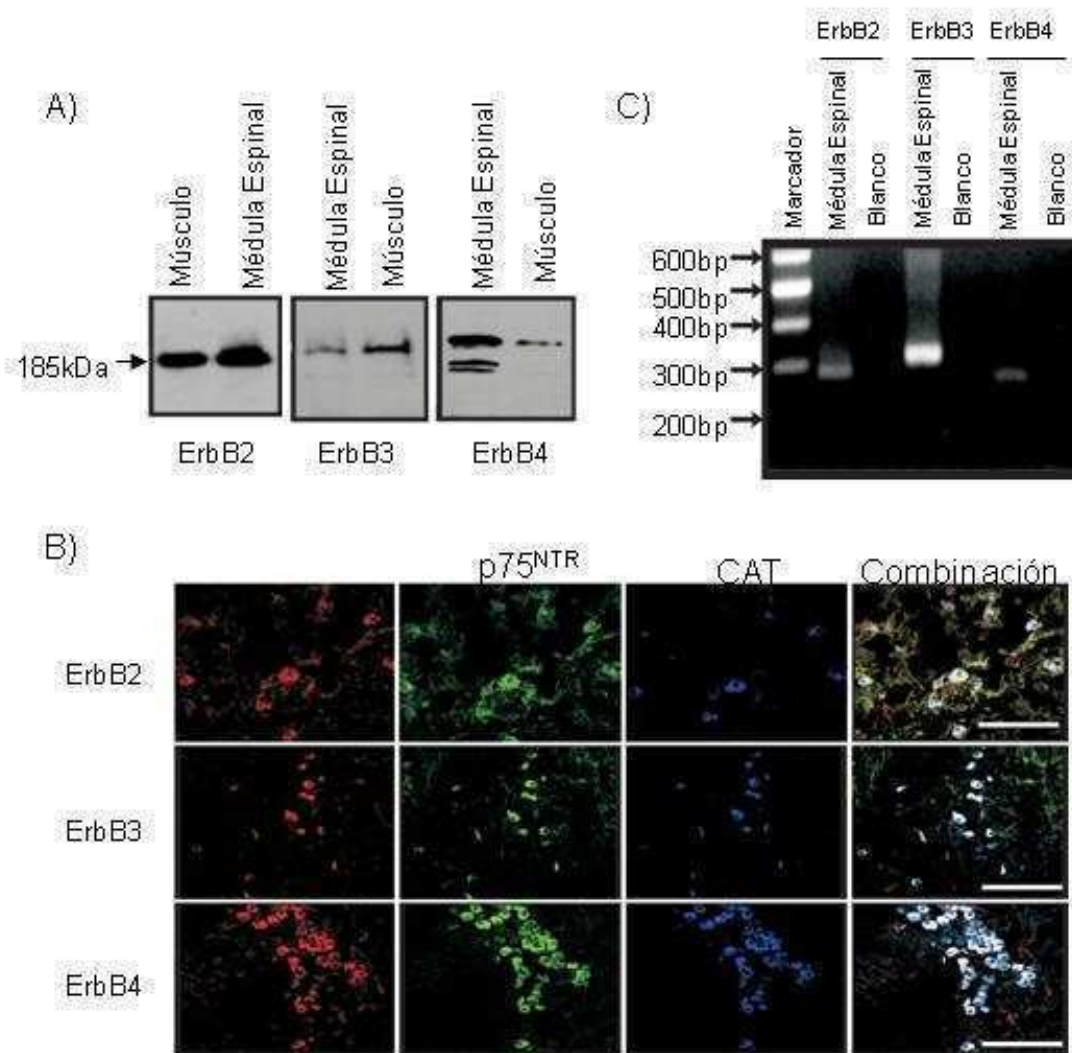


Figura 1.1: Expresión de los receptores ErbB en la médula espinal de ratas E15. (A) Lisados de médula espinal ventral o músculo de ratas E15 fueron analizados por el método de Western blots con los anticuerpos específicos para el dominio autofosforilable (carboxilo terminal) de los receptores ErbB2, Erb3, ErbB4. (B) Inmunohistoquímica de las médulas espinales de rata E15 para los receptores ErbB fueron analizadas con microscopio confocal. Para los receptores ErbB se utilizó un anticuerpo secundario conjugado con el fluoróforo rodamina (rojo), para el receptor p75^{NTR} se utilizó un anticuerpo secundario conjugado con fluoresceína (verde) y para la proteína CAT se utilizó un anticuerpo secundario conjugado con el fluoróforo Cy5 (azul). Imágenes superpuestas (combinación) para las tres tinciones muestran la co-localización en blanco de los tres fluoróforos combinados. No se detectó señal cuando la inmunohistoquímica se realizó en ausencia de anticuerpo primario. Las imágenes fueron adquiridas a 630X de magnificación. (C) Se analizó la expresión del ARN mensajero para los receptores ErbB por el método RT-PCR con cebadores específicos para cada receptor en las médulas espinales y músculo de ratas E15. Los fragmentos obtenidos ErbB2 (268bp), ErbB3 (319bp), ErbB4 (284bp) coinciden con lo previsto. Agua autoclavada se utilizó como control negativo en la reacción (blanco).

2- Estudio de la expresión de los receptores ErbB en los cultivos de motoneuronas

Para determinar si los receptores de ErbB se siguen expresando en las motoneuronas luego de ser cultivadas, se utilizó la técnica de inmunocitoquímica. Las motoneuronas de rata E15 fueron cultivadas en presencia de BDNF, y luego de 24 horas fueron fijadas e incubadas con anticuerpos específicos para cada receptor. Observamos que las motoneuronas en cultivo expresan los tres tipos de receptores ErbB en diferentes proporciones (**Figura 1.2, A y B**). Todas las motoneuronas fueron positivas solamente para el receptor ErbB3 y por el contrario, sólo una subpoblación de motoneuronas fue positiva para los receptores ErbB2 y ErbB4. El análisis cuantitativo de dicha marcación mostró que el $98\pm 5\%$ de las motoneuronas en cultivo expresa el receptor ErbB3, mientras que sólo un $52\pm 7\%$ expresa el receptor ErbB2 y un $37\pm 9\%$ de las motoneuronas expresa el receptor ErbB4 (n=3, **Figura 1.2B**). Estos resultados demuestran que los receptores de ErbB no sólo están presentes en la médula espinal de rata, sino que también se expresan en las motoneuronas en cultivo.

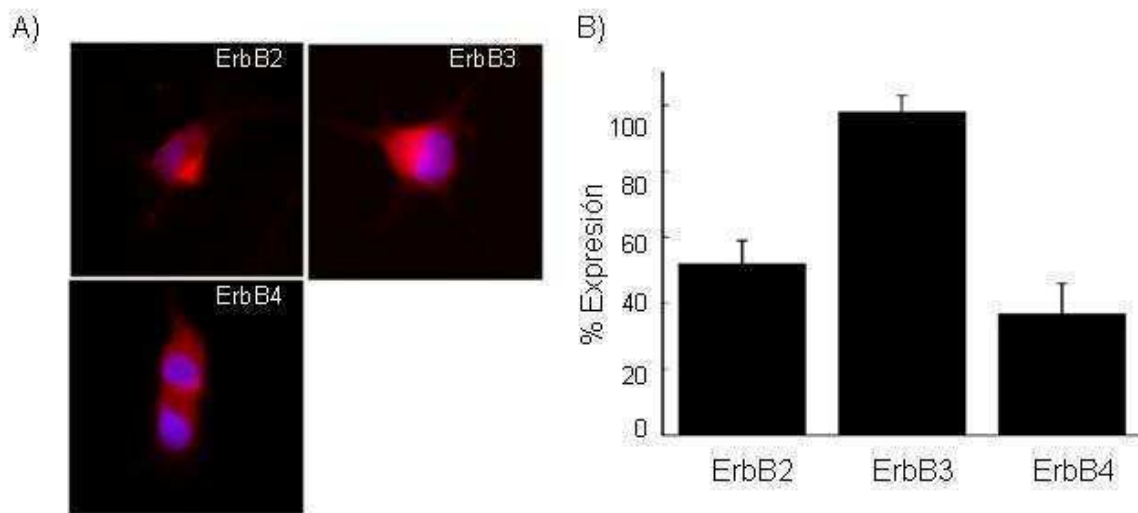


Figura 1.2: Las motoneuronas en cultivo expresan los receptores ErbB. Las motoneuronas de médula espinal de rata E15 fueron cultivadas en presencia de 1 ng/ml BDNF por 24 hs. Los cultivos fueron fijados y se le realizó una inmunocitoquímica para los receptores ErbB2, ErbB3, ErbB4. **(A)** Imagen confocal de motoneuronas en cultivo expresando los distintos receptores, los cuales fueron detectados con anticuerpos específicos por la técnica de inmunocitoquímica utilizando de fluoróforo rodamina en el anticuerpo secundario. **(B)** Cuantificación de las motoneuronas positivas para cada uno de los receptores. La expresión fue calculada como porcentaje de las células positivas para cada receptor con respecto a las células totales en un área de 1 cm². Las barras representan la media \pm DS, de tres experimentos independientes realizados por duplicado.

3- Efecto del dominio EGF de la neuregulina β 1 en cultivos primarios de motoneuronas

Las motoneuronas cultivadas en ausencia de factores tróficos mueren rápidamente por apoptosis (Milligan y col., 1995; Pennica y col., 1996). La sobrevivencia de las motoneuronas depende de la continua presencia de factores tróficos tanto in vivo como en cultivo

(Arakawa y col., 1990; Henderson y col., 1993; Hughes y col., 1993; Oppenheim, 1996).

A fin de determinar si la activación de los receptores ErbB afecta la sobrevivencia de las motoneuronas en cultivo, se utilizó un péptido recombinante que codifica para el dominio EGF de la neuregulina $\beta 1$ (NRG- $\beta 1$). Este dominio, común a todos los miembros de esta familia de factores tróficos, tiene la capacidad de activar a los receptores e imitar los efectos de la neuregulina (ver Introducción).

El efecto de la NRG- $\beta 1$ (10 nM) comparado con el efecto del BDNF (1 ng/ml) sobre la sobrevivencia de las motoneuronas mantenidas en cultivo por 24 horas fue indistinguible. Esta protección contra la apoptosis espontánea (sin factores tróficos) se prolonga hasta los 10 días en cultivo, momento en el cual la sobrevivencia de los cultivos tratados con NRG- $\beta 1$ disminuye hasta alcanzar los valores observados en los cultivos sin factores tróficos (**Figura 1.3**). En contraste, el BDNF permite la sobrevivencia de aproximadamente un 80% de las motoneuronas a los 10 días en cultivo (**Figura 1.3**), mostrando un efecto a más largo plazo como fue previamente publicado (Camu y col., 1993; Estevez y col., 1998a; Henderson y col., 1993). Estos resultados indican un efecto trófico a corto plazo de la neuregulina en los cultivos de motoneuronas.

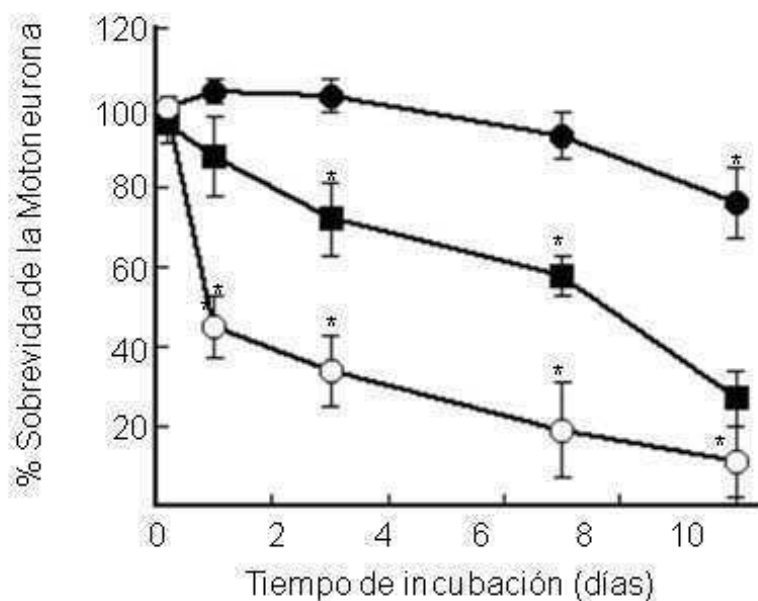


Figura 1.3: La NRG-β1 incrementa la sobrevivencia de las motoneuronas en cultivo. Los cultivos fueron crecidos en medio sin factores (○), o en medio suplementado con 1 ng/ml de BDNF (●), o con 10 nM de NRG-β1 (■). La sobrevivencia fue determinada a los tiempos indicados. Los resultados fueron expresados como porcentaje de las células presentes en los cultivos suplementados con BDNF luego de 2 horas de plaqueo. Los valores graficados representan la media ± DS de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicados. Los datos fueron analizados con el test ANOVA y posteriormente se realizó un post-test para la comparación entre grupos (Bonferroni), *p<0,05 comparado con los cultivos crecidos en presencia de BDNF a las 2 horas de sembradas las células.

4- Análisis del efecto protector de la NRG-β1 en los cultivos de motoneuronas

4.1- Activación del receptor específico de NRG-β1

Como se mostró previamente (**Figura 1.2A**), los cultivos de motoneuronas expresan los tres receptores de neuregulinas (ErbB2, ErbB3, ErbB4). Para determinar si el efecto protector ejercido por la neuregulina en los cultivos de motoneuronas (**Figura 1.3**) es mediado por los receptores ErbB, se estudio la fosforilación del receptor ErbB2, ya que

es la subunidad necesaria para la activación de toda la familia de receptores (ver Introducción).

Los cultivos de motoneuronas fueron crecidos en presencia de GDNF por 16 horas, y luego se los expuso a 10 nM de NRG- β 1 por 15 min. Se analizó la fosforilación del receptor ErbB2 mediante la técnica de Western blot utilizando un anticuerpo específico para el sitio fosforilado, luego se analizó la inmunoreactividad total para el receptor ErbB2 como control de expresión y siembra. Como se puede observar en la **Figura 1.4**, la incubación de las motoneuronas por 15 minutos con NRG- β 1 aumentó significativamente la fosforilación de dicho receptor, lo que indicaría que la neuregulina ejerce su acción a

través de los receptores ErbB.

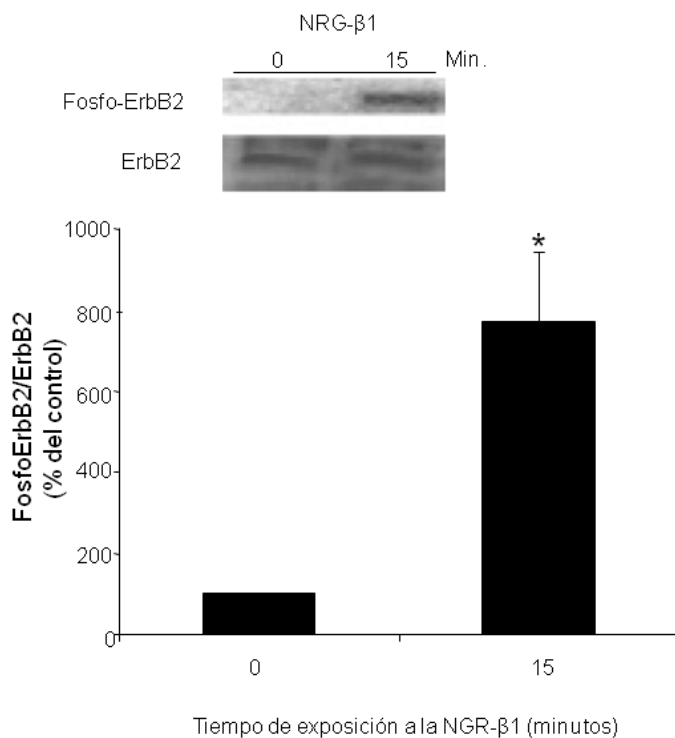


Figura 1.4: El receptor ErbB2 es activado por la NRG- β 1 en los cultivos de motoneuronas. (A) La fosforilación del receptor ErbB2 fue analizada por Western blot utilizando un anticuerpo para fosfo-ErbB2, y un anticuerpo para ErbB2 para calcular la proteína total. Los cultivos fueron crecidos en medio suplementado con GDNF (0.1ng/ml). Luego de 16 hs, los cultivos fueron tratados con 10 nM de NRG- β 1 por 15 minutos. (B) Cuantificación de los valores obtenidos luego de la densitometría de las bandas. Las barras representan la media \pm DS de la relación entre fosfo-ErbB2/ErbB2 (% del control), de cuatro experimentos independientes. Los resultados fueron analizados estadísticamente por t-test, * $p < 0,05$ comparado con los cultivos crecidos sin NRG β 1.

4.2- Efecto dosis-dependiente de la NRG- β 1 en los cultivos de motoneuronas

A fin de determinar si el efecto observado con la NRG- β 1 es específico y saturable, se cultivaron las motoneuronas en presencia de diferentes concentraciones de NRG- β 1 (0.01-10 nM); y luego de 24 horas de la siembra, se evaluó la sobrevivencia por conteo celular. Para estandarizar entre experimentos se consideró el número de motoneuronas que sobrevive en presencia de BDNF como el 100% de sobrevivencia (**Figura 1.5**). El efecto de la NRG- β 1 en la sobrevivencia de motoneuronas en cultivo fue concentración dependiente, con una concentración efectiva 50 (EC_{50}) de 1 nM y el máximo efecto se alcanzó a una concentración de 5 nM. Estas concentraciones coinciden con lo reportado en la literatura para otros efectos biológicos de la NRG- β 1 en otras poblaciones

neurales (Liu y col., 2001).

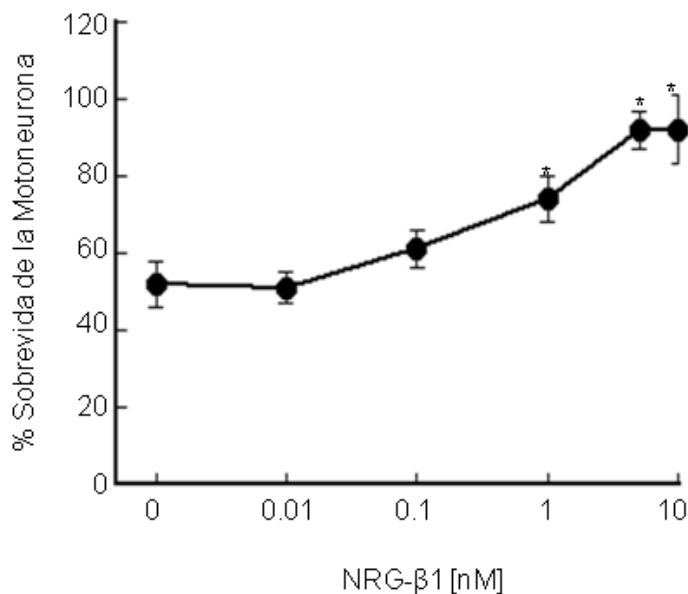


Figura 1.5: El efecto de la NRG- β 1 en la sobrevivencia de las motoneuronas en cultivo es concentración dependiente. Los cultivos fueron incubados con NRG- β 1 (0.01-10 nM) y la sobrevivencia fue analizada luego de 24 horas. Los valores fueron expresados como porcentaje de las células presentes en los cultivos crecidos en medio suplementado con BDNF (1 ng/ml). Los valores representan la media \pm DS de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Los datos fueron analizados por el test ANOVA y posteriormente se realizó un post-test para la comparación entre grupos (Bonferroni), * $p < 0,05$ comparado con los cultivos crecidos en medio sin factores neurotróficos.

4.3- Estudio de la participación de las distintas cascadas de fosforilación en la protección mediada por la NRG- β 1 en los cultivos de motoneuronas.

Las vías de señalización PI3 kinasa (PI3K) y MAP kinasa (MAPK) son activadas por varios factores tróficos, incluyendo las neurotrofinas (Dolcet y col., 1999b; Kaplan y Miller, 2000; Soler y col., 1999b). En motoneuronas, las neurotrofinas ejercen un efecto protector por medio de la activación de dichas cascadas (Encinas y col., 2001). En otros modelos experimentales, se ha descrito que las neuregulinas poseen un efecto protector activando las cascadas de fosforilación PI3K y MAPK (Canoll y col., 1996; Flores y col., 2000). Con el objetivo de determinar si estas cascadas se encuentran involucradas en la protección de la muerte celular observada en los cultivos de motoneuronas tratados con NRG- β 1, se analizó la fosforilación de distintas proteínas por el método de Western blot e inmunocitoquímica.

En primer lugar se estudió la activación de la cascada PI3K/Akt. Las motoneuronas cultivadas en presencia de NRG- β 1 no muestran fosforilación de la proteína Akt (**Figura 1.6A**), mientras que en los cultivos expuestos a BDNF la fosforilación de la proteína Akt es significativamente superior con respecto a los cultivos crecidos en ausencia de factores tróficos, como fue descrito en reportes anteriores (Dolcet y col., 1999b). Estos resultados fueron confirmados por inmunocitoquímica (**Figura 1.6B**). En conjunto, estas observaciones indican que la neuregulina ejercería su acción

protectora en la muerte de la motoneuronas por medio de una vía de señalización que no requiere la activación de Akt.

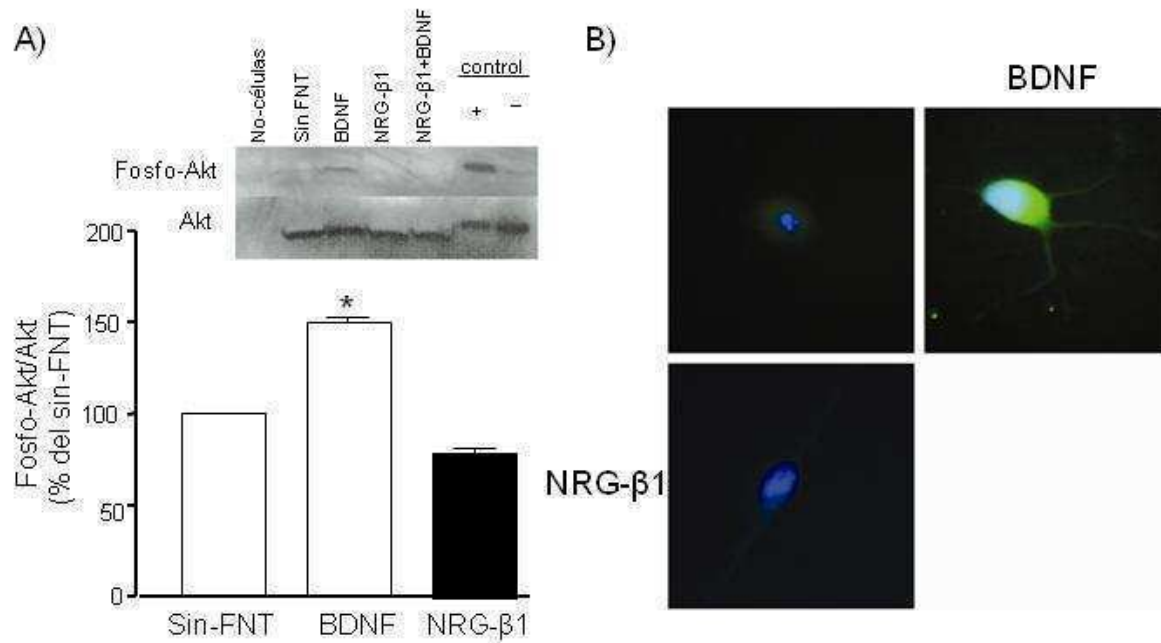


Figura 1.6: El incremento en la sobrevivencia de las motoneuronas crecidas en presencia de NRG-β1 es independiente de Akt. Se analizó la fosforilación de la proteína Akt en los cultivos crecidos con NRG-β1. Los cultivos fueron crecidos en presencia de 10 nM de NRG-β1, o en presencia de BDNF (1 ng/ml) por 24 horas. **(A)** Análisis de la fosforilación de la proteína Akt por el método de Western blot, utilizando lisados celulares de muestras crecidas en presencia de los distintos factores. Como control positivo y negativo se utilizaron lisados (ver Materiales y Métodos). La inmunoreactividad para la proteína total Akt fue utilizada como control de expresión y siembra. Los valores fueron obtenidos como la relación entre la proteína fosforilada y la proteína total relativizada contra los cultivos crecidos en medio no suplementado (sin-FNT). Las barras representan la media ± DS de tres experimentos independientes. El análisis estadístico fue realizado con el test ANOVA y posteriormente se realizó un post-test para la comparación de los grupos (Bonferroni), * $p < 0,05$ comparado con los cultivos no suplementados. **(B)** Observación de la fosforilación de la proteína Akt en los cultivos de motoneuronas por el método de inmunocitoquímica. Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal Leica, con un laser HeNe-Green y UV laser. Se utilizó un anticuerpo secundario conjugado con fluoresceína y los núcleos se tiñeron con DAPI.

Debido a que la vía de señalización que involucra a MAPK/ERK1/2 ha sido implicada en distintos efectos ejercidos por la neuregulina en otros tipos celulares (Monje y col., 2006; Zorzano y col., 2003), analizamos la activación de esta cascada en cultivos de motoneuronas tratados con neuregulina. Los cultivos fueron crecidos en presencia de NRG- β 1 (10 nM) por 16 horas y luego se analizó la fosforilación de las proteínas ERK1/2 por la técnica de Western blot. Los cultivos de motoneuronas incubados con BDNF o NRG- β 1 mostraron un aumento en la fosforilación de las proteínas ERK1/2, determinada por Western blot (**Figura 1.7**). Estos resultados sugieren que la activación de las proteínas ERK1/2 podría ser necesaria para el efecto protector observado, siendo una vía común tanto para la neuregulina como para las neurotrofinas. Para confirmar esta hipótesis, evaluamos la sobrevivencia de los cultivos de motoneuronas en presencia de distintos inhibidores selectivos para las cascadas de MAPK/ERK1/2 y PI-3K/Akt.

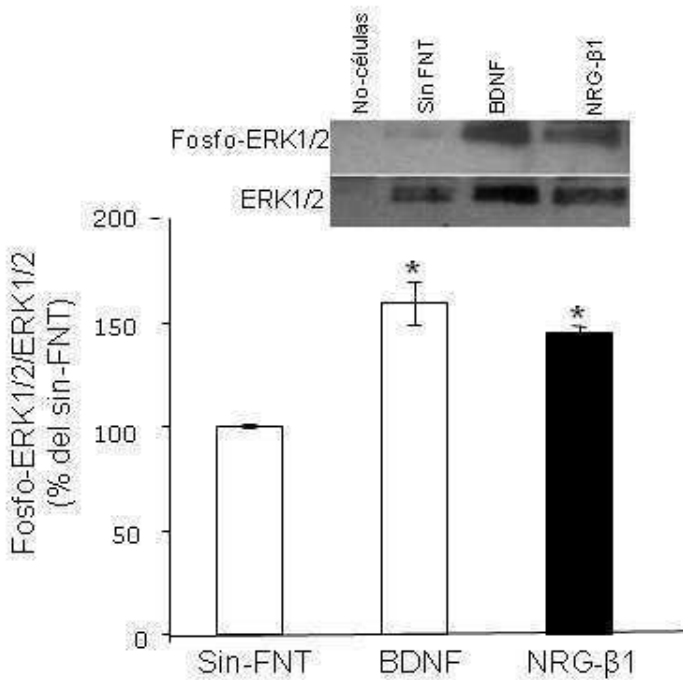


Figura 1.7: La NRG- β 1 aumenta la fosforilación de la proteína ERK1/2 en los cultivos de motoneuronas. Los cultivos fueron crecidos en medio suplementado con BDNF (1 ng/ml) o NRG- β 1 (10 nM) por 24 horas y luego se analizó la fosforilación de las proteínas ERK1/2 por Western blot. La ERK1/2 fue utilizada como control de expresión y de siembra. Los valores fueron expresados como % de los cultivos sin factores (sin-FNT). Las barras representan la media \pm DS de tres experimentos independientes de la relación de fosfoERK1/2 y ERK1/2 (% del control). El análisis estadístico se realizó por el test de ANOVA, luego se realizó un post-test (Bonferroni), * $p < 0,05$ comparado con los cultivos crecidos sin-FNT.

4.4- Estudio de la participación de las distintas cascadas de fosforilación con agentes farmacológicos

En base a las observaciones anteriores, los cultivos de motoneuronas fueron incubados en presencia de agentes farmacológicos que inhiben la activación de las cascadas de MAPK/ERK1/2 y PI3K/Akt.

Las motoneuronas fueron cultivadas en presencia de BDNF o NRG- β 1 e incubados con inhibidores de PI3K (5 μ M wortmanina o 1 μ M LY294002). La sobrevida se determinó por conteo de células tres días después de la siembra. Como se observa en la **Figura 1.8A**, los inhibidores de PI3K disminuyeron la viabilidad celular de forma significativa, tanto para los cultivos crecidos en BDNF como para los crecidos con NRG- β 1, mientras que la sobrevida en ausencia de factores tróficos no fue afectada. Debido a que los inhibidores wortmanina y LY294002 actúan de diferente manera para inhibir la proteína PI3K, podemos concluir que el efecto de la inhibición de la proteína PI3K es específico. Por el contrario, cuando los cultivos crecidos en NRG- β 1 o BDNF fueron tratados con inhibidor de la proteína MEK (U0126), no se observó disminución en la viabilidad celular a las concentraciones en las cuales este inhibidor es específico (5-25 μ M). Se observa una disminución de la viabilidad celular en todos los tratamientos a concentraciones mayores de 25 μ M, indicando un efecto tóxico del inhibidor per se (**Figura 1.8B**). Esto se puede deber a que a esas concentraciones, el U0126 puede estar inhibiendo más de una kinasa. Llamativamente, la inhibición de MEK resultó en una disminución significativa en la sobrevida de las motoneuronas cultivadas en ausencia de factores tróficos, indicando que la vía de MAPK/ERK1/2 tiene que estar activa en la

subpoblación que sobrevive en ausencia de factores tróficos. Este resultado fue confirmado mediante el uso de otro inhibidor de la proteína MEK (PD98059), el cual a una concentración de 50 μM , no afectó la viabilidad celular observada en los cultivos crecidos en presencia de NRG- β 1 o BDNF.

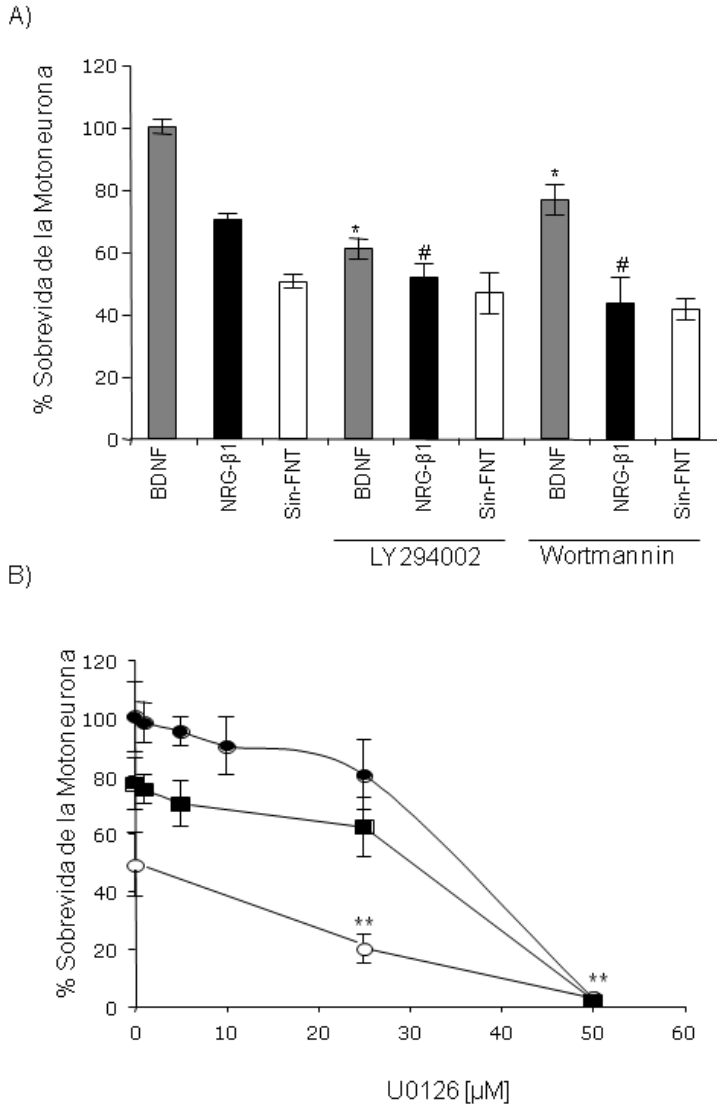


Figura 1.8: Las NRG- β 1 ejercen su acción protectora en los cultivos de motoneuronas activando la vía PI3K. Los cultivos fueron crecidos en presencia de los inhibidores para la proteína PI3K (LY294002, 1 μM), Wortmanina (5 μM) (A); o en presencia de un inhibidor para la proteína MEK (U0126, 5-25 μM) (B), en medio suplementado con NRG- β 1 (10 nM) (■), BDNF (1 ng/ml) (●) o en medio sin suplementar (○). La viabilidad celular fue analizada 3 días luego de la siembra. Los valores fueron expresados como un porcentaje de las células presentes en los cultivos crecidos con medio suplementado con BDNF. Los valores representan la media \pm DS de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado. El análisis estadístico se realizó por el test de ANOVA, luego se realizó un post-test para la comparación entre los grupos (Bonferroni), * $p < 0,05$ comparado con los cultivos crecidos en BDNF; # $p < 0,05$ comparado contra los cultivos crecidos en NRG- β 1. ** $p < 0,05$ comparado con los cultivos crecidos sin factores neurotróficos.

El análisis conjunto de estos resultados permite concluir que la NRG- β 1 ejerce su efecto trófico a través de la vía PI3K, pero de manera independiente de la proteína Akt, mientras que la activación de la cascada MAPK/ERK1/2 no está involucrada en dicho efecto. Además, el mecanismo involucrado en el efecto trófico de la NRG- β 1 sería diferente al mecanismo activado por las neurotrofinas, ya que en un caso es dependiente de Akt y en el otro es independiente de Akt. Sin embargo, el efecto trófico de la neuregulina es significativamente más débil que el efecto de BDNF (**Figura 1.3**). A partir de estos resultados se puede postular que, si bien las neuregulinas ejercen un efecto trófico, este no sería su papel principal, ya que otros factores neurotróficos son más eficientes en el mantenimiento de la viabilidad de las motoneuronas por un período más prolongado. Debido a que las neuregulinas, en el desarrollo, se expresan al mismo tiempo que otros factores tróficos, y que la combinación de factores tróficos ejerce un efecto sinérgico en la supervivencia de las motoneuronas (Arce y col., 1998; Hanson y col., 1998), decidimos investigar los efectos de la interacción de distintos factores neurotróficos y la neuregulina en la protección de la muerte celular de las motoneuronas en cultivo.

5- Interacción de la NRG- β 1 con otros factores tróficos en la supervivencia de la motoneurona

5.1- Estudio de la interacción de la NRG- β 1 con el factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF)

Diversos estudios han identificado a un gran número de factores neurotróficos capaces de estimular la sobrevivencia de la motoneuronas en cultivo e in vivo (Oppenheim, 1996); entre ellos, el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) (Henderson y col., 1994). Específicamente, el GDNF ejerce un efecto sinérgico cuando las motoneuronas son cultivadas en presencia de cardiotrofina-1 (Arce y col., 1998). Basándonos en estas observaciones, estudiamos la interacción de la NRG- β 1 y el GDNF en los cultivos de motoneuronas.

Las células fueron cultivadas en presencia de NRG- β 1 (10 nM) y GDNF (0,1 ng/ml) por separado o agregados simultáneamente, y la sobrevivencia de las motoneuronas fue determinada a los tiempos indicados (**Figura 1.9**). Cuando las células son cultivadas en presencia de NRG- β 1, se observó una sobrevivencia mayor del 40% hasta después de los 7 días de cultivo, mientras que cuando las células fueron cultivadas en presencia de GDNF, la sobrevivencia de las motoneuronas fue mayor del 80% a los 10 días de cultivo. Luego de este período, la sobrevivencia de las motoneuronas en cultivo decayó abruptamente a menos del 30% en el caso de las células cultivadas en presencia de GDNF y sólo unas pocas motoneuronas sobrevivieron en los cultivos crecidos en presencia de NRG- β 1 (menos del 2%). Sin embargo, cuando las células fueron cultivadas en presencia de ambos factores, se observó una acción sinérgica en la promoción de la sobrevivencia de las motoneuronas. El número de motoneuronas en los cultivos crecidos con GDNF y NRG- β 1 fue $80\pm 8\%$ a los 15 días de cultivo. Este número excede ampliamente a la suma de las motoneuronas que sobreviven en los cultivos crecidos en presencia de GDNF o NRG- β 1 por separado, sugiriendo que el efecto es sinérgico y que los factores actúan activando de diferente manera las vías de señalización.

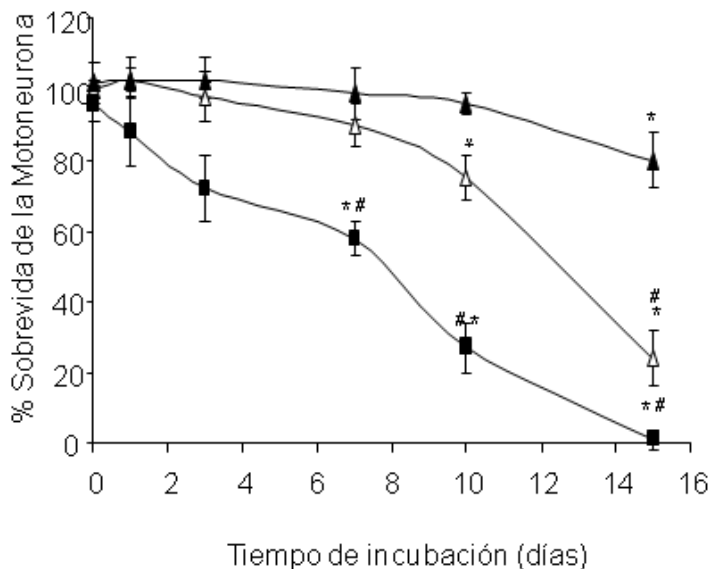


Figura 1.9: La combinación de la NRG-β1 con GDNF ejerce un efecto sinérgico en la sobrevida de las motoneuronas. Los cultivos fueron crecidos en medio suplementado con 10 nM NRG-β1 (■), 0,1 ng/ml GDNF (△), o 10 nM NRG-β1 y 0,1 ng/ml GDNF (▲), y la viabilidad celular fue calculada a los días indicados. Los valores fueron expresados como porcentaje del número de células presentes en los cultivos suplementados con GDNF a las 2 horas de plaqueo. Las barras representa la media ± DS de tres experimentos independientes realizados por

duplicado. El análisis estadístico se realizó utilizando el test de ANOVA, luego se realizó un post-test (Bonferroni), * $p < 0,05$ comparado con los cultivos crecidos en GDNF a las 2 horas de plaqueo (100%); # $p < 0,05$ comparado con a los cultivos crecidos en NRG-β1+GDNF.

5.2- Estudio de la interacción de la NRG-β1 con las neurotrofinas

Otros de los factores importantes en la sobrevida de las motoneuronas son las neurotrofinas. Tanto el BDNF como las neurotrofinas NT-3 y NT4/5 ejercen una actividad trófica sobre las motoneuronas en cultivo (Henderson y col., 1993). Sorprendentemente, la incubación de las motoneuronas con NRG-β1 más BDNF resultó en la disminución de la sobrevida; siendo el número total de motoneuronas que sobreviven con la combinación de estos factores tróficos similar al observado en los cultivos crecidos en ausencia de factores tróficos (**Figura 1.10A**). Este efecto es generalizado a toda la población de motoneuronas, ya que éstas mueren luego de 10 días en cultivo. Es interesante que el efecto trófico observado con cada uno de los factores por

separado fue eliminado cuando las células fueron incubadas con los dos factores juntos. Para analizar si la muerte celular observada era dependiente de la concentración de neuregulinas, se cultivaron las motoneuronas a distintas concentraciones en presencia de 1 ng/ml de BDNF. El efecto protector del BDNF es bloqueado de una manera concentración-dependiente por la NRG- β 1 (**Figura 1.10B**).

El BDNF es un miembro de la familia de las neurotrofinas, la cual está formada por NGF, BDNF, NT-3 y NT-4/5 (ver Introducción) (Carter y Lewin, 1997; Chao y Bothwell, 2002). Las motoneuronas expresan los receptores TrkB, cuyo ligando preferencial son las neurotrofinas BDNF y NT-4/5, así como también el receptor TrkC para NT-3. Por otra parte, las motoneuronas expresan también otro tipo de receptor para las neurotrofinas, el receptor p75^{NTR}, que se une a todas las neurotrofinas con igual afinidad (Chao y Hempstead, 1995; Shamovsky y col., 1999; Yan y col., 1993). Asimismo, las neurotrofinas mencionadas mantienen la supervivencia de las motoneuronas en cultivo, a excepción del NGF (Henderson y col., 1993). En este contexto, se investigó si el efecto de las neuregulinas de inhibir la acción trófica del BDNF se extendía a otros miembros de la familia de las neurotrofinas. Como se puede observar en la **Figura 1.10C**, el efecto trófico observado con las neurotrofinas NT-3 y NT-4/5 fue anulado cuando los cultivos fueron crecidos en presencia de NRG- β 1. En presencia de NGF, una neurotrofina que no tiene actividad trófica en las motoneuronas debido a que las motoneuronas no expresan el receptor TrkA (Henderson y col., 1993), el efecto trófico de la NRG- β 1 también fue inhibido.

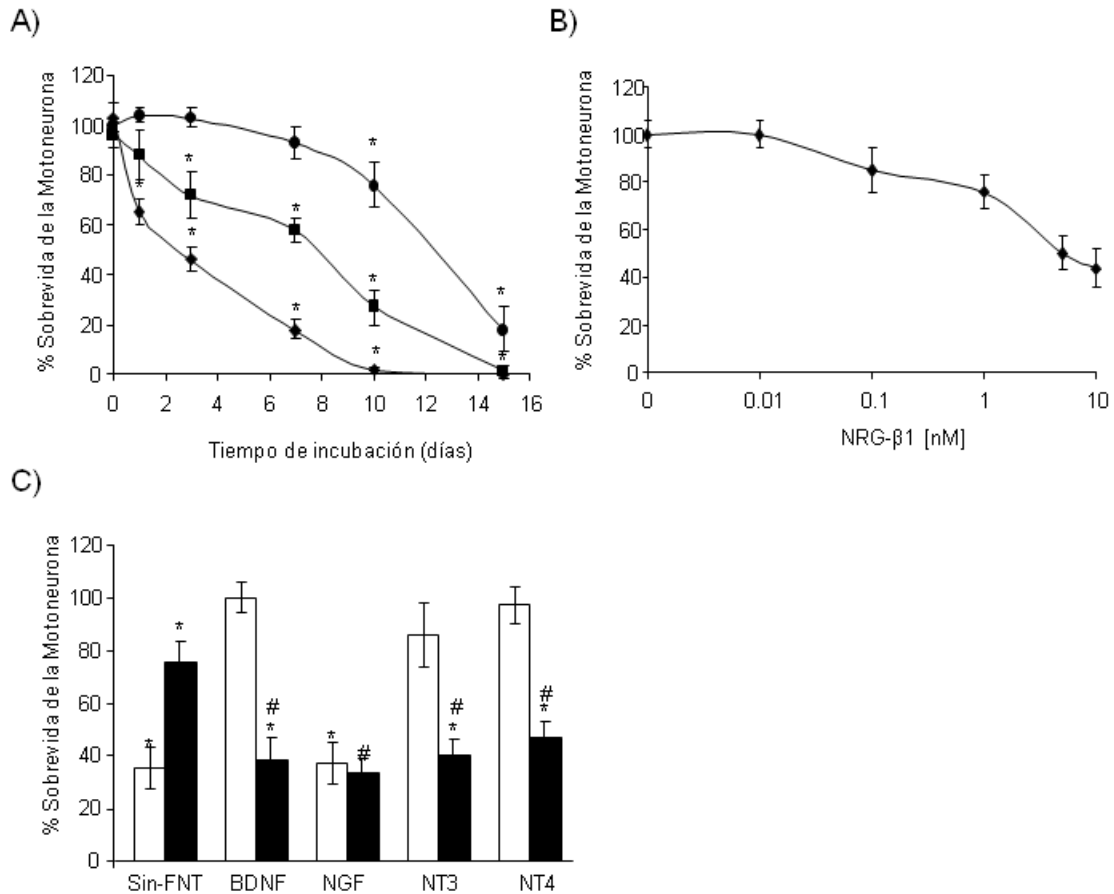


Figura 1.10: La combinación de las NRG-β1 con las NTs ejerce un efecto negativo en la sobrevivencia de las motoneuronas en cultivo. (A) Los cultivos fueron crecidos en medio suplementado con 10 nM NRG-β1 (■), 1 ng/ml BDNF (●) o 10 nM NRGβ1+ 1 ng/ml BDNF (◆). La viabilidad celular fue calculada a los días indicados. Los valores fueron expresados como porcentaje del número de células presente en los cultivos crecidos con BDNF a las 2 horas de plaqueo. Los valores representan la media ± DS de tres experimentos independientes realizados por duplicado. El análisis estadístico se realizó por el test de ANOVA, luego se realizó un post-test para la comparación entre los grupos (Bonferroni), * p< 0,05 con respecto a los cultivos crecidos en BDNF a las dos horas de plaqueo. **(B)** Los cultivos fueron crecidos en medio suplementado con 1 ng/ml BDNF y NRG-β1(0.01-10 nM). La viabilidad celular fue analizada a los 3 días de cultivo. Los valores se expresaron como en A. **(C)** Los cultivos fueron crecidos en medio suplementados con 1 ng/ml BDNF, NT-3, NT-4/5 o 50 ng/ml NGF (columnas blancas); o en presencia de estos mismos factores + 10 nM de NRG-β1 (columnas negras), la viabilidad celular fue analizada a los 3 días de la siembra. Los valores se expresaron como porcentaje de los cultivos crecidos en BDNF. Las barras representan la media ± DS de tres experimentos independientes realizados por duplicado. El análisis estadístico se realizó como en A y B, * p<0,05 comparado con los cultivos crecidos en presencia de BDNF; # p<0,05 comparado con los cultivos crecidos en presencia de NRG-β1.

Analizando estos resultados conjuntamente con los presentados anteriormente, podemos concluir que el efecto trófico ejercido por las neurotrofinas y la NRG- β 1 por sí solas, involucra cascadas intracelulares distintas. Cuando estos factores son incubados conjuntamente, la activación de dichas cascadas o bien produce un efecto paradójico, o se involucran otros mecanismos celulares no activados por ninguno de los factores individualmente.

Como se ha mencionado anteriormente, no sólo las neuregulinas se expresan en el mismo momento del desarrollo que las neurotrofinas, sino que las neurotrofinas incrementan la expresión de las neuregulinas en la médula espinal (Loeb y Fischbach, 1997). Este fenómeno ocurre de forma sincronizada con el proceso de muerte celular programada de las motoneuronas. En este contexto, se estudiaron los mecanismos moleculares involucrados en el fenómeno de inhibición de la actividad trófica, cuando los cultivos son incubados con NRG- β 1 y neurotrofinas.

6- Análisis de la participación de los receptores de las neurotrofinas en la muerte de las motoneuronas cultivadas en presencia de NRG- β 1 y neurotrofinas

Como primer objetivo, nos propusimos estudiar los receptores involucrados en la señal de muerte que se activa cuando las motoneuronas son cultivadas con NRG- β 1 y neurotrofinas. Basándonos en los datos anteriores y en datos de la literatura que describen que las motoneuronas no expresan el receptor TrkA (Henderson y col., 1993), analizamos

si el tratamiento con NRG- β 1 induce la expresión de dicho receptor, o si afecta la expresión de los otros receptores para la neurotrofinas (TrkB y p75^{NTR}). Las motoneuronas fueron cultivadas en presencia de los distintos factores por 24 horas y luego fueron procesadas para la técnica de Western blot. Se observó que todos los cultivos expresaron el receptor TrkB y el receptor p75^{NTR}, mientras que ninguno de los tratamientos indujo la expresión del receptor TrkA. Como control positivo del receptor TrkA, se utilizó un lisado de células PC12 (**Figura 1.11**). Asimismo, se observó un incremento en la expresión del receptor TrkB en los cultivos tratados con NRG- β 1, independientemente de la presencia de su ligando específico, BDNF. Por otro lado, se observó una disminución del receptor TrkB en los cultivos tratados con BDNF, indicando un mecanismo de regulación negativo.

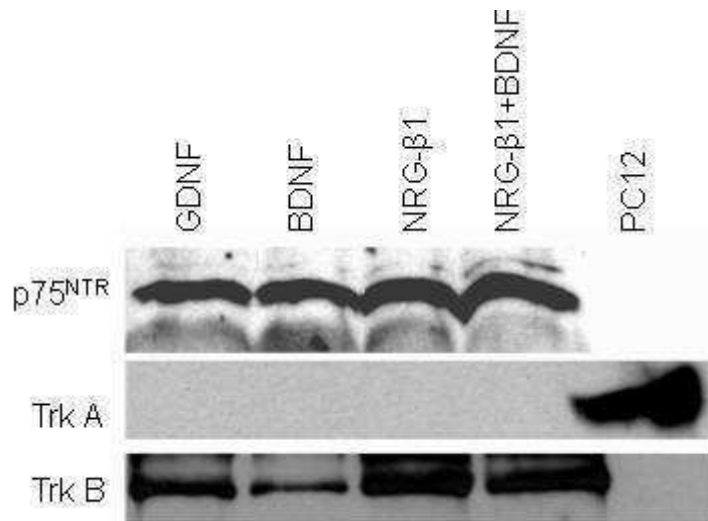


Figura 1.11: El nivel de expresión del receptor TrkB en los cultivos de motoneuronas depende de la suplementación del medio. Análisis de la expresión de los receptores para la neurotrofina en los cultivos de motoneuronas crecidos en medios suplementados con diferentes factores. Los cultivos fueron crecidos en medio suplementado con 1 ng/ml BDNF, 1 ng/ml GDNF, 10 nM NRG- β 1, o 10 nM NRG- β 1 + 1 ng/ml BDNF. Luego de 24 horas en cultivo, se analizó la expresión de los receptores Trk A, TrkB y p75^{NTR} por el método de Western blot utilizando anticuerpos específicos para cada receptor. Se utilizó un lisado de células PC12 como control positivo del receptor TrkA.

7- Participación de receptor p75^{NTR} en la muerte de las motoneuronas

Basandonos en el hecho que el NGF no activa a los receptores TrkB y TrkC y en la observación de que el tratamiento con NRG-β1 no indujo la expresión del receptor TrkA, nos preguntamos si el receptor p75^{NTR} está involucrado en la muerte de la motoneuronas crecidas en presencia de NRG-β1 y neurotrofinas. El receptor p75^{NTR} está ligado a señales de muerte en la motoneurona y en otros tipos celulares (Casaccia-Bonnet y col., 1999; Pehar y col., 2007). Para abordar esta pregunta utilizamos dos diseños experimentales complementarios: a) la inhibición de la activación del receptor con un anticuerpo específico, y b) la reducción de la expresión del receptor, utilizando una secuencia de oligonucleótidos fósforotiolato antisentido.

7.1- Neutralización del receptor p75^{NTR} con un anticuerpo específico

Las motoneuronas fueron cultivadas con los distintos factores en presencia del anticuerpo anti-p75^{NTR}, que bloquea la acción del receptor (Huber y Chao, 1995) (ver Materiales y Métodos). La adición del anticuerpo anti-p75^{NTR} previno la muerte causada por el tratamiento combinado con NRG-β1 y NTs (BDNF, NGF) (**Figura 1.12**). El anticuerpo anti-p75^{NTR} no afectó la sobrevivencia de las motoneuronas cuando fueron crecidas en presencia de GDNF o NGF. Por el contrario, en los cultivos crecidos con BDNF y tratados con el anticuerpo anti-p75^{NTR}, se observó una disminución de la sobrevivencia

celular (**Figura 1.12**). Estos resultados son consistentes con las observaciones de Wiese y colaboradores (1999), demostrando que la actividad del receptor $p75^{NTR}$ es necesaria para la sobrevivencia de las motoneuronas expuestas a neurotrofinas.

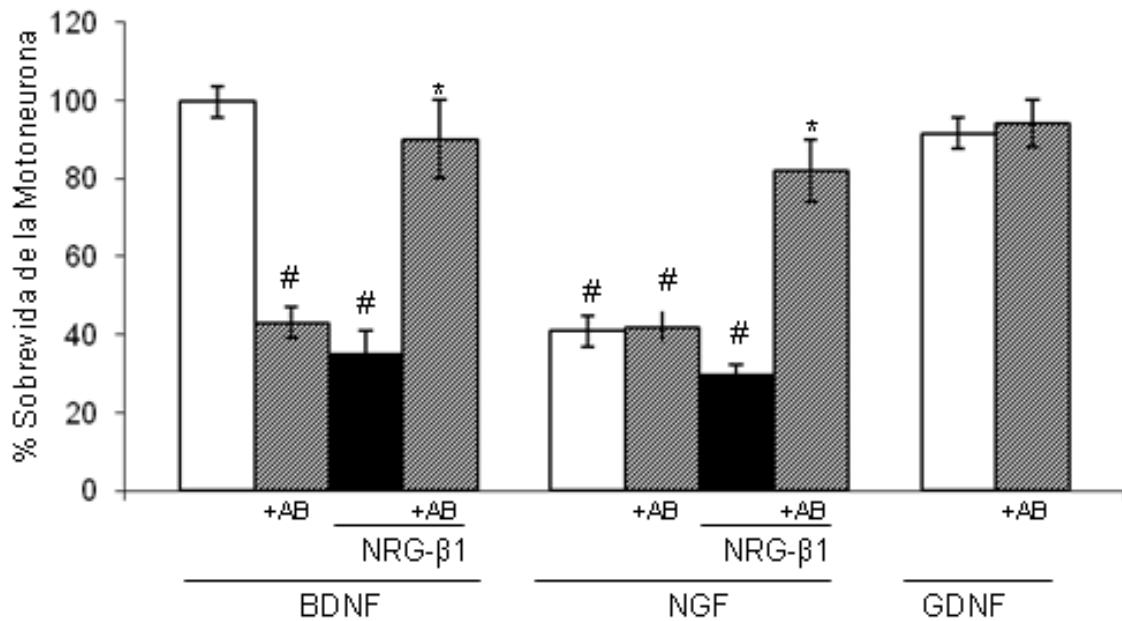


Figura 1.12: El bloqueo del receptor $p75^{NTR}$ por medio de un anticuerpo neutralizante previene la muerte inducida en los cultivos crecidos en presencia de $NRG-\beta1$ +BDNF. Los cultivos de motoneuronas fueron crecidas en medio suplementado con 1 ng/ml BDNF, 50 ng/ml NGF o 0,1 ng/ml GDNF en presencia (columnas negras), o no (columnas blancas) de 10 nM $NRG-\beta1$, y a su vez incubados con una dilución 1/50 del anticuerpo neutralizante, previamente dializado con PBS (columnas rayadas). La viabilidad celular se analizó a los 3 días en cultivo. Los valores se expresan como porcentaje de los cultivos crecidos con BDNF. Las barras representan la media \pm DS de tres experimentos independientes realizados por duplicado. El análisis estadístico se realizó por el test de ANOVA, luego se realizó un post-test para la comparación entre los grupos (Bonferroni). * $p < 0,05$ comparado con los cultivos crecidos en presencia de $NRG-\beta1$ + BDNF; # $p < 0,05$ comparado con los cultivos crecidos en presencia de BDNF.

7.2- Disminución de la expresión del receptor de p75^{NTR}

Los cultivos de motoneuronas fueron crecidos en presencia de oligonucleótidos con secuencias anti-sentido (AS1, AS2), sentido (SE), sin sentido (NS). Estas secuencias han sido utilizadas previamente para disminuir la expresión del receptor p75^{NTR} en rata (Cheema y col., 1996). Para prevenir la muerte de las motoneuronas y no afectar el posterior tratamiento de las células, el medio utilizado fue suplementado con GDNF. Después de 24 horas de incubación con las secuencias anti-sentido, se observó una disminución de la expresión del receptor p75^{NTR} por el método de Western blot. Como control positivo se utilizaron motoneuronas cultivadas en presencia de GDNF (**Figura 1.13A**). Después de 3 días en presencia de los oligonucleótidos, el medio de cultivo fue removido y suplantado por medio fresco sin glutamato. En ese momento se agregaron los distintos factores tróficos, manteniendo los oligonucleótidos en el medio de cultivo. Luego de 24 horas se procedió al conteo celular. Como muestra la **Figura 1.13B**, la disminución de la expresión del receptor de p75^{NTR}, con los oligonucleótidos anti-sentido, previno la muerte celular observada en los cultivos incubados simultáneamente con NRG-β1 y BDNF, mientras que no se observó protección con las secuencias sentido o sin sentido. Estos datos corroboran los resultados obtenidos con el bloqueo del receptor con el anticuerpo y demuestran la participación del receptor p75^{NTR} en la muerte de la motoneurona inducida por el tratamiento con NRG-β1 y neurotrofinas.

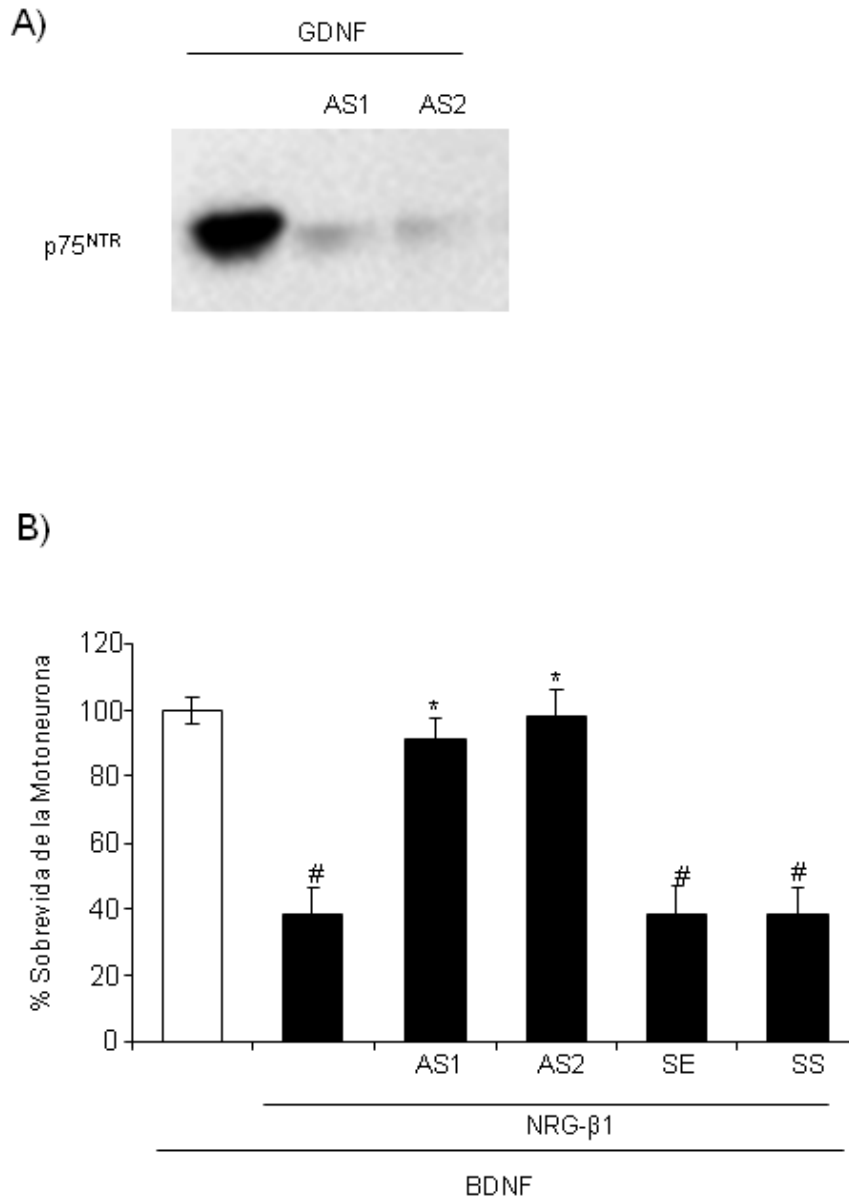


Figura 1.13: Disminuir la expresión del receptor p75^{NTR} con secuencias antisentido previene la muerte desencadenada por NRGβ1+BDNF. Las células fueron cultivadas en medio suplementado con 0.1ng/ml GDNF más las secuencias antisentidos (AS1, AS2), sentido (SE) o sin-sentido (SS). **(A)** Análisis de la expresión del receptor p75^{NTR}, luego de 24 horas de exposición a las secuencias antisentido por el método de Western blot utilizando un anticuerpo específico para dicho receptor. **(B)** Los cultivos fueron incubados con las secuencias por 3 días y luego se trató con 1 ng/ml BDNF o 10 nM NRG-β1 + 1 ng/ml BDNF, más los oligonucleotidos. La viabilidad celular se analizó a las 24 horas. Los valores se expresaron como porcentaje de los cultivos suplementados con BDNF. Las barras representan la media ± DS de tres experimentos independientes realizados por duplicado. El análisis estadístico se realizó utilizando el test de ANOVA, luego se realizó un post-test para la comparación entre los grupos (Bonferroni), * p<0,05 comparado con los cultivos crecidos en presencia de NRG-β1 + BDNF; # comparado con los cultivos crecidos en presencia de BDNF.

8- Análisis de las cascadas activadas por el tratamiento de NRG- β 1 y BDNF

8.1- Estudio de la participación de las cascadas PI3K/Akt y ERK1/2 en la muerte de las motoneuronas cultivadas en presencia de NRG- β 1 y BDNF

Como se describió anteriormente (**Figura 1.6A**), cuando las células fueron cultivadas con BDNF, se observó un aumento significativo en la fosforilación de la proteína Akt, mientras que NRG- β 1 no estimuló la fosforilación de Akt en motoneuronas. Sin embargo, ambos tratamientos activan la cascada de PI3K, ya que la inhibición de esta vía de señalización disminuye la sobrevivencia de las motoneuronas a valores similares a los obtenidos en los cultivos mantenidos en ausencia de factores tróficos (**Figura 1.8A**). Debido a que los efectos tróficos de las neurotrofinas dependen de la activación de la vía de la PI3K/Akt, mientras que los efectos de las neuregulinas fueron dependientes de la activación de la PI3K pero independientes de Akt, se investigó el efecto de la administración simultánea de esos factores tróficos sobre la fosforilación de Akt. Las motoneuronas fueron crecidas en presencia de los dos factores por 16 horas y luego se observó la fosforilación de la proteína Akt. Como se muestra en la Figura 14, la incubación de NRG- β 1 simultáneamente con BDNF inhibió la fosforilación de la proteína Akt, que se encontraba aumentada cuando los cultivos fueron tratados con BDNF sólo. Estas observaciones fueron constatadas tanto por la técnica de Western blot (**Figura 1.14A**) así como por inmunocitoquímica (**Figura 1.14B**). Por otro lado, cuando

se analizó la fosforilación de las proteínas ERK1/2 no se observó diferencia entre los cultivos crecidos en presencia de uno de los factores o con ambos factores combinados

(Figura 1.14C).

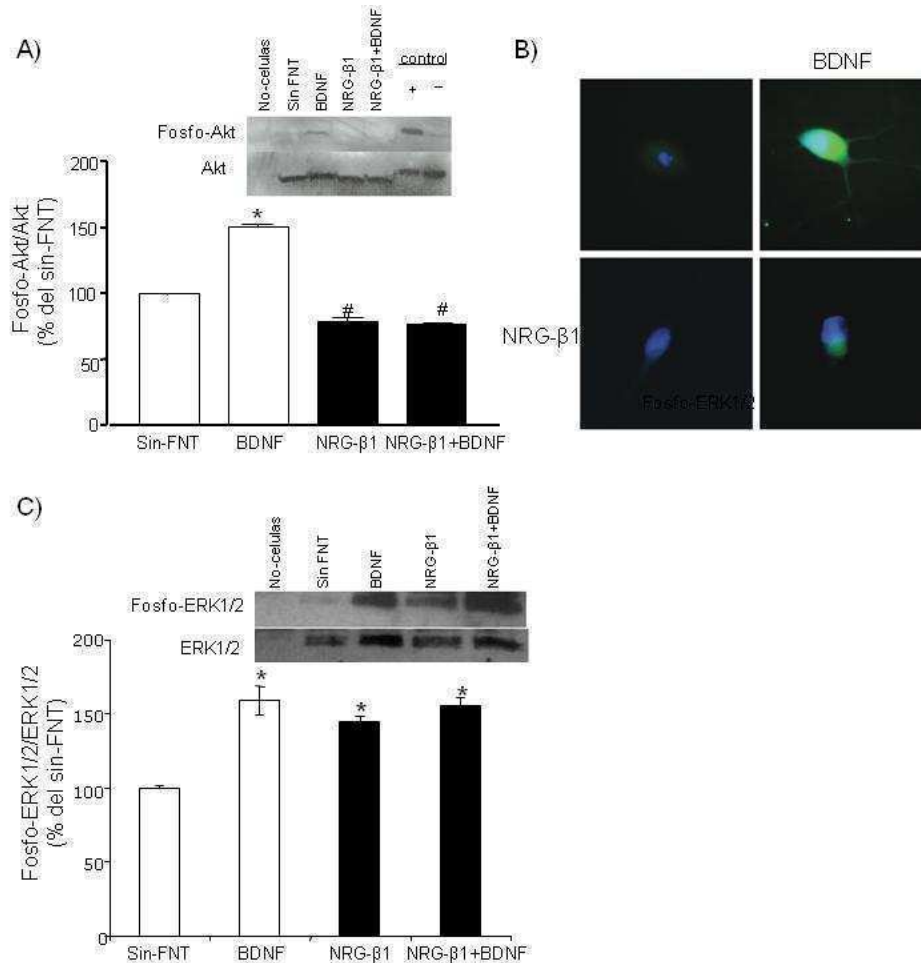


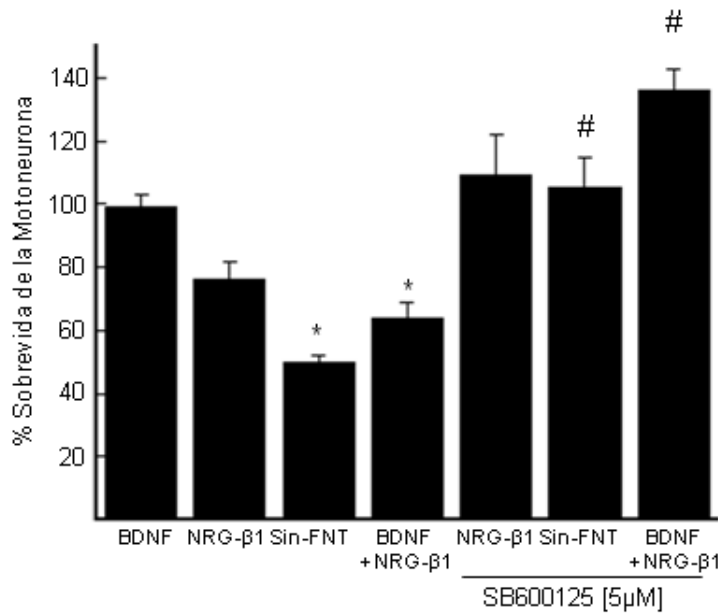
Figura 1.14: La combinación de NRG-β1 y BDNF en los cultivos de motoneuronas bloquea la fosforilación de Akt. Los cultivos fueron crecidos en presencia de 10 nM de NRG-β1 y/o en presencia de BDNF (1 ng/ml) por 24 horas. Como control positivo y negativo se utilizó un lisado celular (ver Materiales y Métodos). **(A)** Cuantificación de los valores obtenidos luego de la densitometría de las bandas de la inmunoreactividad para la proteína fosfo- Akt en relación a la proteína Akt, % de los cultivos crecidos sin factores (sin-FNT). Las barras representan la media ± DS de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó utilizando el test de ANOVA, luego se realizó un post-test (Bonferroni), * p<0,05 con respecto a los cultivos sin-FNT, # p<0,05 con respecto a los cultivos con BDNF. **(B)** Inmunocitoquímica utilizando anticuerpos para la proteína Akt fosforilada bajo las mismas condiciones que A. Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal. **(C)** Se analizó la fosforilación de las proteínas ERK1/2 por el métodos de Western blot, en las mismas condiciones que en A.

8.2- Estudio de la participación de la cascada JNK en la muerte de las motoneuronas cultivadas en presencia de NRG- β 1 y BDNF

Cuando las motoneuronas son cultivadas en ausencia de factores tróficos, se activa la cascada de JNK (Barthelemy y col., 2004; Maroney y col., 1998; Newbern y col., 2007). Basándonos en estas observaciones, analizamos la activación de ésta cascada en las motoneuronas cultivadas en presencia de diferentes factores tróficos. Para obtener un resultado más fidedigno, se utilizaron agentes farmacológicos que inhiben a distintos niveles la cascada de JNK. En primer lugar, las motoneuronas fueron cultivadas en presencia de los distintos factores tróficos y con el inhibidor de la proteína JNK (SB600125, 5 μ M). Luego de 3 días in vitro, se procedió a determinar la sobrevivencia. La sobrevivencia de las motoneuronas cultivadas con NRG- β 1 y BDNF (simultáneamente) fue de $64\pm 5\%$, mientras que en los cultivos tratados con ambos factores tróficos y el inhibidor, fue de un $130\pm 7\%$. Este último valor, por arriba del 100%, indica que existe una subpoblación de motoneuronas que muere por la activación de esta vía incluso en los cultivos crecidos en presencia de BDNF (**Figura 1.15A**). Para corroborar este resultado, se utilizó otro inhibidor de la misma cascada pero que actúa en un nivel anterior (ver Introducción). Los cultivos fueron expuestos al inhibidor de la proteína MLK1 (CEP11004, 500 nM) siguiendo las mismas condiciones ya descritas. Como se puede observar en la **Figura 1.15B**, el inhibidor CEP11004, al igual que SB600125, previno la muerte inducida por NRG- β 1 y BDNF, así como también previno la muerte observada en

los cultivos crecidos en total ausencia de factores tróficos. Estos datos indican una participación de la vía JNK en la muerte de las motoneuronas en cultivo.

A)



B)

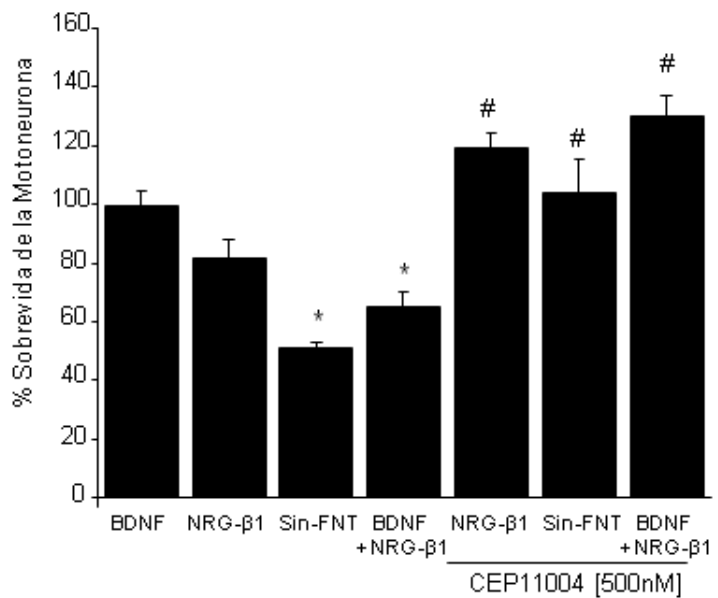


Figura 1.15: La cascada de JNK está involucrada en la muerte observada en los cultivos de motoneuronas crecidos en NRG-β1 y BDNF. Los cultivos fueron crecidos en medio sin factores neurotróficos (sin-FNT), o crecidos en 10 nM NRG-β1 y/o 1 ng/ml BDNF, en presencia de inhibidores; (A) SB600125 (5 μM), inhibidor de JNK. (B) CEP11004 (500 nM), inhibidor de MLK1. La viabilidad celular fue evaluada luego de 3 días en cultivo. Los valores se expresaron como porcentaje de los cultivos suplementados con BDNF. Las barras representan la media ± DS de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado. El análisis estadístico se realizó utilizando el test de ANOVA, luego se realizó un post-test para la comparación entre los grupos (Bonferroni), * p<0,05 comparado con los cultivos crecidos en presencia de BDNF, # p<0,05 comparado con los cultivos crecidos en presencia de NRG-β1 + BDNF.

9- Determinación del tipo de muerte celular inducida por el tratamiento de NRG- β 1 y BDNF en las motoneuronas

El cultivo de motoneuronas en ausencia de factores tróficos lleva a la activación de las vías apoptóticas de muerte celular (Estevez y col., 1998a; Haase y col., 2008; Li y col., 1996a; Milligan y col., 1994; Milligan y col., 1995; Raoul y col., 2002; Raoul y col., 1999), observándose activación de caspasas e inducción de la forma neuronal de la enzima óxido nítrico sintasa (nNOS) y la formación de peroxinitrito (Estevez y col., 2000; Estevez y col., 1998a). Debido a que la incubación de motoneuronas con NRG- β 1 y neurotrofinas (simultáneamente) produce una inhibición de la activación de la vía de Akt, la cual también está inactiva en condiciones de deprivación de factores tróficos (**Figura 1.14**), investigamos la participación de las caspasas en la muerte inducida por la NRG- β 1 y BDNF. A tal efecto, las motoneuronas fueron crecidas con los diferentes factores tróficos e incubadas en presencia del inhibidor de caspasas zVAD-fmk y del inhibidor DEVD-fmk (selectivo para la caspasa-3). Ambos inhibidores previnieron la muerte en los cultivos tratados con NRG- β 1 y BDNF, indicando que la muerte es apoptótica, como en el caso de los cultivos crecidos en ausencia de factores tróficos (**Figura 1.16**).

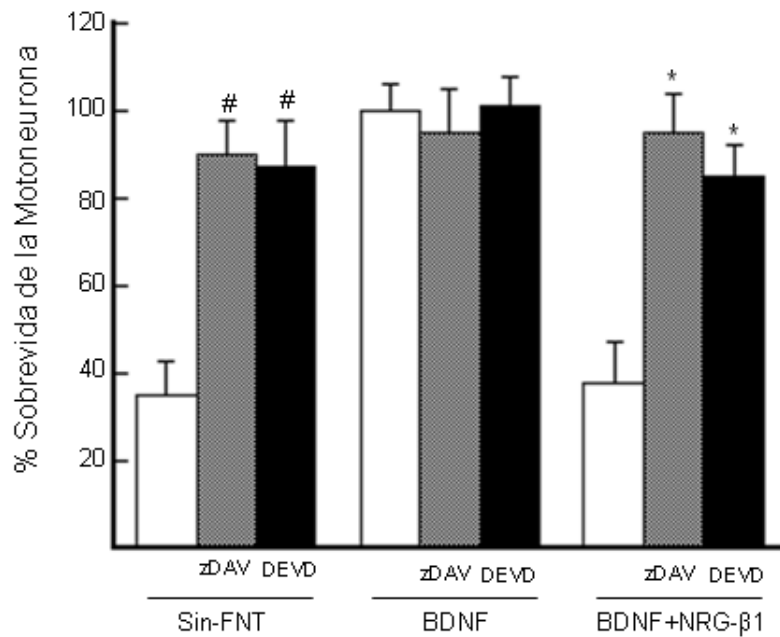


Figura 1.16: La muerte observada en las motoneuronas cultivadas en presencia de NRG-β1 y BDNF es apoptótica. Los cultivos fueron crecidos en medio sin factores (sin-FNT), o suplementado con 10 nM NRG-β1 y/o 1 ng/ml BDNF en presencia de inhibidores de caspasas: zDAV (10 μM) o DEVD (20 μM). La viabilidad celular fue evaluada a las 24 horas. Los valores se expresaron como porcentaje de los cultivos crecidos en BDNF. Las barras representan la media ± DS de tres experimentos

independientes realizados por cuadruplicado. El análisis estadístico se realizó utilizando el test de ANOVA, luego se realizó un post-test para la comparación entre los grupos (Bonferroni), * p< 0,05 comparado con los cultivos crecidos en presencia de NRG-β1 + BDNF; # p<0,05 comparado con los cultivos crecidos en medio no suplementado (sin-FNT).

10- Análisis de la inducción de la proteína nNOS y de la formación de peroxinitrito en los cultivos tratados con NRG-β1 y BDNF

La muerte de la motoneurona en ausencia de factores tróficos es por la vía apoptótica, observándose una inducción en la enzima nNOS, y un aumento en la producción de peroxinitrito, que conlleva a un aumento en las proteínas nitradas (Estevez y col., 1998a). Interesantemente, cuando las motoneuronas son cultivadas en presencia de NRG-β1 y BDNF, se desencadena una muerte apoptótica similar a la observada en ausencia de factores tróficos. Por esta razón, decidimos estudiar la expresión de la proteína nNOS y la formación de radicales libres en los cultivos tratados con NRG-β1 y BDNF.

Los cultivos fueron crecidos en presencia de NRG- β 1 y/o BDNF por 24 horas, y luego se analizó la presencia del ARN mensajero para la enzima nNOS por el método de transcripción reversa seguido de la amplificación del cDNA resultante por PCR. Como podemos observar en la **Figura 1.17A**, la cantidad de ARNm para la proteína nNOS es semejante en todos los tratamientos, salvo en los cultivos crecidos en presencia de BDNF, donde se observó una disminución de la expresión de dicho ARNm. Llamativamente, los cultivos crecidos en presencia de NRG- β 1 presentan la misma cantidad de ARNm para la proteína nNOS que los cultivos crecidos en ausencia de factores tróficos. Sin embargo, los cultivos crecidos en presencia de NRG- β 1 presentaron un aumento en la sobrevivencia del 40% con respecto a los cultivos en ausencia de factores tróficos (**Figura 1.3**). Para dilucidar esta discrepancia, analizamos la presencia de la enzima nNOS y la producción de proteínas nitradas por el método de inmunocitoquímica. La medición de las proteínas nitradas es un método indirecto para medir la producción de peroxinitrito, ya que la nitrotirosina es un marcador de la formación de peroxinitrito (Beckman, 1996a; Beckman y Koppenol, 1996; Pacher y col., 2007).

Como se puede observar en la **Figura 1.17B**, existió un aumento en la inmunoreactividad para la enzima nNOS en los cultivos crecidos en presencia de NRG- β 1, así como también en los cultivos que fueron crecidos en presencia de NRG- β 1 y BDNF. Sin embargo, sólo se observaron proteínas nitradas en los cultivos tratados con ambos factores tróficos simultáneamente (NRG- β 1 y BDNF) o crecidos en ausencia total de factores tróficos, indicando que sólo en esas condiciones se forma peroxinitrito, coincidiendo con el aumento en la muerte celular.

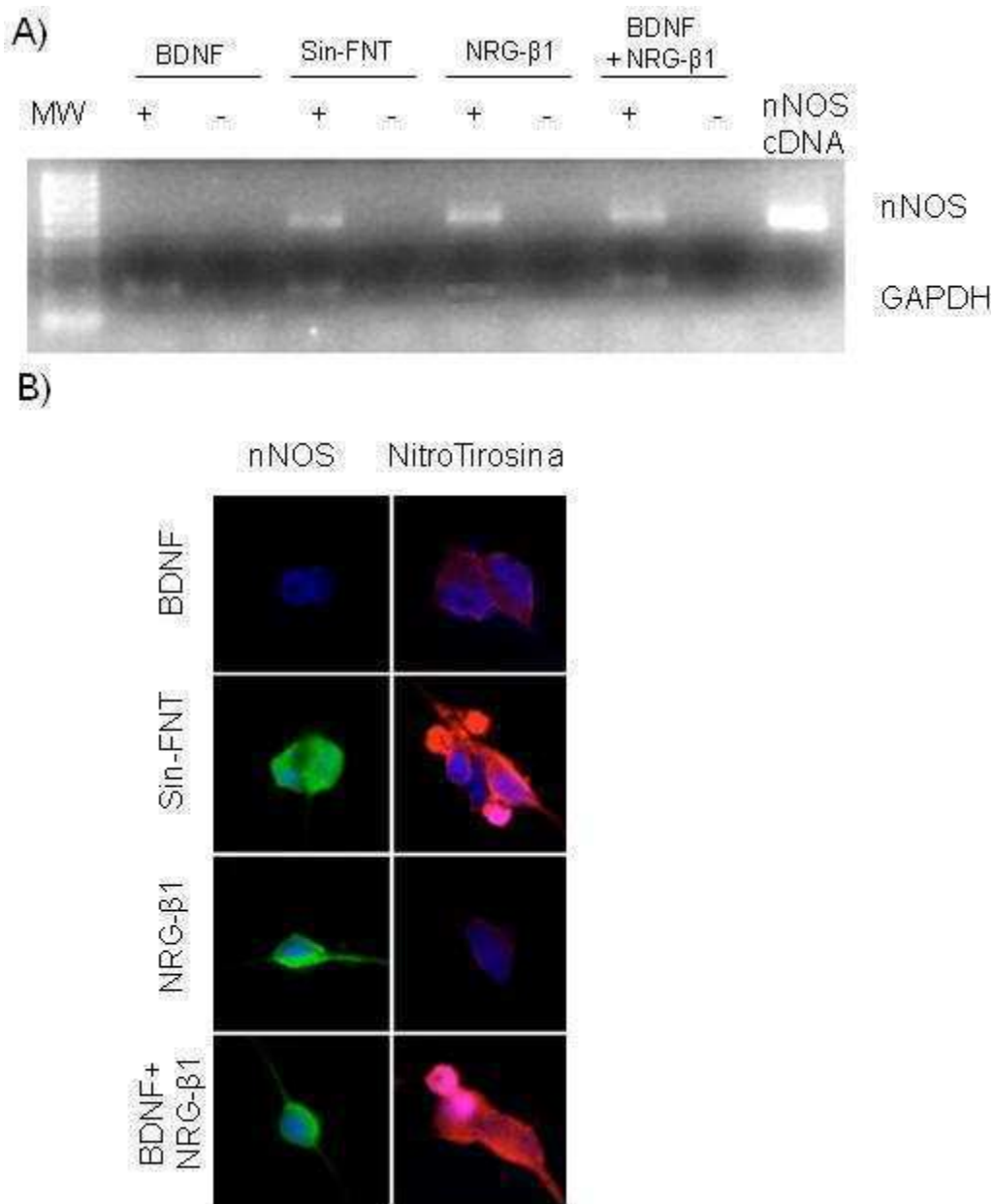


Figura 1.17: Incremento en las proteínas nitradas en los cultivos de motoneuronas crecidos en presencia de NRG-β1 y BDNF. (A) Análisis de la expresión del ARNm de la proteína nNOS. Los cultivos fueron crecidos en presencia de 10 nM NRG-β1 y/o 1 ng/ml BDNF. Luego de 24 horas en cultivo, se extrajo el ARN y se analizó la expresión del ARNm para la proteína nNOS por el método de RT-PCR. La señal para la nNOS es observada como una banda de 602 pb. Se utilizó la proteína GAPDH como control de siembra (100 pb). La reacción fue hecha en presencia (+) o ausencia (-) de la proteína transcriptasa reversa. La imagen corresponde a un experimento representativo realizado por triplicado. (B) Los cultivos fueron crecidos en las mismas condiciones que A. La inmunocitoquímica se realizó con anticuerpos específicos para nNOS y para la detección de nitrotirosina, Los anticuerpos secundarios están conjugados con los fluoróforos fluoresceína y rodamina respectivamente. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes, obtenidas en microscopio confocal.

Para corroborar la participación del óxido nítrico y las especies reactivas del nitrógeno en la muerte observada en los cultivos incubados con NRG- β 1 y BDNF, se utilizaron 1) nitro-L-arginina metil ester (L-NAME), el cual es un inhibidor de la enzima NOS y 2) MnTBAP, un agente antioxidante que es permeable a la membrana plasmática y no sólo compete con el óxido nítrico por el superóxido (agente mimético para la enzima SOD), sino que también es capaz de catalizar la isomerización del peroxinitrito a nitrato (Batinic-Haberle y col., 2009). Los cultivos fueron incubados con los distintos factores tróficos y suplementados con 100 μ M L-NAME o 100 μ M MnTBAP por tres días. Como se puede observar en la **Figura 1.18**, tanto la inhibición de la proteína NOS como la degradación de los radicales libres y oxidantes por MnTBAP, previnieron la muerte observada en los cultivos incubados con NRG- β 1 y BDNF.

En síntesis, los cultivos incubados con NRG- β 1 y BDNF muestran una inducción de la enzima nNOS, con un aumento en las proteínas nitradas y un aumento en la muerte celular por vía apoptótica cuando son comparados con los cultivos crecidos con uno de los factores por sí solos. Todas estas características son observadas también en los cultivos crecidos en ausencia de factores tróficos, observándose una similitud en la manera de desencadenar la muerte celular en las motoneuronas.

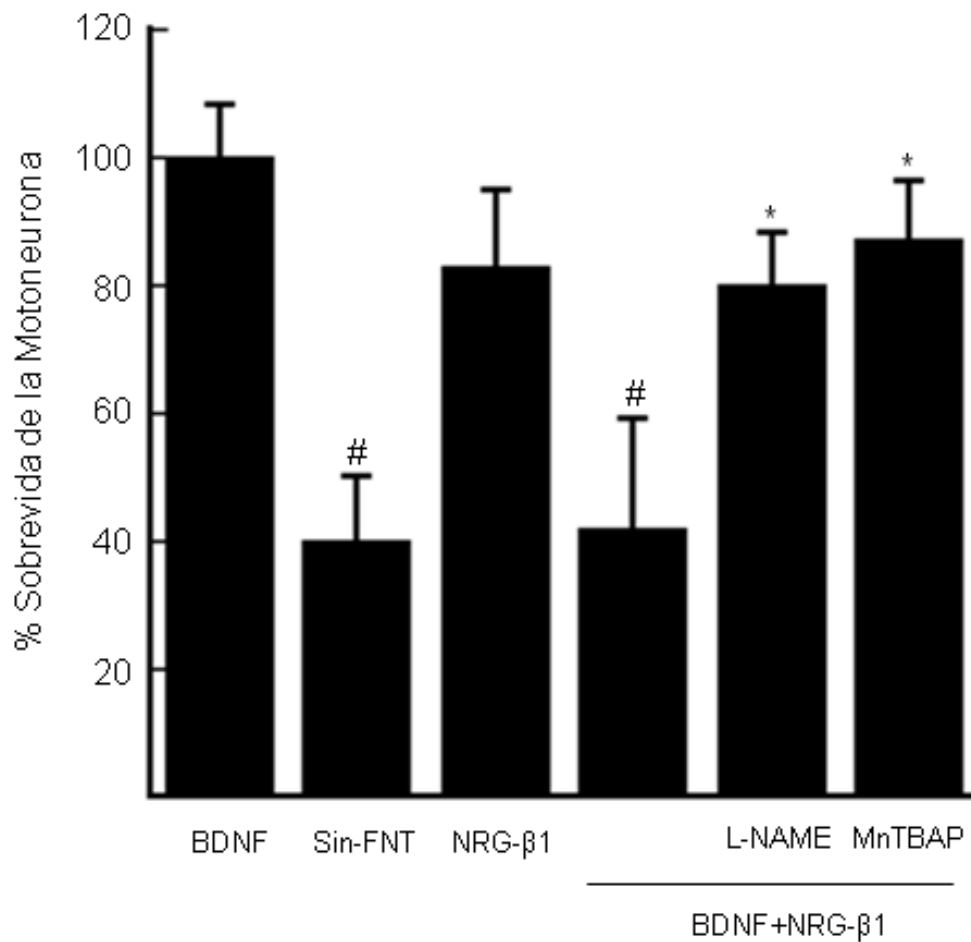


Figura 1.18: La inhibición de la producción de óxido nítrico o del peroxinitrito previene la muerte en los cultivos crecidos en presencia de NRG-β1 + BDNF. Los cultivos fueron crecidos en medio sin factores neurotróficos (sin-FNT), o suplementados con 10 nM NRG-β1 y/o 1 ng/ml BDNF, en presencia de inhibidor de la enzima NOS (L-NAME, 100 μM) o en presencia de MnTBAP (100 μM). La viabilidad celular fue evaluada a las 24 horas de cultivo. Los valores se expresaron como porcentaje de los cultivos suplementados con BDNF. Las barras representan la media ± DS de tres experimentos independientes realizados por duplicado. El análisis estadístico se realizó utilizando el test de ANOVA, luego se realizó un post-test para la comparación entre los grupos (Bonferroni), * p<0,05 comparada con los cultivos crecidos en presencia de NRG-β1 + BDNF; # comparado con los cultivos crecidos en presencia de BDNF.

Discusión

Desde la descripción de Hamburger en 1939 de que ciertos factores derivados del músculo tienen actividad trófica sobre las motoneuronas (Hamburger, 1934; Hamburger, 1939), se han identificado más de doce factores de crecimiento diferentes que participan en la supervivencia de la motoneurona (Oppenheim, 1996). Curiosamente, la familia de las neuregulinas, originalmente descritas como ARIA (Fischbach, 1972; Fischbach y Rosen, 1997; Frank y Fischbach, 1979; Jessell y col., 1979) no había sido estudiada en el contexto de la supervivencia de las motoneuronas.

Las neuregulinas se expresan tanto en las motoneuronas como en otras células relacionadas con éstas (células de Schwann, músculo liso y astrocitos), tanto en la etapa embrionaria como en células y tejidos maduros (Carroll y col., 1997; Corfas y col., 1995; Kim y col., 1999; Meier y col., 1998; Meyer y col., 1997; Raabe y col., 1996; Rosenbaum y col., 1997; Tokita y col., 2001). La expresión de las neuregulinas en las células de Schwann y en las médulas espinales de rata comienza a los 10-12 días de gestación y continúa durante toda la embriogénesis (Loeb y Fischbach, 1997; Meyer y col., 1997). La coincidencia en el período de expresión de las neuregulinas con la ocurrencia de la muerte celular programada en el desarrollo, sugiere su participación en este proceso fundamental. En esta tesis de doctorado demostramos que las motoneuronas expresan los receptores para la neuregulina “ErbB” durante el mismo período del desarrollo de su muerte celular programada (E15). Nuestra observación confirma los datos de hibridización *in situ*, que demuestran la presencia del mensajero del receptor ErbB4 en las médulas espinales ventrales de rata de edad gestacional de 16 días (Lindholm y col.,

2002). La inmunoreactividad para dichos receptores también está presente en las motoneuronas de las médulas espinales ventrales de ratas adultas (Pearson y Carroll, 2004). Llamativamente, los ratones deficientes en el receptor ErbB3 presentan una reducción de un 79% en el número de motoneuronas, un efecto originalmente atribuido a la muerte de las células de Schwann (Rietmacher y col, 1997), pero que los resultados de esta tesis ponen en una perspectiva diferente.

En esta tesis también demostramos que la NRG- β 1 promueve la supervivencia de cultivos puros de motoneuronas por 7 días, a concentraciones similares a las de otros factores de crecimiento, como el factor de crecimiento neuronal de ciliario (CNTF), y la cardiotrofina 1 (CT-1) (Arakawa y col., 1990; Henderson y col., 1994; Hughes y col., 1993). Además, concentraciones de neuregulinas similares a las utilizadas en nuestros experimentos protegen a las células PC12 de la apoptosis (Erlich y col., 2001) y son neuroprotectoras en modelos celulares de isquemia (Crosland y col., 2008).

La neuregulina estaría promoviendo la supervivencia de las motoneuronas en los cultivos a través de los receptores ErbB, ya que se pudo observar la fosforilación del receptor ErbB2 en respuesta a 10 nM de NRG- β 1. Si bien el receptor ErbB4 puede formar un homodímero que tiene actividad biológica, ésta es muy débil. Por otro lado, el receptor ErbB2 es el receptor con mayor actividad biológica cuando se une a otros receptores formando heterodímeros (Lee y col., 1995; Meyer y Birchmeier, 1995). Como se describe en la Introducción, el receptor ErbB2 no posee ligando conocido, por lo que la NRG- β 1 no podría estar activando al ErbB2 directamente (Citri y col., 2003; Peles y col., 1993; Tzahar y col., 1994). Basándonos en los datos de la literatura sobre los receptores ErbB, nuestros resultados indicarían que es necesaria la formación de un

heterodímero entre el receptor ErbB2 y los otros receptores (ErbB3 y ErbB4). En la **Figura 1.2** se observa que no todas las motoneuronas expresan el receptor ErbB2, sugiriendo que no todas las células tienen la capacidad de tener una respuesta biológica directa al tratamiento con neuregulina. Por este motivo, la protección observada con la neuregulina sería menor a la observada con otro factor de crecimiento como el BDNF, ya que solamente una subpoblación celular tiene la capacidad de responder al tratamiento.

El complejo neuregulinas-receptores ErbB ejerce su acción principalmente por dos vías de señalización: la vía MAPK/ERK1/2 y la vía PI3K/Akt. La vía ERK1/2, mediada por Ras y Shc, está relacionada con la diferenciación y la proliferación celular. La vía PI3K/Akt está relacionada con la supervivencia celular, protegiendo a las células de la apoptosis (Di Segni y col., 2006; Di Segni y col., 2005; Ritch y col., 2005), particularmente importante en motoneuronas (Dolcet y col., 1999b; Soler y col., 1999a). Esta capacidad dual de las neuregulinas está determinada por múltiples factores, entre los que se encuentran el tipo celular, la isoforma de neuregulina implicada, la concentración del ligando, el tipo de receptor con el que interacciona, su combinación con otros receptores y la intensidad y duración del estímulo (Stove y Bracke, 2004).

En esta tesis, los factores que afectan las diferentes activaciones de las vías de señalización son los tipos de receptores con los que interactúa la neuregulina y su combinación, ya que el tipo celular es homogéneo y utilizamos la región del dominio para el EGF (NRG- β 1) en todos los tratamientos experimentales. Nuestros resultados demuestran que existe una activación de las dos cascadas de señalización (ERK1/2 y PI3K). Si bien se observó un aumento en la fosforilación de la proteína ERK1/2, esta cascada no estaría jugando un rol en la supervivencia de las motoneuronas crecidas en

presencia de neuregulina, ya que los inhibidores selectivos para dicha cascada no modificaron la sobrevivencia de las motoneuronas. Por el contrario, las motoneuronas que fueron crecidas en ausencia de factores tróficos dependen de la activación de MEK para sobrevivir, ya que la preincubación con los inhibidores para la proteína MEK potenció la muerte de motoneuronas en ausencia de factores tróficos (**Figura 1.8B**).

Por otro lado, los inhibidores de la proteína PI3K disminuyeron la sobrevivencia de las motoneuronas crecidas en presencia de NRG- β 1, indicando que esta cascada sería necesaria para que la NRG- β 1 ejerza su acción protectora. De particular interés resultó la observación de que la fosforilación de la proteína Akt no se vió aumentada en los cultivos expuestos a NRG- β 1 sólo, pero disminuyó después del tratamiento simultáneo de los cultivos con NRG- β 1 y BDNF, sugiriendo que la neuregulina ejerce su acción protectora a través de la vía PI3K, pero independientemente de la activación de Akt. Otra posibilidad es que el nivel de activación de Akt sea menor en los cultivos crecidos en NRG- β 1 que en los crecidos en BDNF, siendo indetectable con las técnicas utilizadas. Finalmente, existe la posibilidad de que no hayamos detectado la activación de Akt debido a una fosforilación transiente de Akt. En otras palabras, la señal podría no ser sostenida en el tiempo y, por lo tanto, ser indetectable en el tiempo analizado. Sin embargo, las limitaciones metodológicas impiden realizar una curva de tiempo extensa usando cultivos puros de motoneuronas. De una u otra manera, hay que destacar que la cascada desencadenada por la neuregulina para la sobrevivencia de las motoneuronas es diferente que la activada por las neurotrofinas o el GDNF (Dolcet y col., 1999a; Namikawa y col., 2000; Soler y col., 1999b), ya sea porque involucra otra proteína río

abajo de PI3K, o porque produce una activación con distinta intensidad o duración en la proteína Akt.

En la literatura se ha descrito que las motoneuronas tienen una sobrevivencia óptima cuando son cultivadas con extractos de músculo o medios condicionados de músculo (Milligan y col., 1994; Oppenheim, 1996). Por otro lado, también aumenta su sobrevivencia cuando son cultivadas con medios condicionados provenientes de astrocitos o de células de Schwann (Arce y col., 1998). Todas estas condiciones poseen una mezcla de factores tróficos, indicando que la combinación de factores podría ser necesaria para la óptima sobrevivencia de las motoneuronas. La combinación de ciertos factores tróficos produce un efecto sinérgico en la sobrevivencia de las motoneuronas en cultivo, como es el caso de las motoneuronas cultivadas en presencia de GDNF y CT-1 (Arce y col., 1998), o las cultivadas en presencia de BDNF y GDNF (Hanson y col., 1998). En este contexto, el tratamiento simultáneo con NRG- β 1 y GDNF produjo un efecto sinérgico en la sobrevivencia de las motoneuronas (**Figura 1.9**). Estos resultados sugieren que NRG- β 1 y GDNF no ejercen su acción en dos subpoblaciones distintas, sino que integran señales de distintas cascadas de señalización, promoviendo una mayor protección celular. Si bien en esta tesis no estudiamos la vía de señalización que activa el GDNF, existen trabajos previos que demostraron que el GDNF ejerce su acción en la sobrevivencia de la motoneurona por la vía PI3K/AKT; específicamente, el GDNF promueve la sobrevivencia de las motoneuronas de pollo mediante la activación de la vía PI3K/Akt (Dolcet y col., 1999a; Namikawa y col., 2000; Soler y col., 1999b). En esta tesis demostramos que la NRG- β 1 activa la vía PI3K, aunque no observamos la activación de Akt con los métodos utilizados. En este punto, podemos inferir que aún cuando los dos factores estarían actuando sobre la misma vía, lo

harían de una manera distinta, y que por diferencias temporales, cuantitativas o por el reclutamiento o activación de diferentes proteínas intermediarias, producirían una respuesta biológica diferencial, aumentando la sobrevivencia de las motoneuronas.

En contraste con el efecto sinérgico entre la NRG- β 1 y GDNF, el tratamiento simultáneo con NRG- β 1 y BDNF, un miembro de las neurotrofinas, produjo una menor sobrevivencia de las motoneuronas que el de los dos factores por separado. En otras palabras, el cultivar las motoneuronas en presencia de NRG- β 1 y BDNF activó la muerte apoptótica, ya que este efecto fue revertido por inhibidores de caspasas. Esta observación se extendió para todos los miembros de la familia de las neurotrofinas (NT-3, NT-4, NGF), siendo de particular interés el resultado obtenido con el NGF, ya que las motoneuronas no expresan el receptor TrkA (Henderson y col., 1993), dato que fue confirmado en nuestros cultivos (**Figura 1.11**). Este resultado indicaría que el receptor p75^{NTR} estaría involucrado en la apoptosis activada por NRG- β 1 y BDNF, ya que en ausencia de TrkA, éste es el único receptor para el NGF. Efectivamente, cuando los cultivos fueron crecidos con NRG- β 1 y BDNF en presencia de un anticuerpo que bloquea la acción del receptor p75^{NTR} (Yoon y col., 1998), se observó una protección de la viabilidad celular de las motoneuronas similar a la obtenida en los cultivos crecidos solamente con BDNF. Para corroborar estos resultados, se disminuyó la expresión del receptor p75^{NTR} con unas secuencias antisentido para el ARN mensajero del receptor p75^{NTR}, obteniéndose resultados similares a los del anticuerpo anti-p75^{NTR} bloqueante de actividad (**Figuras 1.12 y 1.13**). En este punto, cabe destacar que Taylor y colaboradores describieron que el medio condicionado de músculo posee un efecto dual en la sobrevivencia de las motoneuronas; a bajas concentraciones protege de la muerte, mientras que a altas

dosis pierde su efecto protector. Además, cuando las motoneuronas son cultivadas en presencia de medio condicionado de músculo y el anticuerpo anti- p75^{NTR}, se observa una mayor protección celular, indicando que en el extracto de músculo existe un factor que afecta negativamente la supervivencia de la motoneurona, y que su efecto es ejecutado vía el receptor p75^{NTR} (Taylor y col., 2007a). Por otro lado, Wiese y colaboradores observaron que el NGF antagoniza el efecto del BDNF en la supervivencia de las motoneuronas, siendo éste concentración dependiente. Sin embargo, el NGF no afecta la supervivencia cuando los cultivos son crecidos con GDNF o CNTF, demostrando una dependencia del receptor p75^{NTR} en la supervivencia ejercida por el BDNF (Wiese y col., 1999). En concordancia con estos resultados, los cultivos crecidos en BDNF en presencia del anticuerpo anti- p75^{NTR} presentaron una disminución en la supervivencia, indicando que el receptor p75^{NTR} es necesario y determinante en la supervivencia ejercida por el BDNF en las motoneuronas (**Figura 1.12**). Además, las motoneuronas provenientes de ratones deficientes en el receptor p75^{NTR} necesitan una concentración mayor de BDNF para sobrevivir, sugiriendo que en condiciones fisiológicas, el p75^{NTR} ejerce primariamente una función como componente del complejo TrkB, aumentando la afinidad y especificidad por el BDNF (Wiese y col., 1999). Tanto nuestro trabajo como los trabajos de Taylor y Wiese, entre otros, indican una alta complejidad en las respuestas obtenidas por la activación del receptor p75^{NTR}, siendo en el caso de las motoneuronas diferente a las respuestas de otras poblaciones neuronales. Por ejemplo, los ratones deficientes del receptor p75^{NTR} (“knock out”) tienen menos motoneuronas en el núcleo facial, pero poseen un mayor número de neuronas colinérgicas en el pro-encéfalo basal (Ferri y col., 1998; Van der Zee y col., 1996; Yeo y col., 1997). Las motoneuronas expresan altos niveles del receptor p75^{NTR}

durante el desarrollo (Ernfors y col., 1989) y sus niveles van disminuyendo durante la etapa posnatal, siendo muy bajos en los adultos. La expresión del receptor p75^{NTR} aumenta en ciertas patologías, entre ellas la ELA (Kerkhoff y col., 1991; Seeburger y col., 1993).

Como ya se describió en la Introducción, las neurotrofinas son agentes muy particulares, ya que ejercen su acción uniéndose a dos tipos distintos de receptores, los receptores tirosina kinasas Trk, y el receptor p75^{NTR}, que pertenece a la familia de los receptores de la muerte (TNFR). Estos receptores activan mecanismos celulares opuestos, como la supervivencia en el caso de los receptores Trk, o la muerte celular en el caso del receptor p75^{NTR}. Sin embargo, esta descripción de acciones antagónicas es una simplificación incorrecta, ya que nos deberíamos referir a éstos como un sistema de señalización integrado, en el cual ligando, receptores y proteínas blanco intracelulares coexisten en un balance molecular que activa (o inhibe) una vía de supervivencia o una vía de muerte celular. A esta ya compleja interacción, se le debería agregar la influencia ejercida por otros mecanismos celulares activados en las mismas células. En el caso específico del receptor TrkB, existe una interacción con el p75^{NTR}. Si bien, tanto el BDNF como el NT-4/5 activan el receptor TrkB, la especificidad de TrkB por la neurotrofina BDNF es incrementada por la presencia del receptor p75^{NTR}, indicando que existe una modulación del receptor TrkB por el receptor p75^{NTR} (Wiese y col., 1999) (**Figura I.2**). La expresión del receptor p75^{NTR} no fue afectada por la NRG-β1. Sin embargo, NRG-β1 sí aumentó la expresión del receptor TrkB, contrario al efecto producido por el BDNF (**Figura 1.11**). Estos resultados indican un desequilibrio en la relación entre la expresión de los receptores TrkB y p75^{NTR} que podría afectar la interacción entre los dos receptores y

desencadenar una activación diferencial en sus cascadas de señalización. Esta interpretación explica las observaciones de que la sobrevivencia de las motoneuronas es diferente cuando son crecidas en neuregulinas y/o neurotrofinas. Notablemente, la proteína Akt no se activó (fosforilación) en los cultivos crecidos en NRG- β 1 y BDNF. Como la activación de Akt por BDNF promueve la sobrevivencia, estos resultados sugieren que la NRG- β 1 impide la acción de sobrevivencia de la vía BDNF-TrkB- PI3K-Akt (**Figura 1.14**).

Un aumento en los niveles de expresión de TrkB podría llevar a una mayor formación de homodímeros sin el receptor p75^{NTR}, generando un complejo que tiene menor especificidad y afinidad por el BDNF (**Figura I.2**). Por otro lado, si hay diferencias en el movimiento lateral de la membrana plasmática, ya sea por el aumento en los niveles de receptores o por la formación de complejos de receptores ErbB, podría estar predisponiendo a una formación de homodímeros de p75^{NTR}, desencadenando de esta manera una activación del dominio de muerte, ya que se ha descrito que la proteína TRAF interactúa preferentemente con el p75^{NTR} en éste estado (Ye y col., 1999). Cabe destacar en este punto que las neuregulinas desencadenan una respuesta específica en las motoneuronas que afecta la señal activada por las neurotrofinas, ya que las neurotrofinas no tienen una interacción negativa con otros factores previamente estudiados (Hanson y col., 1998; Henderson y col., 1993; Hughes y col., 1993; Pennica y col., 1996).

Tanto en los cultivos crecidos en ausencia de factores tróficos, así como también en los cultivos donde se activaron los receptores de muerte (TNFR1, Fas y p75^{NTR}) se induce una muerte apoptótica, observándose un aumento en la nNOS y en la inmunoreactividad para la nitrotirosina (Estevez y col., 1998a; Pehar y col., 2004b; Raoul

y col., 1999). En esta tesis demostramos que la NRG- β 1 aumenta la expresión de la proteína nNOS en las motoneuronas, generando un aumento en el óxido nítrico. Este aumento del óxido nítrico no sería tóxico para las motoneuronas como se observó en otras condiciones (Estevez y col., 1998b; Pehar y col., 2006). Sin embargo, en los cultivos crecidos en presencia de NRG- β 1 y BDNF se indujo la expresión de la enzima nNOS y hubo un aumento de las proteínas nitradas (índice de la presencia de superóxido y posterior formación de peroxinitrito), desencadenándose una muerte celular que depende tanto del óxido nítrico, como de la formación de peroxinitrito, ya que se previno con L-NAME y MnTBAP. El aumento de la producción de óxido nítrico estaría directamente relacionado con la presencia de NRG- β 1, y el aumento del superóxido provendría de la activación de la vía p75^{NTR}, ya que en condiciones similares la producción de superóxido en mitocondrias está aumentada (Pehar y col., 2007). La nitración de proteínas generalmente se utilizaba como un indicador de la presencia de peroxinitrito. Sin embargo, actualmente se considera que la nitración de determinadas proteínas tiene un rol biológico en condiciones fisiológicas o patológicas, como la muerte celular programada o apoptosis. Específicamente, la presencia de 3-nitro-L-tirosina es tóxica en los cultivos de motoneuronas (Peluffo y col., 2004). Aquí demostramos que la muerte desencadenada en los cultivos crecidos en NRG- β 1 y BDNF es dependiente de la activación de la cascada de señalización JNK (**Figura 1.15**), similar a lo observado en las motoneuronas que fueron crecidas en ausencia de factores tróficos (Glicksman y col., 1998; Maroney y col., 1998). En estas últimas condiciones, la muerte es dependiente de la activación de FasR (Raoul y col., 2000). Sin embargo, la muerte producida por el Fas-L es independiente de la activación de la cascada de señalización JNK en motoneuronas

(Raoul y col., 2002). Estos datos indican por un lado, un mecanismo común entre la muerte inducida por la presencia de NRG- β 1 y BDNF y la muerte inducida por la ausencia de factores neurotróficos y, por otro lado, que la vía de JNK está involucrada en la muerte de la motoneurona en un paso anterior a la liberación de Fas-L. Queda por determinar aún si la vía Fas-L/FasR participa en la muerte celular desencadenada en los cultivos crecidos en NRG- β 1 y BDNF.

Como hemos descrito, la combinación de factores tróficos aumenta la sobrevivencia de las motoneuronas, siendo un solo factor insuficiente para rescatar a todas las motoneuronas. Por otro lado, se podría hipotetizar que debido a que el cultivo de motoneuronas se obtiene en la edad gestacional, cuando ocurre la muerte celular programada (E15), cierta población de motoneuronas estaría ya predeterminada para la muerte apoptótica. De esta manera, cuando se inhibe la vía de JNK se obtiene una mayor sobrevivencia que en los cultivos crecidos con BDNF, arbitrariamente considerados como el 100% (**Figura 1.15**). Esta muerte podría ser independiente de la apoptosis, ya que cuando se utilizan inhibidores de las caspasas se revierte la muerte a los niveles obtenidos en los cultivos crecidos en presencia de BDNF.

En resumen, nuestros datos indican que los mecanismos celulares y moleculares que controlan la sobrevivencia o la activación de las vías de señalización que llevan a la muerte en las motoneuronas están estrechamente controlados, y no sólo dependen de la presencia de ciertos factores tróficos o la ausencia de ellos, sino que están controlados a diferentes niveles, empezando por la proporción de receptores, el movimiento lateral de la membrana plasmática, la inducción de ciertas proteínas que llevan a un aumento en las especies reactivas de oxígeno o del nitrógeno, y el reclutamiento de las proteínas que

intervienen en las vías de señalización. El receptor p75^{NTR} es un componente fundamental en esta regulación, ya que la modificación en las tirosinas de uno de los ligandos (NGF) de dicho receptor modifica la toxicidad para las motoneuronas (Pehar y col., 2006), el extracto de músculo produce una toxicidad en los cultivos de motoneuronas a través de la activación de p75^{NTR}, pero independiente del NGF (Taylor y col., 2007a). Y es necesaria para desatar la muerte de las motoneuronas crecidas en presencia de NRG-β1 y BDNF.

CAPÍTULO II

Rol del peroxinitrito y la nitrotirosina en la muerte de la motoneurona

Resultados

Nuestros hallazgos y observaciones previas de otros laboratorios indican que tanto el aumento de la enzima nNOS como el de proteínas nitradas en tirosina conformarían pasos críticos en la determinación de la muerte por apoptosis de las motoneuronas. En particular, los cultivos crecidos en ausencia de factores tróficos así como los cultivos tratados con neuregulinas y neurotrofinas registraron un aumento en la enzima nNOS, que conlleva a un aumento en la nitración de las proteínas, indicando la posible formación de peroxinitrito (**Capítulo I**). La formación de peroxinitrito depende primariamente de la presencia conjunta del superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y de óxido nítrico ($\bullet NO$). En este sentido, se estableció que la muerte de las motoneuronas es revertida tanto por inhibidores de la enzima nNOS, que reducen los niveles de óxido nítrico celular, así como también por compuestos que aumentan la velocidad de degradación y disminuyen los niveles de estado estacionario del radical superóxido (scavengers de radicales libres); resultando en una disminución de la formación de peroxinitrito ($ONOO^-$). El mismo mecanismo se activa en la muerte apoptótica de las motoneuronas en diferentes modelos in vivo. Sin embargo, aunque la formación de $ONOO^-$ se ha mencionado como ejecutor de las cascadas de señalización celular, que lleva a la muerte apoptótica de las

motoneuronas, el rol de la nitratirosina no ha sido estudiado. Más aún, el mecanismo por el cual ocurre la nitración de los residuos de tirosina en esas condiciones y la relevancia del peroxinitrito aún no han sido definidos.

1- Prevención de la muerte apoptótica con péptidos que contienen tirosina

Basándonos en lo antes mencionado, hipotetizamos que la modificación de residuos de tirosina por peroxinitrito u otras especies reactivas del nitrógeno en una variedad de proteínas, desempeña un papel primordial en la estimulación de la muerte de las motoneuronas por apoptosis. Para demostrar esta hipótesis, utilizamos un componente para introducir intracelularmente péptidos que contienen tirosina en su secuencia con la intención de que compitan con los residuos de tirosina endógenos susceptibles de ser nitrados. De esta manera, si la muerte de las motoneuronas está relacionada con la nitración de residuos de tirosina en las proteínas, la disminución de la nitración endógena protegería a las células de la muerte apoptótica.

Para testear nuestra hipótesis experimentalmente, utilizamos cultivos de motoneuronas crecidos en ausencia de factores tróficos ya que el mecanismo desencadenado de muerte celular requiere de la producción de $\cdot\text{NO}$ y $\text{O}_2\cdot^-$, lo cual es seguido por la formación de nitrotirosina. Estas mismas características se observan en la muerte inducida por la incubación simultánea con NRG- β 1 y BDNF.

Los péptidos analizados en primera instancia fueron tetra y pentapéptidos conteniendo en su secuencia distintas combinaciones de aminoácidos (**Tabla 2.1**). La

secuencia de los péptidos fue optimizada a partir de secuencias que son nitradas in vivo. El péptido RYEYA fue diseñado luego del análisis de la secuencia nitrada en la proteína neurofilamento L (Crow y col., 1997b), prediciendo una alta probabilidad de nitración. La secuencia del péptido EYTA provee un carga neta diferente, pudiéndose analizar el aporte de esta característica en la eficacia o potencia de nitración (Sacksteder y col., 2006). Para facilitar la internalización de los péptidos, se utilizó un agente (Chariot) que forma una unión no-covalente con los péptidos y atraviesa la membrana citoplasmática a través de un mecanismo de transporte pasivo. En el citoplasma, el complejo se disocia liberando los péptidos. Los cultivos de motoneuronas crecidos en ausencia de factores tróficos fueron tratados con concentraciones crecientes de los péptidos previamente incubados con Chariot, y la viabilidad celular se determinó por conteo celular 24 horas después. Se consideró 100% a los cultivos crecidos en presencia de factores tróficos (ver Materiales y Métodos). Como podemos observar en la **Figura 2.1**, los péptidos conteniendo tirosina protegen a las motoneuronas de la muerte apoptótica en una manera concentración dependiente, mientras que los péptidos que no contienen tirosina en su secuencia no ejercen ningún efecto. Cuando los cultivos fueron crecidos en presencia de 500 μM de RYEYA, se observó una protección del $73 \pm 5\%$ ($n=3$). Sin embargo, la protección de la secuencia EYTA a la misma concentración fue de tan solo $55 \pm 2\%$ ($n=3$). Existe una diferencia en la concentración efectiva 50 (CE_{50}), siendo en un caso 100 μM , mientras que en el otro es 500 μM .

Tabla 2.1

Nomenclatura 1 letra	Secuencias de Aminoácidos
RYEYA	Arginina-Tirosina-Acido Glutámico-Tirosina-Alanina
RFEFA	Arginina-Fenilalanina-Acido Glutámico-Fenilalanina-Alanina
EYTA	Acido Glutámico-Tirosina-Treonina-Alanina
EFTA	Acido Glutámico-Fenilalanina-Treonina-Alanina
YYY	Tirosina-Tirosina-Tirosina
YY	Tirosina-Tirosina
GY	Glicina-Tirosina
GF	Glicina-Fenilalanina

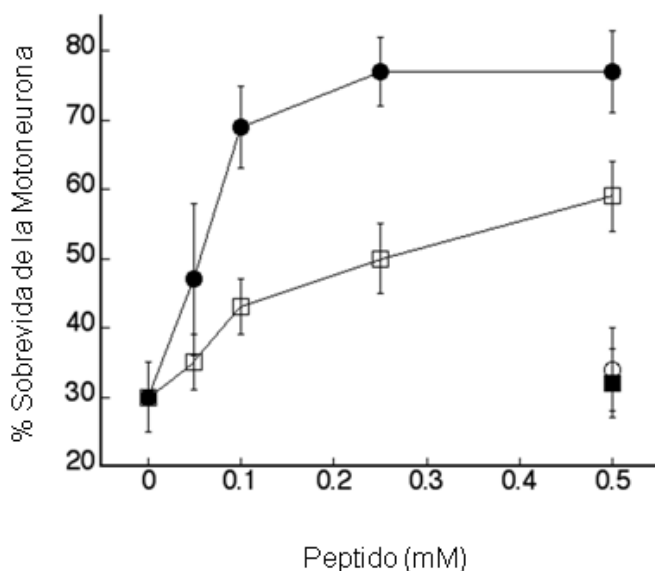


Figura 2.1: Péptidos que contienen tirosinas en su secuencia previenen la muerte apoptótica de la motoneurona. Los cultivos de motoneuronas fueron crecidos en medio sin factores neurotróficos (sin-FNT) en presencia de péptidos que poseen nitrotirosina o fenilalanina en su secuencia. La viabilidad celular fue cuantificada 24 horas más tarde. *RYEYA* (●), *RFEFA* (○), *EYTA* (□), *EFTA* (■). Los péptidos fueron previamente incubados con Chariot para facilitar su introducción a la célula. Los puntos representan la media \pm DS de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicados.

Basados en la observación previa, nos preguntamos si la mayor potencia y eficacia para la protección contra la muerte celular se debía sólo a la cantidad de tirosinas en la secuencia o si dependía de algún otro factor. Para contestar esta pregunta, utilizamos di o tripéptidos conteniendo diferentes cantidades de tirosina. Como podemos observar en la **Figura 2.2**, tanto los péptidos conteniendo una tirosina como los que tienen dos o tres tirosinas ejercen la misma protección, que es máxima alrededor de 250 μ M y tiene una CE_{50} aproximada a los 200 μ M. Los controles realizados con Chariot o

con los péptidos sólo no confirieron protección alguna; tampoco se observó protección cuando las células fueron incubadas con péptidos conteniendo nitrotirosina en lugar de tirosina. Debido a que sólo los péptidos que contienen tirosina ejercen un efecto protector y este efecto es independiente de la cantidad de tirosinas que tiene la secuencia, concluimos que la capacidad protectora de los péptidos sobre la muerte apoptótica depende sólo de la presencia de residuos de tirosina en la secuencia, y no es debida a la secuencia en sí misma o al tamaño del péptido.

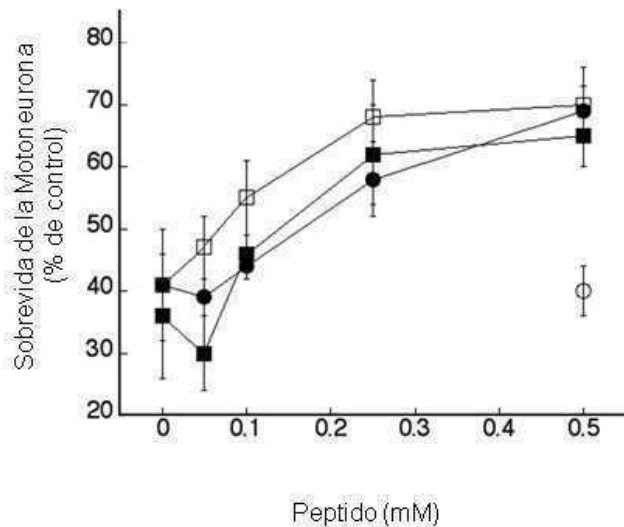


Figura 2.2: La eficiencia y la potencia de los péptidos en la prevención de la apoptosis es independiente de la longitud o secuencia de los mismos. Los cultivos fueron crecidos en medio sin factores (sin-FNT) en presencia de péptidos que poseen dos o tres nitrotirosinas en su secuencia (como control negativo se utilizó un péptido que tiene fenilalanina). La viabilidad celular fue cuantificada 24 horas más tarde. GY (●), GF (○), YY (□), YYY (■). Los péptidos fueron previamente incubados con Chariot para facilitar su introducción a la célula. Los valores representan la media \pm DS de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado.

2- El peroxinitrito causa la nitración de residuos de tirosina en los cultivos de motoneuronas crecidos en ausencia de factores neurotróficos

Ha sido establecido que cuando los cultivos de motoneuronas son mantenidos en ausencia de factores tróficos, se observa un aumento en la nitración de proteínas (Estevez y col, 1998). De la misma manera, en el Capítulo I de esta tesis, describimos un aumento de la

nitrición de proteínas cuando las motoneuronas son cultivadas en presencia de NRG- β 1 y BDNF. Sin embargo, no se ha estudiado si la fuente de esa nitrición en los residuos de tirosina es dependiente de la formación endógena de peroxinitrito. Para investigar si es éste el agente responsable del aumento de la nitrición en los cultivos de motoneuronas crecidos en ausencia de factores tróficos, medimos la intensidad de inmunofluorescencia para nitrotirosina en los cultivos luego de ser crecidos en presencia de distintos agentes que disminuyen los niveles del anión superóxido o de peroxinitrito.

Los cultivos de motoneuronas fueron crecidos en ausencia de factores tróficos por 24 horas, en presencia de agentes que causan la rápida dismutación del anión superóxido. Se usaron agentes antioxidantes que pueden mimetizar la actividad de la enzima SOD (MnTBAP, FeTCPP), además de la enzima SOD; estas condiciones tienen como objetivo disminuir, si existiera, los niveles de estado estacionario de anión superóxido. Como se puede observar en la **Figura 2.3A**, cuando los cultivos son crecidos en ausencia de factores tróficos (sin-FNT) existe un incremento de 6 veces de la inmunoreactividad para la nitrotirosina con respecto a los cultivos crecidos en presencia de factores tróficos (FNT) (media \pm DS; FNT: $2,6 \pm 0,4$, sin-FNT: $16,5 \pm 3,7$, $n=3$ $p < 0,05$). Cuando los cultivos fueron crecidos en presencia de MnTBAP o FeTCPP se observó una disminución significativa de la nitrición, llegando a niveles basales (media \pm DS; MnTBAP: $3,2 \pm 0,9$, FeTCPP: $2,7 \pm 0,5$, $n=3$). La inmunoreactividad basal se debe a la existencia de albúmina serica bovina (BSA) nitrada en el medio de cultivo. También la enzima SOD disminuyó la cantidad de nitrotirosina, pero sólo cuando se introduce en la célula en liposomas (SODi). Esta misma enzima a altas concentraciones, pero aplicada directamente en el medio (sin liposomas) (SODe), no produjo ningún efecto sobre los niveles de nitrición

(media \pm DS; SODi: 2.7 ± 0.7 , SODe: 17 ± 4.1 , n=3). Estos datos indicarían un aumento significativo de la producción endógena de peroxinitrito cuando los cultivos son crecidos en ausencia de factores tróficos. Para confirmar estos resultados, las células fueron crecidas en presencia de un inhibidor de la enzima NOS (L-NAME). Como podemos observar en la **Figura 2.3B**, la inmunoreactividad para la nitrotirosina disminuyó bajo estas condiciones (media \pm DS; L-NAME: 2.7 ± 0.5 , n=3). El efecto de la inhibición de la NOS sobre la nitración fue revertido por la incubación con un dador específico de \bullet NO (DETANONOate, 20 μ M, vida media de liberación 24 horas), indicando que una restauración de la fuente de \bullet NO genera un concomitante aumento del peroxinitrito (media \pm DS, DETANONOate: 13.9 ± 2.1 , n=3). Dicha concentración de DETANONOate (20 μ M) produce una concentración de estado estacionario de \bullet NO de aproximadamente 100 nM, medida en el medio de cultivo (Estevez y col., 1998a). Distintos mecanismos de nitración han sido descritos, algunos de ellos requieren de nitrito y otros de nitrito y de peróxido de hidrógeno. Para testear si alguno de éstos era responsable total o parcial de la formación de nitrotirosina, los cultivos de motoneuronas previamente tratados con L-NAME fueron incubados con nitrito en una concentración de 40 μ M. No se detectó un incremento en los niveles de nitrotirosina (media \pm DS; NO_2^- : 2.8 ± 0.8) Asimismo, estas condiciones en presencia de peróxido de hidrógeno (40 μ M) tampoco aumentaron los niveles de nitrotirosina ($\text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}_2$: 2.8 ± 0.3).

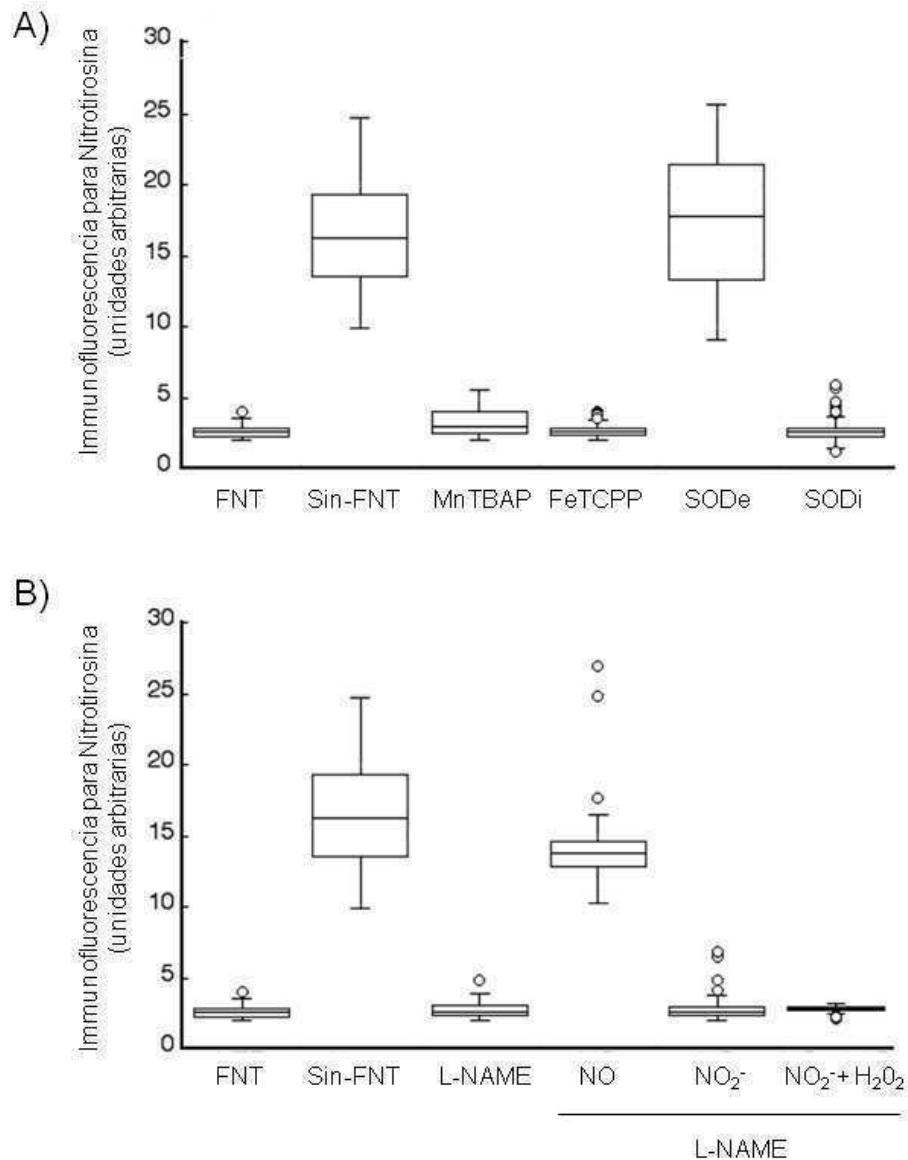


Figura 2.3: El aumento de la nitrotyrosina depende de la formación de peroxinitrito. Los cultivos fueron crecidos en medio sin-FNT o crecidos en presencia de: **(A)** MnTBAP (100 μ M); FeTCPP (10 μ M); enzima SOD introducida con liposomas a la célula (SODi) o extracelular (SODe); **(B)** L-NAME (100 μ M); DETANONOate (NO, 40 μ M); nitrito de sodio (NO₂⁻, 40 μ M); nitrito de sodio más peróxido de hidrógeno (NO₂⁻+H₂O₂, 40 μ M). Como control se utilizaron cultivos crecidos en presencia de FNT (Materiales y Métodos). Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias de fluorescencia. En el diagrama de cajas, la línea horizontal dentro de la caja representa la mediana de las muestras (Q2, 50% percentil). La línea superior e inferior de la caja representan el 75% (Q3) o 25% (Q1) percentil respectivamente. Los límites superior e inferiores fueron calculados como: Q3 + 1,5 *IQD (distancia entre los cuartiles, Q3-Q1 o Q1-1,5 *IQD, respectivamente). Los extremos de las líneas verticales que salen de la caja (bigotes) son el valor más alto y más bajo, dentro de los límites superior e inferior. Los valores que exceden los límites superior e inferior fueron graficados como puntos independientes.

Colectivamente, estos resultados permiten concluir que la nitración de los residuos de tirosina en los cultivos crecidos en ausencia de factores tróficos es mediada por el peroxinitrito y no por otros mecanismos de nitración que involucran peroxidasas (Eiserich y col., 1998) o la reducción de nitrito a óxido nítrico por medio de globulinas o de citocromo c (Basu y col., 2008; Basu y col., 2009; Shiva y col., 2007).

3- Péptidos que contienen tirosina disminuyen los niveles de nitrotirosina en los cultivos crecidos en ausencia de factores tróficos

Los péptidos que contienen tirosina en su secuencia aumentaron la sobrevivencia de los cultivos a más del 70%, comparado con los cultivos crecidos en ausencia de factores tróficos en los cuales sólo el 30% de las células sobrevive (**Figura 2.1**). Para corroborar si este efecto se correlaciona con la nitración endógena de proteínas, medimos la cantidad de proteínas nitradas cuando los cultivos fueron crecidos en presencia de péptidos que contienen tirosina (RYEYA) o su control con fenilalanina (RFEFA). Se eligió esta secuencia por ser la más eficaz en la prevención de la apoptosis (**Figura 2.1**). Las motoneuronas fueron cultivadas en ausencia de factores tróficos y en presencia de los péptidos a una concentración de 500 μ M. Como control positivo se utilizaron cultivos crecidos en presencia de factores tróficos. En la **Figura 2.4A** se observa una disminución de las proteínas nitradas cuando los cultivos son crecidos en presencia del péptido RYEYA, pero no cuando son crecidos en presencia del péptido RFEFA. La **Figura 2.4B** muestra la cuantificación del Dot blot expresado en pmoles de nitrotirosina, utilizando

concentraciones conocidas de albúmina nitrada como curva de calibración. Estos datos permiten concluir que la presencia de tirosina en los péptidos es fundamental para prevenir la nitración de las proteínas endógenas y la muerte por apoptosis.

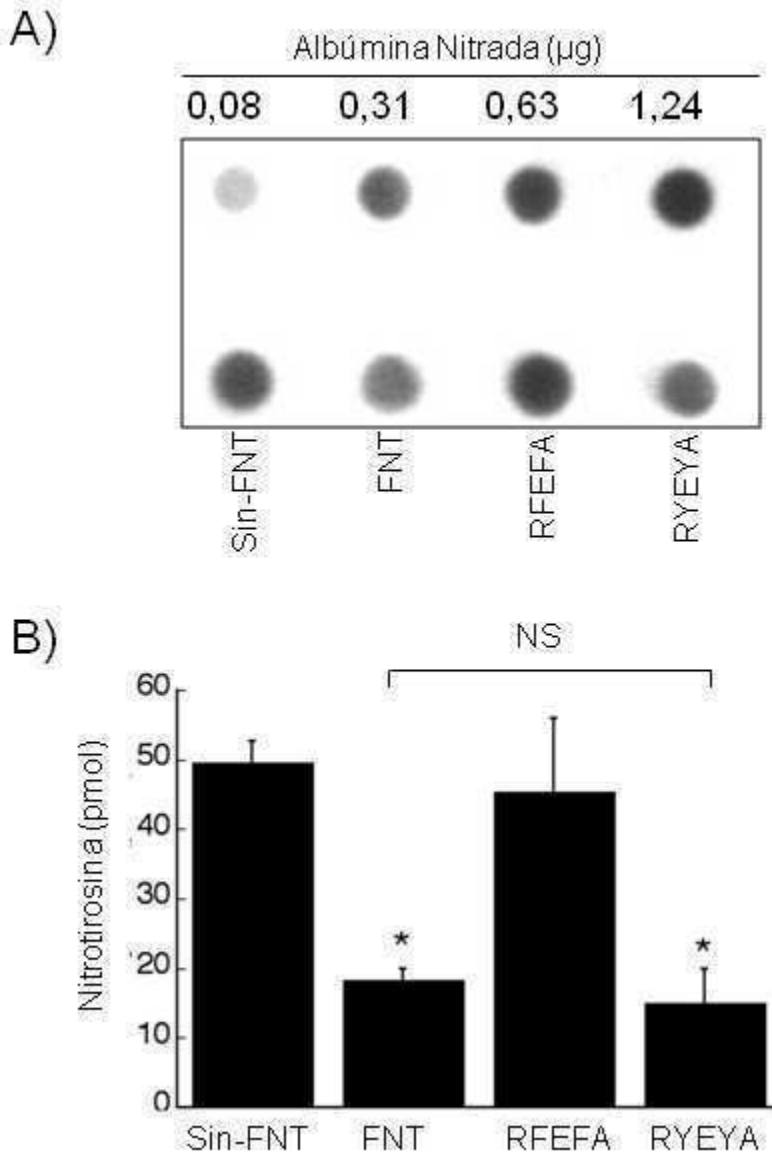


Figura 2.4: Los péptidos conteniendo nitrotirosina disminuyen la nitración de las proteínas en los cultivos de motoneuronas. Los cultivos fueron crecidos en medio sin factores (sin-FNT) en presencia de $500\mu\text{M}$ de los péptidos RYEYA o RFEFA, o en presencia de factores neurotróficos (FNT). Luego de 16 horas se midió la inmunoreactividad para la nitrotirosina por el método de Dot blot. La curva de calibración se realizó con albúmina nitrada. **A.** Dot blot representativo. Línea superior: nitroalbúmina. Línea inferior: lisados celulares. **B.** Cuantificación de los niveles de inmunoreactividad. Las barras representan la media \pm DS de cuatro experimentos independientes. Los datos fueron analizados con el test ANOVA seguidos por el test de Bonferroni para el análisis comparativo entre grupos, * $p < 0,01$ comparado con los cultivos crecidos sin factores neurotróficos (sin-TNF).

4- Medición de la cinética de descomposición del peroxinitrito en presencia de péptidos que contienen tirosinas

Con el objetivo de estudiar si los péptidos ejercen su acción anti-apoptótica a través de una reacción directa con el peroxinitrito, o lo hacen al reaccionar con los radicales derivados del peroxinitrito, estudiamos la cinética de descomposición del peroxinitrito en presencia de los diferentes péptidos. En condiciones fisiológicas de pH y en ausencia de moléculas blanco, el 30% del peroxinitrito decae en un proceso homolítico que es catalizado por protones (a través de la formación de ácido peroxinitroso), formando el radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) y el radical dióxido de nitrógeno; el 70 % restante se isomeriza directamente a nitrato (NO_3^-) (Beckman y col., 1990; Beckman y Koppenol, 1996; Radi y col., 1991; Radi y col., 2001). En nuestros experimentos, medimos la cinética de descomposición del peroxinitrito en presencia de los diferentes péptidos bajo la condición de pseudo primer orden (pH $7,36 \pm 0,03$; 37°C). El peroxinitrito (0.5 mM) decayó siguiendo una cinética de primer orden, con una constante (k') $1,13 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$. La velocidad de descomposición del peroxinitrito no fue afectada por la presencia de ninguno de los péptidos, independientemente de que posean tirosina o fenilalanina (**Figura 2.5A, Tabla 2.2**). Este resultado indica que el peroxinitrito no reacciona directamente con los péptidos, y que serían los radicales derivados de su homólisis los responsables de la reacción. Por otro lado, la incubación del peroxinitrito con los péptidos conteniendo tirosinas es acompañada por un incremento en la absorbancia a 430 nm, la que también sigue una cinética de primer orden (**Figura 2.5B, Tabla 2.2**), indicando la formación de 3-nitrotirosina. La sustitución de la tirosina por fenilalanina en

la secuencia de los péptidos disminuyó el aumento en la absorbancia a 430 nm. Como se puede observar en la **Figura 2.5B**, la constante de formación de la 3-nitrotirosina es equivalente a la constante de descomposición del peroxinitrito, confirmando que no se debe a una reacción directa de peroxinitrito con las tirosinas en los péptidos. Como control, en la secuencias de los péptidos se incluyó el aminoácido triptófano, y se observó un incremento en la absorbancia a 400 nm, indicando la formación de nitrotriptófano, a una velocidad de formación mayor que la velocidad de descomposición del peroxinitrito. A diferencia de la tirosina, el triptófano reacciona de manera directa con el peroxinitrito (**Tabla 2.2**), algo que había sido previamente descrito (Alvarez y col., 1996).

Tabla 2.2

Péptidos	k_{302}	k_{430}	k_{400}
	1,13±0,01		
RYEYA	1,09±0,02	1,10±0,01	
RFEFA	1,06±0,02	0	
EYTA	0,84±0,003	1,04±0,04	
EFTA	1,02±0,006	0,99±0,04	
YYY	0,80±0,006	1,07±0,01	
GY	0,83±0,003	1,12±0,004	
GF	1,06±0,01	0,67±0,05	
RWEWA			1,60±0,04
EWTA			1,59±0,03

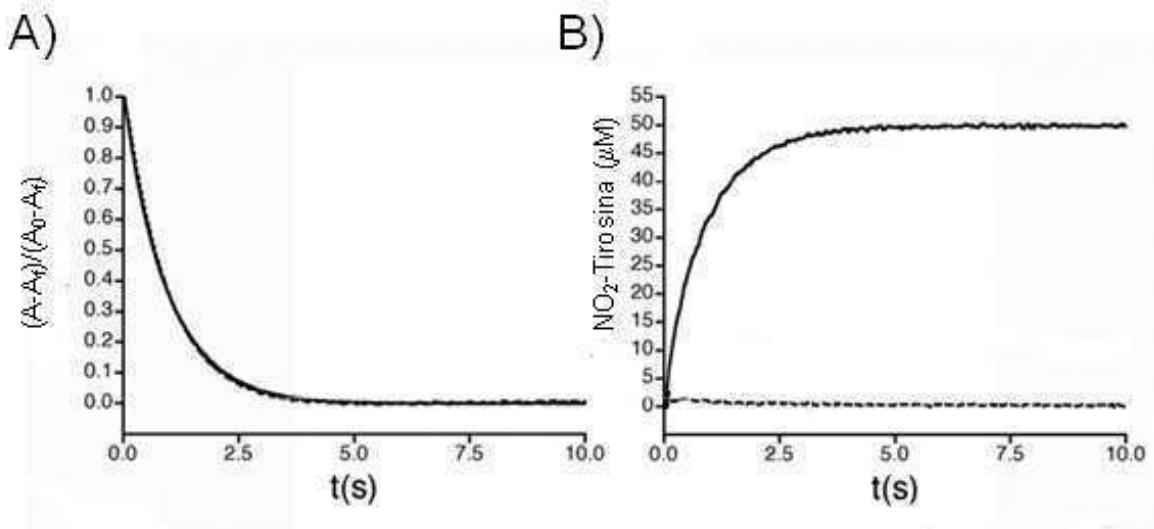


Figura 2.5: Velocidad de decaimiento del peroxinitrito y velocidad de formación de nitrotirosina en presencia de péptidos con tirosinas. 0,5 mM de peroxinitrito fue agregado en buffer fosfato, pH $7,36 \pm 0,03$ a 37°C , solo (línea punteada) o en presencia de 2 mM de péptido, RYEYA (línea sólida), RFEFA (línea discontinua). **A.** Curva de velocidad de descomposición del peroxinitrito. Los valores de absorbancia fueron normalizados substrayendo el valor final (A_f) y dividiéndolo por la amplitud de la corrida ($A_0 - A_f$). **B.** Cinética de la nitración de residuos de tirosina por el peroxinitrito. La formación de nitrotirosina fue calculada por el incremento en la absorbancia a 430 nm y graficada en función del tiempo.

5- Proteínas nitradas en los cultivos de motoneuronas crecidos en ausencia de factores tróficos

Hallazgos previos de nuestro laboratorio obtenidos con la línea celular PC12 mostraron que cuando dichos cultivos son expuestos a un bolo de peroxinitrito (0.5 mM), se encuentran por lo menos cuatro proteínas nitradas. Las proteínas identificadas fueron: β -tubulina; β -actina, factor de elongación 1α -S y proteína de choque térmico 90 (HSP90)

(Ye y col., 2007). Debido a la importancia de la HSP90 en la regulación de apoptosis, decidimos estudiar si los residuos de tirosina de la proteína HSP90 se encontraban nitrados en los cultivos de motoneuronas crecidas en ausencia de factores tróficos. Para identificar la presencia HSP90 nitrada en los cultivos de motoneuronas, usamos el método de Western blot. Para ésto se desarrolló en el laboratorio un anticuerpo específico que reconoce la proteína nitrada (Ye y col., 2007).

Como podemos observar en la **Figura 2.6**, los cultivos crecidos en ausencia de factores tróficos (sin-FNT) durante 24 horas exhibieron un aumento significativo en la cantidad de HSP-90 nitrada (NO₂HSP90) con respecto a los cultivos crecidos en presencia de factores tróficos (FNT). La **Figura 2.6B** muestra la cuantificación de los WB, donde se observó un diferencia significativa de 2.5 veces en la cantidad de proteína nitradas entre los dos grupos. Estos resultados indicarían que la proteína HSP90 es una de las proteínas blanco de nitración en los cultivos de motoneuronas crecidos en ausencia de factores tróficos. Si bien posiblemente no sea la única proteína nitrada, debido a las múltiples acciones de la HSP90 en la sobrevivencia de las células (ver Introducción), su nitración podría ejercer un papel primordial en la muerte apoptótica desencadenada en diferentes condiciones en la motoneuronas.

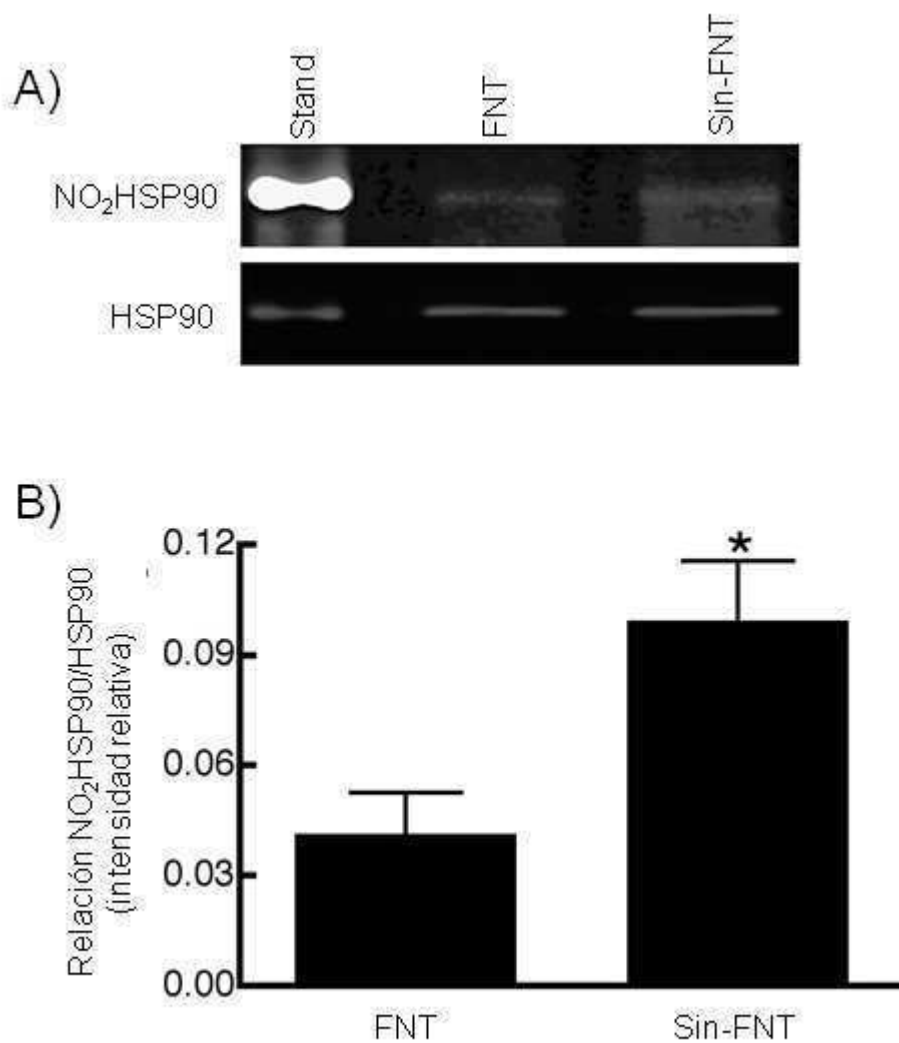


Figura 2.6: La proteína HSP90 se encuentra nitrada en los cultivos de motoneuronas crecidos en ausencia de factores tróficos. Los cultivos fueron crecidos en medio sin factores neurotróficos (sin-FNT) o suplementados con factores neurotróficos (FNT). La inmunoreactividad para la HSP90 nitrada fue analizada a las 24 horas. **A.** Western blot representativo para la proteína nitrada HSP90 (NO₂HSP90). Como control de siembra y de expresión se utilizó la HSP90. **B.** Cuantificación de la relación entre NO₂HSP90 y HSP90 de cuatro experimentos independientes. Las barras representan la media \pm DS, los datos fueron analizados con el método de Mann Whitney test. * $p < 0,01$ comparado con los cultivos crecidos sin-TNF.

Está ampliamente descrita en la literatura la presencia de nitrotirosina en distintas patologías, específicamente en la ELA se ha observado un aumento en la inmunoreactividad para la nitrotirosina en médulas espinales de los animales transgénicos para la SOD1 modelo de la ELA, así como también en pacientes que presentan la enfermedad esporádica (ELA esporádico) y en pacientes que presentan la enfermedad hereditaria (ELA familiar) (Beal y col., 1997). Sin embargo, no se conoce cuáles son las proteínas afectadas por dicha nitración y si éstas cumplen o no un papel en el desencadenamiento de la degeneración celular. Nuestros datos preliminares sugieren que los animales transgénicos que expresan la SOD1 mutada (G93A) poseen mayor cantidad de HSP90 nitrada tanto en el cerebro (**Figura 2.7A**), como en la médula espinal (**Figura 2.7B**), comparados con animales controles de la misma edad. Se observó además un incremento en la nitración a medida que los animales envejecen. También se observó un aumento en la NO₂HSP90 en los cortes histológicos de médulas espinales de estos animales (**Figura 2.8A**) y de pacientes de ELA (**Figura 2.8B**). Estos resultados preliminares sugieren que la HSP90 se encuentra nitrada en patologías donde previamente se demostró que existe un aumento en las proteínas nitradas.

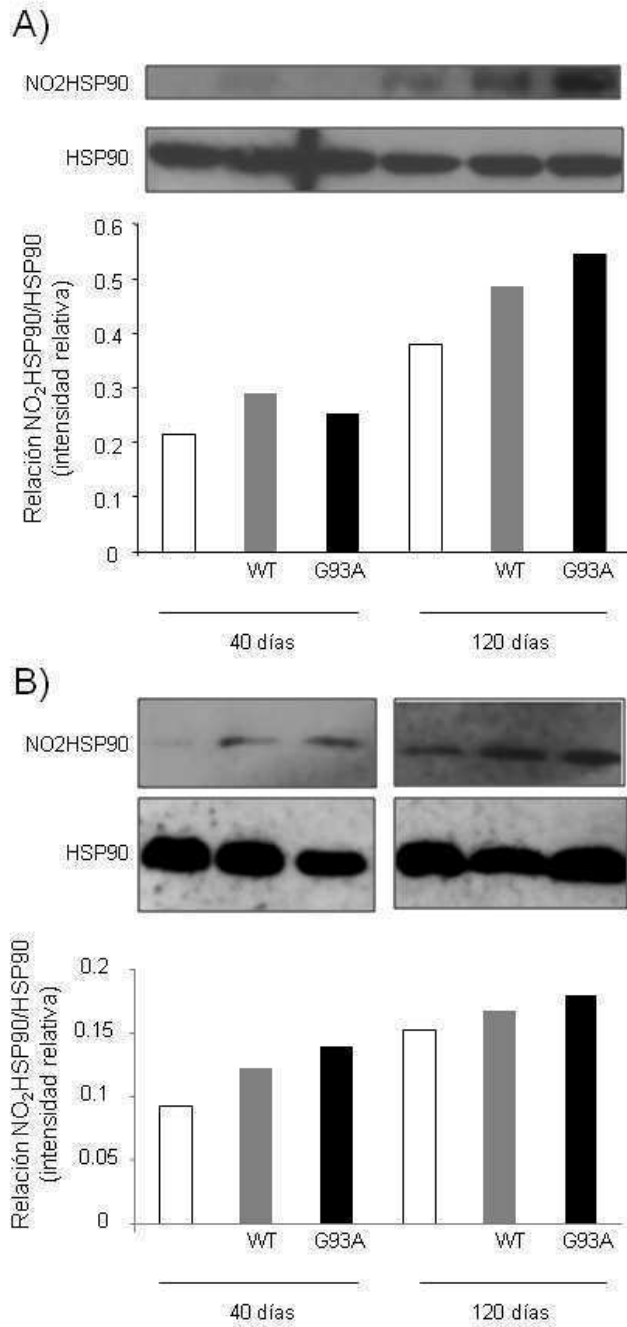


Figura 2.7: La nitración de HSP90 está incrementada en los animales que expresan la mutación G93A de la SOD1 humana. Se analizó la presencia de NO₂HSP90 en muestras de cerebro (A) o médula espinal (B) de ratones controles o transgénicos para la enzima SOD1 humana normal (WT), o con la mutación G93A (G93A) en dos ventanas temporales: pre sintomáticos (40 días) o post-sintomáticos (120 días). Cuantificación de un Western blot representativos. Las bandas de la expresión de NO₂HSP90 fueron analizadas densitométricamente con el software Quantity One (Bio-Rad). Las barras representan la relación entre la NO₂HSP90/HSP90.

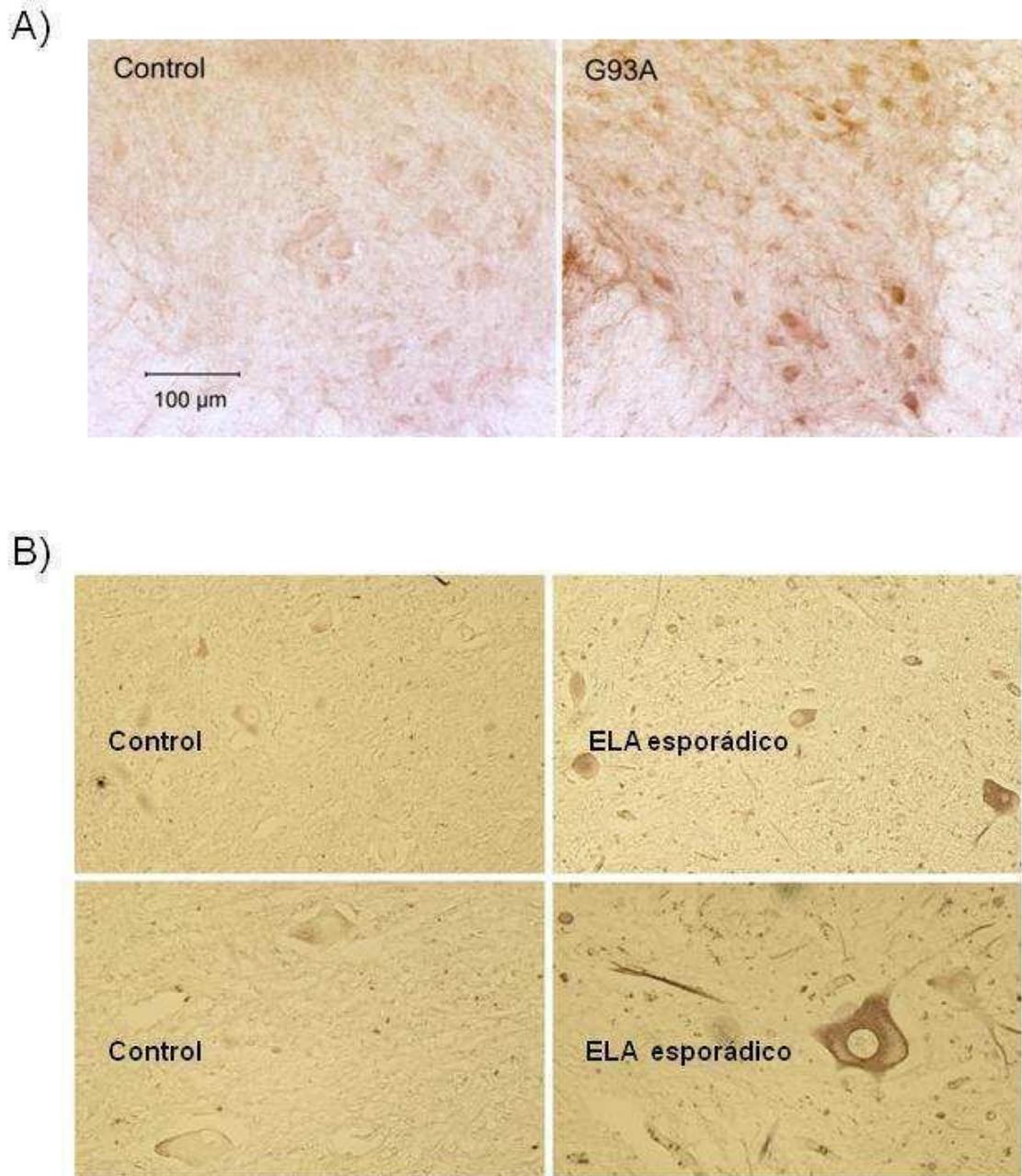


Figura 2.8: La nitración de HSP90 está incrementada en las muestras histológicas de médulas espinales de ratones transgénicos para la SOD1 y en pacientes de ELA esporádicos. A. Inmunohistoquímica para la NO₂HSP90 en una médula espinal de ratón de 100 días de edad. Control (no transgénico) o transgénico para la SOD1 humana portando la mutación G93A (G93A). **B.** Inmunohistoquímica de médulas espinales de pacientes de ELA o de controles de la misma edad. Se utilizó un anticuerpo específico anti NO₂-HSP90.

Discusión

La nitración de la tirosina ha sido propuesta como un mediador de la actividad del peroxinitrito y otras especies reactivas del nitrógeno, pero sigue siendo controversial si juega un papel en los eventos desencadenados por el estrés oxidativo en las células. Originariamente, la nitrotirosina en las células se utilizaba como un marcador de la formación de peroxinitrito. Sin embargo, existen varios ejemplos de efectos biológicos causados por la nitración de determinadas proteínas (inactivación de una enzima, alteración de la función de un receptor, inhibición de la activación de una kinasa, etc), sugiriendo que la nitrotirosina no es sólo un marcador de estrés oxidativo, sino que también cumple una función biológica (Schopfer y col., 2003). En el Capítulo I de esta tesis se presentaron resultados que demostraron que tanto la ausencia de factores tróficos como la presencia de ciertas combinaciones de factores tróficos pueden desencadenar la muerte apoptótica de motoneuronas en cultivo, existiendo un estrés oxidativo que lleva a un aumento en la nitración de residuos de tirosina en las proteínas (Estevez y col., 1998a; Ricart y col., 2006). Por otro lado, la nitrotirosina libre causa una muerte apoptótica con características similares en los cultivos de motoneuronas (Peluffo y col., 2004). En este mismo modelo celular también se describió que la oxidación *in vitro* del NGF por el peroxinitrito incrementa la potencia del NGF para inducir apoptosis (Pehar y col., 2006). Asimismo, la pérdida del zinc en la proteína Cu, Zn SOD desencadena la muerte apoptótica de las motoneuronas, a través de un mecanismo oxidativo independiente de la presencia de mutaciones en la proteína Cu, Zn SOD (Estevez y col., 1999a). Si bien todos estos trabajos indican la participación del peroxinitrito en la muerte apoptótica de las motoneuronas, ninguno demuestra directamente la participación de la nitración en el

proceso de control de la muerte celular. En este capítulo demostramos que péptidos conteniendo tirosinas en su secuencia pueden actuar como competidores de las tirosinas endógenas y prevenir la muerte celular causada por la ausencia de factores tróficos. Estos mismos péptidos previenen la muerte apoptótica desencadenada por el tratamiento con peroxinitrito en cultivos de células PC12 (Ye y col., 2007). Interesantemente, el inhibidor de la caspasa-1 (Ac-YVAD-cmk) protege de la muerte a las células neuronales expuestas a peroxinitrito, quizás porque contiene una tirosina en su secuencia (Zhang y Rosenberg, 2004).

Si bien en la **Figura 2.1** se observa una mayor protección con el péptido que posee dos tirosinas en su secuencia (RYEYA), no se observó una relación entre la cantidad de tirosinas en la secuencia con el nivel de protección contra la apoptosis en motoneuronas (**Figura 2.2**). La mayor protección observada con la secuencia RYEYA se podría deber a una diferencia en la reactividad con las especies nitrantes, ya sea por diferencia en la permeabilidad, la acumulación en la célula o en los diferentes compartimentos celulares. El efecto protector de los distintos péptidos difiere según los modelos celulares, ya que si bien el pentapéptido RYEYA es el que mostró la mayor protección en los cultivos de motoneuronas (**Figura 2.1**), en los cultivos de células PC12 no fue el péptido que tuvo el mayor efecto (Ye y col., 2007). Cuando los cultivos fueron crecidos en presencia de péptidos que poseían residuos de fenilalanina, no se observó ninguna protección; tampoco se observó protección cuando los cultivos fueron incubados con péptidos que poseían nitrotirosina en su secuencia. Un dato para destacar sobre este punto es que si bien la nitrotirosina libre es tóxica para las motoneuronas (Peluffo y col., 2004), la presencia de nitrotirosina en los péptidos no tiene un efecto tóxico.

Aunque ya había sido descrito la presencia de nitrotirosina en los cultivos de motoneuronas crecidos en ausencia de factores tróficos (Estevez y col., 1998a), no se había hecho aún un estudio exhaustivo del mecanismo por el cual las proteínas eran nitradas, ya que la generación de nitrotirosina puede deberse a la intervención de peroxinitrito o por una serie de peroxidases (mieloperoxidasas, lactatoperoxidasas o lactoperoxidasas), por un mecanismo que involucra la oxidación por peróxido de hidrógeno y nitrito. Como describimos en la **Figura 2.6**, tanto los inhibidores de la enzima de la síntesis del óxido nítrico, como el incremento en la degradación del anión superóxido y del peroxinitrito por MnTBAP, FeTCPP y la enzima SOD cuando es introducida en la célula, previenen el incremento en las proteínas nitradas, indicando que sería el peroxinitrito o los productos nitrantes de la degradación del peroxinitrito los responsables de la nitración de las proteínas, ya que la disminución de óxido nítrico o del superóxido es suficiente para disminuir la cantidad de proteínas nitradas.

Por otro lado, la nitración de las proteínas sería independiente de las peroxidases, ya que cuando se incubaron los cultivos en presencia del inhibidor de la síntesis de óxido nítrico (L-NAME) pero en presencia de nitrito de sodio y peróxido de hidrogeno (sustrato de la reacción de las peroxidases), no se observó un aumento en la proteínas nitradas (**Figura 2.6B**). La nitración de las proteínas es prevenida por péptidos que tienen en su secuencia tirosina (**Figura 2.7**), sugiriendo que los péptidos compiten por el peroxinitrito con las proteínas endógenas, disminuyendo la nitración y previniendo la apoptosis.

La velocidad de descomposición del peroxinitrito no se vió afectada por la incubación con exceso de los distintos péptidos, indicando que no se debería a una acción directa sino que estaría reaccionando con los radicales formados durante la

descomposición espontánea del peroxinitrito, el radical hidroxilo y dióxido de nitrógeno (**Figura 2.5A**). Asimismo, la velocidad de formación de la nitrotirosina es similar a la velocidad de descomposición del peroxinitrito (**Figura 2.5B**), confirmando que la reacción entre el peroxinitrito y la tirosina no es directa. El aparente decremento en la velocidad de descomposición del peroxinitrito cuando se encuentra en presencia de los péptidos GY y YYY se podría deber a la formación de otra especie, como el peroxinitrato (**Tabla 2.2**) (Alvarez y Radi, 2001). En resumen, el efecto protector observado en la sobrevivencia de la motoneurona no se debe a que los péptidos aumentan la descomposición del peroxinitrito sino a que compiten por los productos radicales producidos durante la descomposición del mismo.

El análisis de las proteínas nitradas en los cultivos de células PC12 expuestas a peroxinitrito mostró que sólo un número limitado de proteínas fueron nitradas, indicando que la nitración es un evento controlado y no indiscriminado (Ye y col., 2007). Cabe destacar en este punto que debido a las limitaciones de la técnica, podrían existir mayor cantidad de proteínas nitradas que no fueron detectadas por tener una baja inmunoreactividad. Sin embargo, hay evidencia de que la nitración es selectiva y que depende de una serie de factores, los cuales incluyen la presencia de la tirosina protonada en la superficie de la proteína y la estabilización del radical tirosilo (Ischiropoulos y Gow, 2005; Souza y col., 1999). El análisis por espectrometría de masa identificó cuatro proteínas: β -tubulina, factor de elongación 1 α , β -actina y la proteína de choque térmico 90 (HSP90). La β -actina, el factor de elongación 1 α y la β -tubulina son proteínas muy abundantes, teniendo más oportunidad de ser nitradas azarosamente. La β -actina y la β -tubulina son nitradas en distintas patologías (Schopfer y col., 2003). Asimismo, sólo una

pequeña proporción de β -actina nitrada es capaz de prevenir su polimerización en filamentos (Aslan y col., 2003).

Debido a sus diversas funciones (ver Introducción) y su rol en la prevención de la apoptosis, la proteína HSP90 resulta de particular interés. Las motoneuronas poseen un umbral alto para la activación de la respuesta de las proteínas de choque térmico, lo cual es regulado por el factor de choque térmico 1 (HSF-1, del inglés Heat Shock Factor 1) que es inducido por la inhibición de la HSP90 (Batulan y col., 2006). Además, la proteína HSP70 previene la muerte apoptótica en motoneuronas cuando son cultivadas en ausencia de factores tróficos (Robinson y col., 2005). Además, como describiremos en el Capítulo III, las motoneuronas son particularmente sensibles a la inhibición de la HSP90.

Interesantemente, los cultivos de motoneuronas crecidos en ausencia de factores tróficos exhiben un aumento en la proteína HSP90 nitrada ($\text{NO}_2\text{HSP90}$) en comparación con cultivos crecidos en presencia de factores tróficos (**Figura 2.6**). Basso y colaboradores, observaron un aumento en la HSP90 nitrada en cultivos de NSC34 cuando expresan la SOD humana conteniendo la mutación G93A y en tejido de médula espinal de pacientes de ELA esporádicos (Basso y col., 2009). Por otro lado, nosotros observamos un aumento en la inmunoreactividad para la $\text{NO}_2\text{HSP90}$ en cortes histológicos de médulas espinales de ratones transgénicos para la SOD y de médulas espinales de tejidos post-mortem de pacientes de ELA (**Figura 2.8**). Los datos preliminares de lisados de médula espinal y cerebro muestran un aumento en la cantidad de proteína HSP90 nitrada en los animales transgénicos para la SOD humana (mutada o WT) cuando se compara con los animales no transgénicos de la misma edad; sin embargo, existe un aumento en la nitración de la chaperona que es dependiente de la edad

del animal (**Figura 2.8**). Estos datos demuestran que la HSP90 está nitrada en los modelos in vitro analizados, y además está nitrada in vivo durante la degeneración neuronal, tanto en los modelos animales de la ELA, como en pacientes de ELA. El estudio de la HSP90 y su nitración es de particular interés no solo en la ELA sino en otras patologías donde se ha descrito un aumento en las proteínas nitradas (enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, Esclerosis Múltiple, en el daño por isquemia-reperfusión y en los accidentes cerebro-vasculares (ACV), entre otras), ya que esta proteína podría estar ejerciendo un papel primordial en la toxicidad observada en estas patologías.

Estos datos en su conjunto demuestran que existe un aumento de la nitración de esta proteína en circunstancias en las cuales las motoneuronas mueren por apoptosis, indicando que podría existir una relación entre la HSP90 nitrada y el desencadenamiento de la apoptosis en los cultivos de motoneurona, tema que será tratado en mayor profundidad en el Capítulo III. Desafortunadamente, no se pudo estudiar la presencia de HSP90 nitrada en cultivos expuestos a NRG- β 1 y BDNF; sin embargo los receptores ErbB2 dependen de la proteína HSP90 para formar complejo con los otros receptores de su familia (Sidera y col., 2008), lo que sugiere que alteraciones en dicha proteína podrían afectar la formación del complejo ErbB2-ErbB y así afectar la respuesta de supervivencia de las motoneuronas en los cultivos crecidos en NRG- β 1 y BDNF. Asimismo, HSP90 es necesaria para el correcto ensamblaje y funcionamiento de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) (Khurana y col., 2000), esta proteína es fundamental en la supervivencia de las motoneuronas crecidas en presencia de factores tróficos (Estevez y col., 1998b).

CAPÍTULO III

Importancia de la proteína HSP90 en la sobrevivencia de la motoneurona en cultivo

Resultados

Como demostramos en el capítulo anterior, cuando los cultivos de motoneuronas son crecidos en ausencia de factores tróficos, una de las proteínas nitradas es la HSP90. La HSP90 es una proteína muy abundante en todas las células, y representa aproximadamente 1-2% de la proteína total citoplásmica (Didelot y col., 2006; Welch y Feramisco, 1982). Esta chaperona tiene un papel fundamental en una variedad de procesos celulares, tales como la regulación del ciclo celular, el crecimiento celular, la sobrevivencia, la apoptosis, la angiogénesis y la oncogénesis (Kregel, 2002; Lanneau y col., 2007; Richter-Landsberg y Goldbaum, 2003). La HSP90 es capaz de regular la estabilidad y estado de fosforilación de diversas proteínas blanco o clientes. La lista de proteínas cliente de HSP90 sigue aumentando, con más de 200 proteínas descritas hasta la fecha (Picard, 2002). La mayoría de las proteínas cliente de la HSP90 son proteínas involucradas en procesos de señalización celular. Debido a que la funcionalidad de la HSP90 depende de la actividad ATPasa (Pearl y Prodromou, 2000; Pearl y Prodromou, 2001; Pearl y Prodromou, 2006; Pearl y col., 2008), nos pareció interesante estudiar el efecto del peroxinitrito en la actividad ATPasa de la HSP90.

El efecto del peroxinitrito sobre la actividad ATPasa de la HSP90 fue investigado *in vitro*, incubando 1 mg/ml de HSP90, purificada de hígado de rata, con 0.5 mM de

peroxinitrito. La actividad fue medida por el método de actividades enzimáticas acopladas para medir la hidrólisis de ATP (Avila y col., 2006). La incubación con peroxinitrito inhibió la actividad ATPasa de la HSP90 (**Figure 3.1**), indicando que la nitración de HSP90 inhibe la actividad ATPasa. Asimismo, como mencionamos previamente, los cultivos de motoneuronas crecidos en ausencia de factores tróficos presentaron un aumento de la HSP90 nitrada (**Figura 2.6**). Basándonos en estos resultados hipotetizamos que HSP90 podría estar involucrada en la sobrevida de la motoneurona y decidimos estudiar el efecto de la inhibición de la actividad ATPasa de esta proteína sobre la sobrevida de las motoneuronas en cultivo.

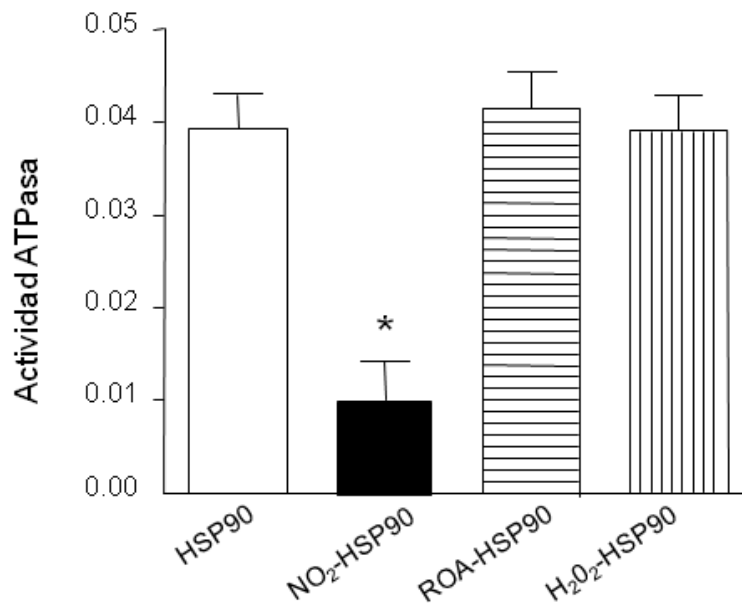


Figura 3.1: Efecto del peroxinitrito en la actividad ATPasa de la HSP90. HSP90 1mg/ml fue incubada con 0,5 mM peroxynitrito (NO₂-HSP90), con el producto de la descomposición del peroxinitrito (ROA-HSP90), o con 0,5 mM de peróxido de hidrógeno (H₂O₂-HSP90). La actividad HSP90 fue medida espectrofotométricamente como se describe en los Materiales y Métodos. La actividad ATPasa medida en presencia de geldanamicina (1 μM) fue utilizada como blanco. * p<0,001 comparado con la actividad ATPasa de HSP90 sin peroxinitrito.

1- Rol de la proteína HSP90 en la sobrevivencia de las motoneuronas cultivadas en presencia de factores tróficos

La primera pregunta que nos planteamos fue si la actividad ATPasa de la chaperona HSP90 era necesaria para la sobrevivencia de las motoneuronas crecidas en presencia de factores tróficos. Para contestar esta pregunta, se utilizó geldanamicina, un inhibidor farmacológico específico de la actividad ATPasa de la HSP90 (Drysdale y Brough, 2008; Ochel y col., 2001).

Los cultivos de motoneuronas fueron crecidos en presencia de factores neurotróficos (FNT) por 24 horas, momento en el cual se trataron con distintas concentraciones de geldanamicina (0,001 nM a 500 nM), y la viabilidad celular fue evaluada a las 48 horas de iniciado el cultivo (24 horas post-tratamiento). En la **Figura 3.2** se muestra que las motoneuronas incrementan su sensibilidad a la muerte con el aumento de la concentración de geldanamicina, observándose que la concentración letal 50 (CL₅₀) es 0.4 ± 0.04 nM. En contraste, cuando los cultivos primarios de médula espinal disociada de rata fueron expuestos a geldanamicina, la CL₅₀ fue de $146 \pm 46,8$ nM. En cultivos primarios de corteza cerebral disociada de rata la CL₅₀ fue de $26,1 \pm 1,0$ nM, 65 veces más alta que la CL₅₀ en cultivos primarios de motoneuronas (comparar las **Figuras 3.2 y 3.3**). Con el propósito de descartar que esta discrepancia sea producto de diferencias en la densidad celular de los cultivos, se realizaron cultivos de corteza de rata a una densidad baja equivalente a la de las motoneuronas. En este caso el CL₅₀ para la

geldanamicina en los cultivos de corteza de baja densidad fue de 473.1 ± 44.6 nM. Finalmente, la sensibilidad de la línea celular híbrida de motoneurona neuroblastoma NSC34 fue determinada en cultivos de células diferenciadas y no diferenciadas. Las células NSC34 no diferenciadas mostraron una CL_{50} de $1 \pm 0,5$ μ M, mientras que para las NSC34 diferenciadas la CL_{50} fue de 8 ± 1 μ M, pero a las más altas concentraciones, la muerte celular máxima fue aproximadamente del 50% aproximadamente (**Tabla 3.1**).

Tabla 3.1

Tipo Celular	CL_{50} (media \pm DS) (nM)	Relación con la CL_{50} para motoneuronas
Motoneuronas	$0,4 \pm 0,04$	1
Médula espinal disociada	$146 \pm 46,8$	365
Corteza (alta densidad)	$26,1 \pm 1,0$	65
Corteza (baja densidad)	$473,1 \pm 44,6$	1.182
NSC34 (no diferenciada)	1.000 ± 500	2.500
NSC34 (diferenciada)	8.000 ± 1.000	20.000

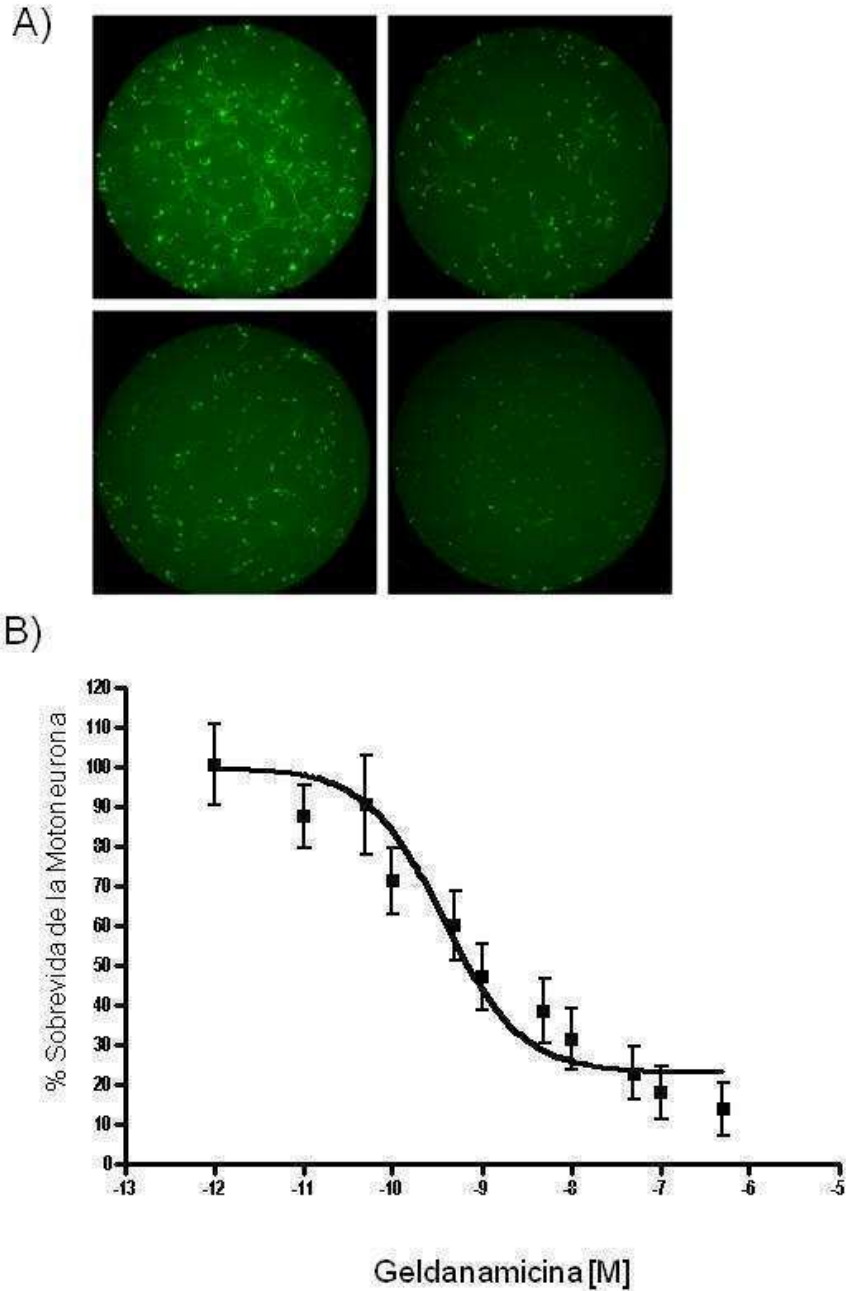


Figura 3.2: La inhibición de la actividad ATPasa de la HSP90 induce muerte en las motoneuronas. Las motoneuronas fueron sembradas en placas de 96 posillos a una densidad de 7.500 células/ml en presencia de factores neurotróficos. Luego de 24 horas las células fueron tratadas con geldanamicina a las concentraciones indicadas (0,001 nM a 500 nM). La sobrevida de las motoneuronas fue determinada 24 horas luego del tratamiento con geldanamicina, para lo cual las células fueron teñidas con Calceína-AM. La viabilidad celular se determinó empleando un sistema de captura de imágenes de alta velocidad (Flash Cytometer, ver Materiales y Métodos). (A) Imagen representativa de las motoneuronas teñidas con Calceína-AM obtenidas en el Flash Cytometer. (B) Los datos fueron ajustados a una curva sigmoidea para calcular las CL_{50} .

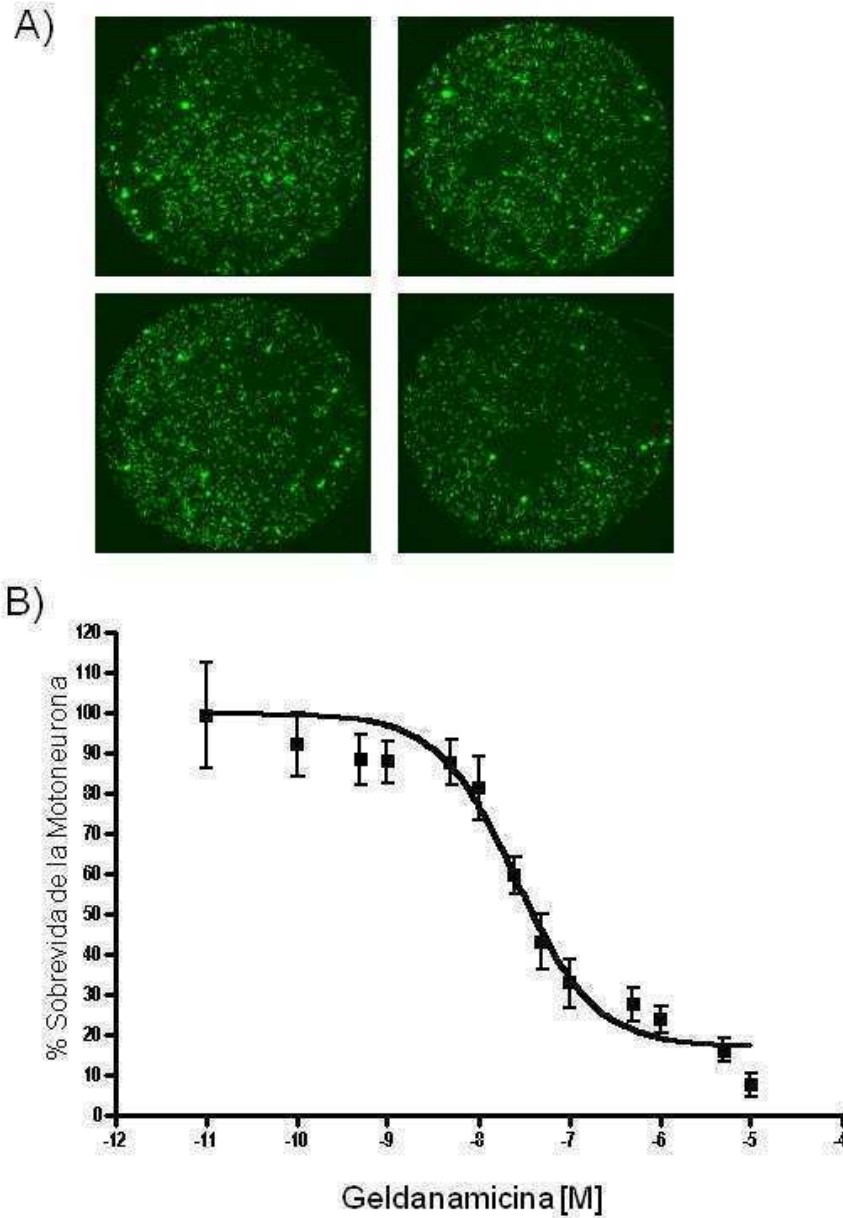


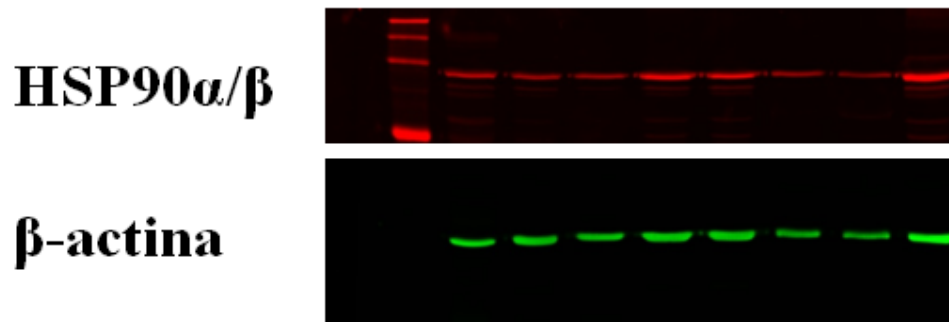
Figura 3.3: Las células corticales son más resistente que las motoneuronas a la inhibición de la HSP90. Cultivos primarios de corteza de rata fueron sembradas en placas de 96 posillos a una densidad de 1×10^6 células/ml. Luego de 24 horas, las células fueron tratadas con geldanamicina a las concentraciones indicadas (0,001 nM a 1000 nM). La sobrevida de las células fue determinada 24 horas luego del tratamiento con geldanamicina, para lo cual las células fueron teñidas con Calceina-AM. La viabilidad celular se determinó empleando un sistema de captura de imágenes de alta velocidad (Flash Cytometer, ver Materiales y Métodos). (A) Imagen representativa de las células corticales teñidas con Calceina-AM obtenidas en el Flash Cytometer. (B) Los datos fueron ajustados a una curva sigmoidea para calcular las CL_{50} .

Este hallazgo es particularmente interesante debido a la baja concentración de geldanamicina necesaria para estimular la muerte de las motoneuronas en cultivo. Cuando se compara las CL_{50} de las motoneuronas con otros tipos celulares, se observó que las motoneuronas son entre 10 y 2×10^4 veces más sensibles a la geldanamicina. Estos resultados indican un rol primordial de la HSP90 en la supervivencia de las motoneuronas en cultivo.

2- Expresión de HSP90 en diferentes tejidos

Basándonos en estos resultados, nos preguntamos si la mayor sensibilidad a la inhibición de la HSP90 en motoneuronas es debida a una expresión diferencial de la proteína HSP90 en estas células. Para contestar esta pregunta, analizamos la expresión de la HSP90 en diferentes tejidos, así como también en cultivos primarios, mediante la técnica de Western blot, utilizando un anticuerpo que reconoce las isoformas α y β de la chaperona. Los Western blots fueron normalizados por los niveles de actina como control de siembra (**Figura 3.4A**). En la cuantificación mostrada en la **Figura 3.4B** se observa que no hay diferencias en la cantidad de HSP90 en los distintos tejidos analizados. Estos resultados indican que la mayor sensibilidad de las motoneuronas a la inhibición de la HSP90 no es debido a una diferencia en la expresión de dicha proteína.

A)



B)

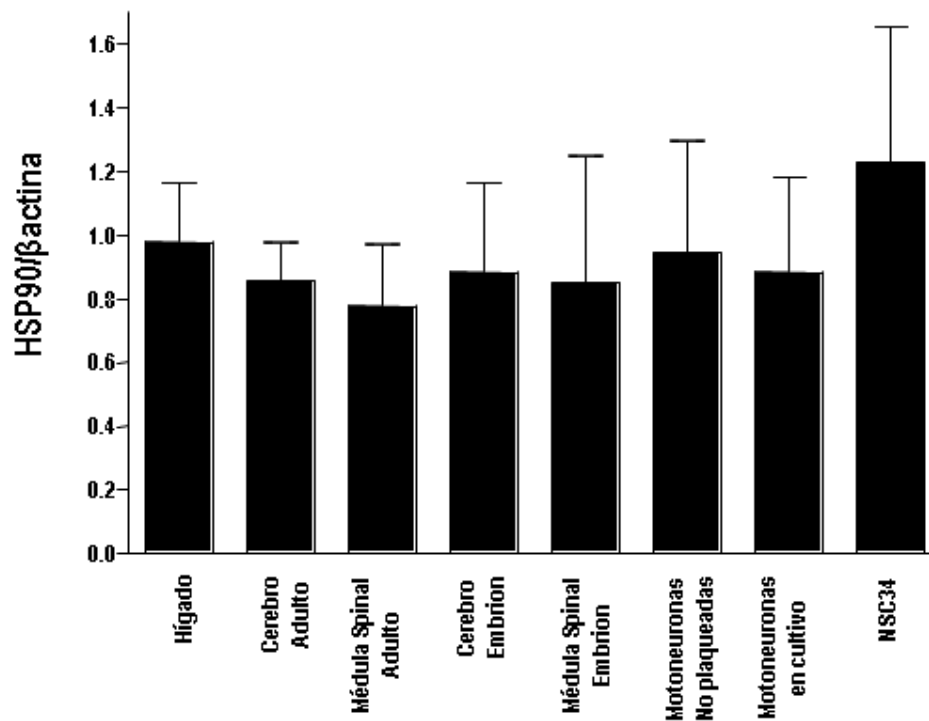


Figura 3.4: Expresión basal de la HSP90 en distintos tejidos y cultivos celulares. Se midió la expresión de la proteína HSP90 por el método de Western blot (Materiales y Métodos) en distintos tejidos de rata adulta (hígado, cerebro, médula espinal), en embriones de rata (cerebro, médula espinal), en la línea celular NSC34, así como también en motoneuronas aisladas no cultivadas o cultivadas por 24 horas en presencia de factores neurotróficos. (A) Imagen representativa de un Western blot obtenido en un captador de imágenes Odyssey. (B) Cuantificación de los valores obtenidos luego de la densitometría de las bandas. Las barras representan la relación entre HSP90 y la β -actina (media \pm DS) de tres experimentos independientes. Los datos fueron analizados con el test ANOVA.

La HSP70 es otra proteína de la familia de las proteínas de choque térmico y se ha descrito en la literatura que ejerce un efecto protector cuando es inducida en distintos modelos celulares (Gifondorwa y col., 2007; Robinson y col., 2005). Además, se ha observado que la inhibición de la HSP90 induce la expresión de HSP70. Siguiendo esta línea de pensamiento, nos pareció interesante analizar la expresión basal de la proteína HSP70 en relación a la expresión de la proteína HSP90. La **Figura 3.5** muestra que existe una diferencia significativa en la relación de HSP70/HSP90 entre distintos tejidos y cultivos de células. Específicamente, células de la línea NSC34 expresan 5 veces más HSP70 que las motoneuronas cultivadas, mientras que la expresión de HSP90 es comparable. La mayor expresión de HSP70 podría ser la explicación de la mayor capacidad para proteger las células de un eventual efecto nocivo, pero esto no explicaría completamente el motivo de por qué las motoneuronas son especialmente sensibles a la inhibición de la proteína HSP90.

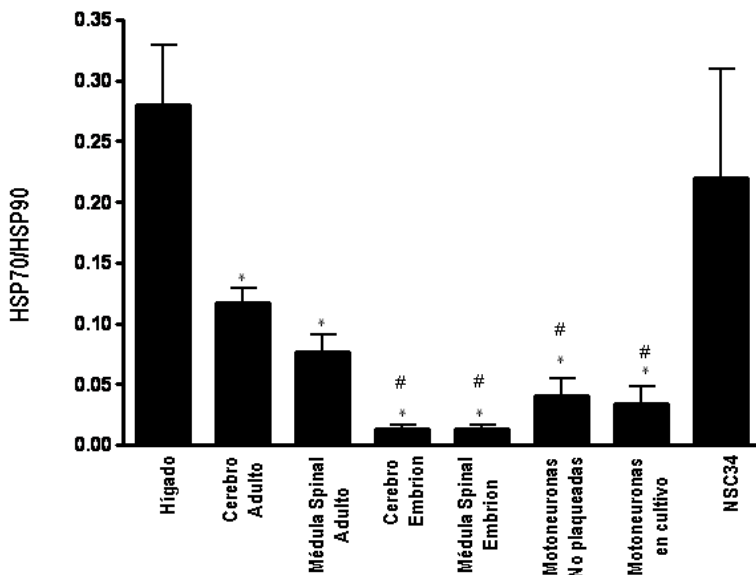


Figura 3.5: Expresión basal de la HSP70 en distintos tejidos y cultivos. Se midió la expresión de la proteína HSP70 por el método de Western blot en distintos tejidos de rata adulta (hígado, cerebro, médula espinal), en embriones de rata (cerebro, médula espinal), en la línea celular NSC34 y en motoneuronas aisladas no cultivadas o cultivadas con FNT por 24 horas. Los valores fueron cuantificados como la relación HSP70/HSP90. Las barras representan la media \pm DS de tres experimentos independientes. Los datos

fueron analizados con el test ANOVA y posteriormente se realizó un post-test (Bonferroni), * $p < 0,05$ comparado con los lisados de hígado, # $p < 0,05$ comparado con la línea celular NSC34.

3- Análisis de la muerte de motoneuronas causada por la inhibición de HSP90 con geldanamicina

En el siguiente grupo de experimentos estudiamos si la muerte inducida por la presencia de geldanamicina en los cultivos de motoneuronas es apoptótica y cuales son los mecanismos celulares activados durante este proceso. Para esto utilizamos inhibidores de las distintas caspasas, analizando de esta manera la vía extrínseca e intrínseca de la apoptosis.

Todos los inhibidores de caspasas utilizados rewertieron la muerte inducida con geldanamicina en los cultivos crecidos en presencia de factores tróficos (**Figura 3.6**). También se pudo observar, que los inhibidores no tuvieron efecto alguno por sí solos. Este resultado indica que el mecanismo de muerte desencadenado por la geldanamicina es apoptótico. Además, las dos vías de la apoptosis estarían involucradas, la mitocondrial o intrínseca y la vía de los receptores de muerte o extrínseca, ya que tanto el inhibidor de la caspasa 9, como el inhibidor de la caspasa 8 previnieron la muerte apoptótica.

Dado que la geldanamicina induce apoptosis, nos preguntamos si también están involucradas las especies reactivas de oxígeno (EROs) en la muerte apoptótica inducida por la geldanamicina. La formación de EROs en la mitocondria produce la liberación del citocromo c y la activación de la caspasa 9. Para determinar si las EROs están involucradas en la muerte observada con el tratamiento de geldanamicina, utilizamos agentes antioxidantes (MnTBAP and FeTBAP), que dismutan el anión superóxido, pero que también pueden reaccionar con el peroxinitrito. Por otro lado, utilizamos un inhibidor

(L-NAME) de las enzimas óxido nítrico sintasa (NOS) para analizar la participación de las especies reactivas del nitrógeno (ERN).

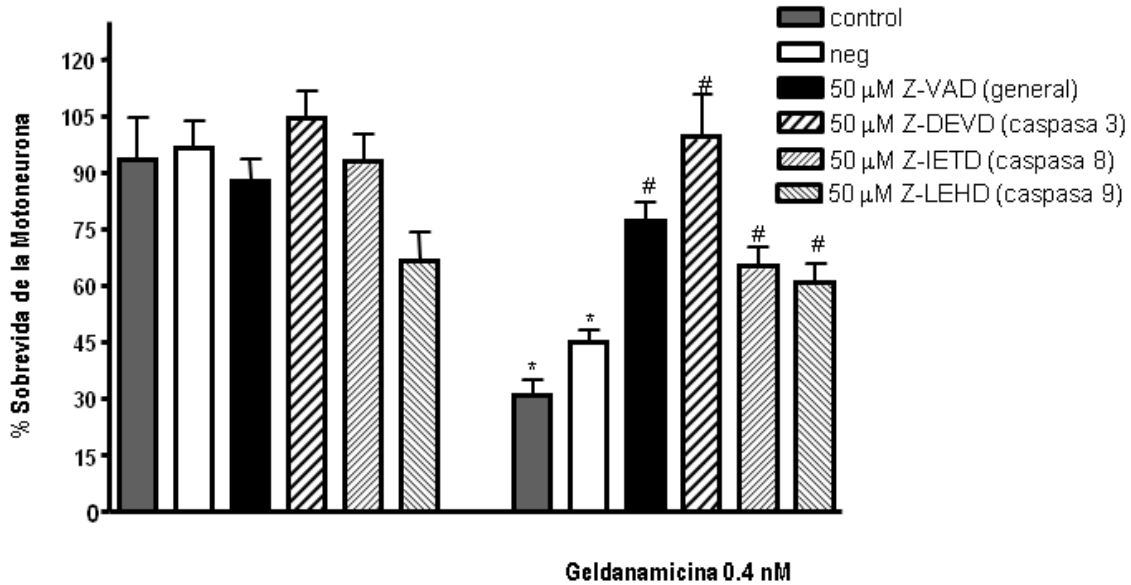


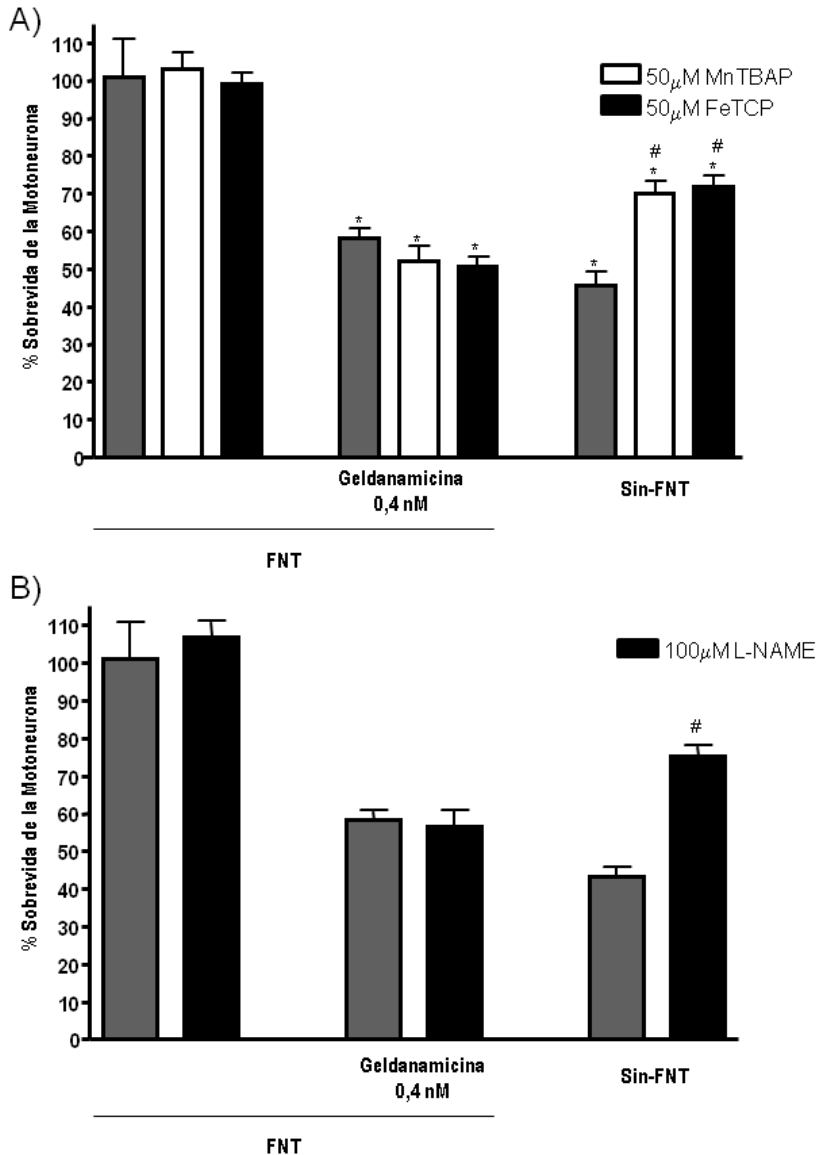
Figura 3.6: La inhibición de la HSP90 induce una muerte apoptótica en las motoneuronas en cultivo. Las motoneuronas fueron cultivadas en medio de cultivo en presencia de factores neurotróficos (FNT) por 24 horas. Luego las células fueron tratadas con 0,4 nM de geldanamicina en presencia de 50 μM de inhibidores de caspasas. La viabilidad celular fue evaluada 24 horas después del tratamiento y normalizada contra los cultivos controles (sin geldanamicina o inhibidores). Las barras representan la media \pm DS de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Los datos fueron analizados con el test ANOVA y posteriormente se realizó un post-test para la comparación entre grupos (Bonferroni), * $p < 0,05$ comparado con los cultivos crecidos en presencia de FNT, # $p < 0,05$ comparado con los cultivos expuesto a geldanamicina.

La muerte celular inducida por la geldanamicina es independiente de la formación de EROs, ya que la incubación con 50 μM de FeTBAP o 50 μM de MnTBAP no afectó la sobrevivencia de las motoneuronas en dichas condiciones (**Figura 3.7A**). Tampoco estaría involucrada la producción de óxido nítrico, ya que la inhibición de las NOS no previno la muerte inducida por geldanamicina (**Figura 3.7B**). Estos resultados indican que la activación de la caspasa 9 es independiente de la producción de EROs y

NO. Sin embargo, estos compuestos son capaces de prevenir la muerte inducida en los cultivos crecidos en ausencia de factores tróficos (**Figura 3.7, A y B**); estos datos concuerdan con lo previamente reportado por otros autores en los cultivos crecidos en ausencia de factores tróficos (Estevez y col., 1998a) y con los datos reportados en esta

tesis en el Capítulo I

(**Figura 1.18**).



cultivos crecidos en sin factores.

Figura 3.7: La muerte desencadenada por la geldanamicina es independiente de las ERO y ERN. Los cultivos fueron crecidos en medio suplementado con factores neurotróficos (FNT) por 24 horas. Luego las células fueron tratadas con 0,4 nM de geldanamicina o puesta en medio sin factores (Sin-FNT) en presencia de FeTCP o MnTBAP (50 μM) (A), L-NAME (100 μM) (B). La viabilidad celular fue evaluada 24 horas después del tratamiento y normalizada contra los cultivos controles (FNT). Las barras representan la media ± DS de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Los datos fueron analizados con el test ANOVA y posteriormente se realizó un post-test (Bonferroni), * p<0,05 comparado con los cultivos crecidos en presencia de FNT, # p<0,05 comparado con los

Por otro lado, para analizar la vía extrínseca de la apoptosis utilizamos un “señuelo molecular” consistente en una proteína quimera que contiene el dominio extracelular de Fas fusionado con el dominio Fc de una IgG (Fas-Fc). Este señuelo secuestra el ligando de Fas (Fas-L), inhibiendo así la activación del receptor Fas endógeno (Fas-R). La **Figura 3.8** muestra que el señuelo Fas-Fc previno totalmente la muerte inducida por geldanamicina, indicando la participación de la vía de Fas (vía extrínseca) en la muerte observada por la inhibición de la HSP90.

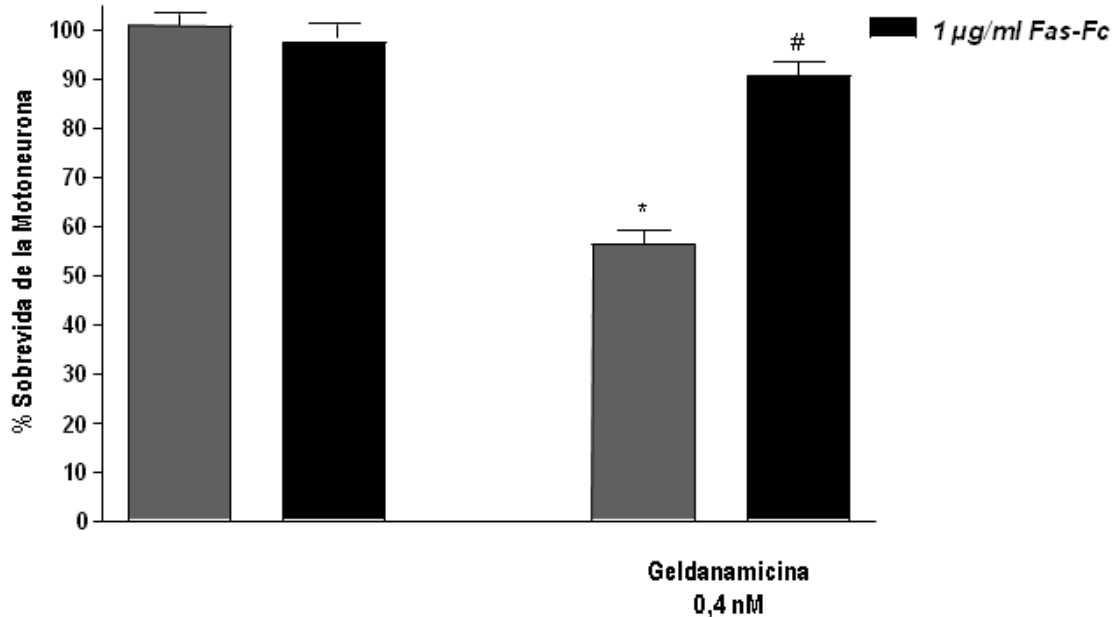


Figura 3.8: La muerte desencadenada por la geldanamicina es dependiente de la vía de Fas. Las motoneuronas fueron cultivadas en medio de cultivo en presencia de FNT por 24 horas. Luego las células fueron tratadas con 0.4nM de geldanamicina en presencia de 1µg/ml de Fas:Fc (inhibidor de la activación del receptor Fas). La viabilidad celular fue evaluada 24 horas después del tratamiento y normalizada contra los cultivos controles (FNT). Los barras representan la media \pm DS de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Los datos fueron analizados con el test ANOVA y posteriormente se realizó un post-test para la comparación entre grupos (Bonferroni), * $p < 0,05$ comparado con los cultivos crecidos en presencia de FNT, # $p < 0,05$ comparado con los cultivos crecidos con geldanamicina.

4- El tratamiento con geldanamicina induce la síntesis de Fas-L

Los resultados anteriores demuestran una participación de la cascada extrínseca de la apoptosis, con una activación de las caspasas 8 y 9, en la muerte celular de las motoneuronas causada por la exposición a geldanamicina. Para evaluar si esta muerte celular es debida a un aumento en la expresión de Fas-L o Fas-R, medimos los niveles de ARN mensajero para Fas-L y Fas-R por la técnica de PCR. La cantidad de ARNm para las dos proteínas fueron normalizadas por los niveles de mensajero de GAPDH (gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa). Como se observa en la **Figura 3.9A**, la transcripción del ARNm de Fas-L aumentó significativamente a las 18 horas del tratamiento con geldanamicina. Por otro lado, los niveles de mensajero del Fas-R no fueron afectados por la inhibición de HSP90 con geldanamicina (**Figura 3.9B**).

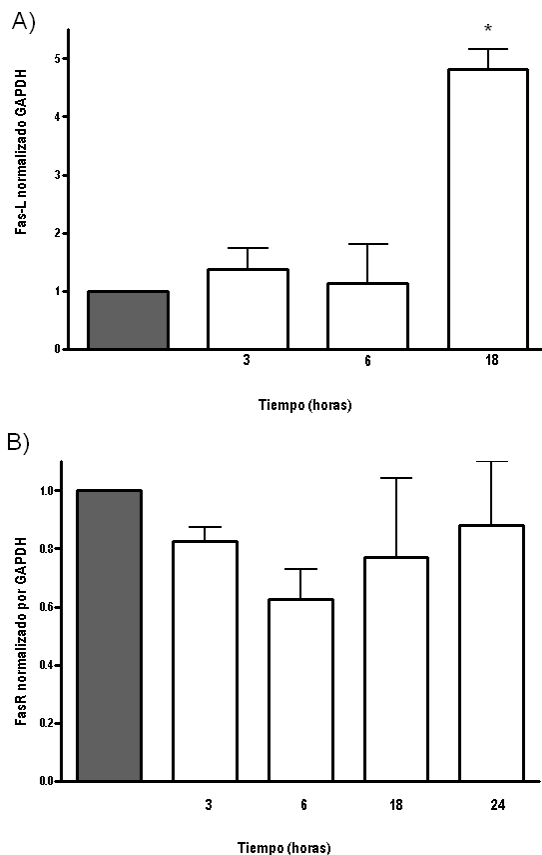


Figura 3.9: La geldanamicina aumenta el ARNm de Fas-L: Las motoneuronas fueron cultivadas en placas de 33 mm a una densidad de 10.000 células/ml por 24 horas en presencia de factores neurotróficos (FNT). Luego las células fueron tratadas con 0,4 nM de geldanamicina (barras vacías) o no (barras llenas), por un período de 3 a 24 horas, momento en el cual se extrajo el ARN y se realizó la RT-PCR con los cebadores específicos para Fas-L (**A**), o para el receptor Fas (**B**) (Materiales y Métodos). La cuantificación de los valores obtenidos fue realizada luego de la densitometría de las bandas. Las barras representan la relación entre Fas-L o Fas-R y GAPDH de tres experimentos independientes. Los datos fueron analizados con el test ANOVA y posteriormente se realizó un post-test para la comparación entre grupos (Bonferroni), * $p < 0,05$ comparado con los cultivos crecidos en presencia de FNT sin geldanamicina.

En relación con estos resultados, y para confirmar que la muerte inducida por el tratamiento de la geldanamicina en las motoneuronas necesita de la síntesis de nuevas proteínas, utilizamos inhibidores de la transcripción del ADN y un inhibidor de la traducción a proteínas. La actinomicina D, un inhibidor de la transcripción del ADN, previno completamente la apoptosis causada por geldanamicina (**Figura 3.10**). De la misma manera, inhibiendo la traducción del ARN con cicloheximida previno el efecto apoptótico de la geldanamicina (**Figura 3.10**). Estos resultados demuestran que la síntesis proteica es necesaria para esta muerte celular, corroborando los resultados anteriormente obtenidos sobre el aumento de la expresión del mensajero para Fas-L.

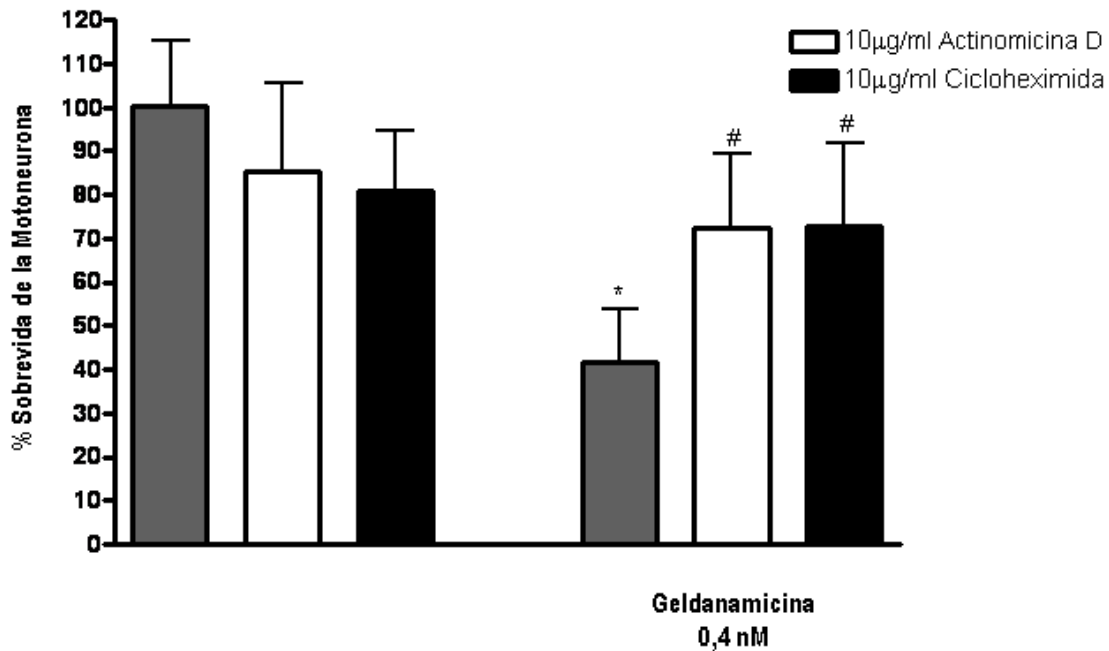
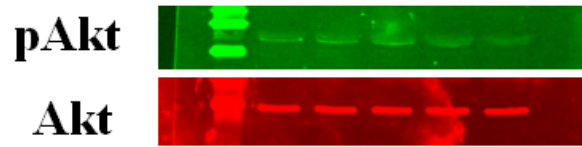


Figura 3.10: La muerte inducida por la geldanamicina depende de la síntesis proteica. Los cultivos fueron crecidos en medio suplementado con neurotróficos (FNT) por 24 horas. Luego fueron tratadas con 0,4 nM de geldanamicina en presencia de actinomicina D o cicloheximida (10 µg/ml). La viabilidad celular fue evaluada 24 horas después del tratamiento y normalizada contra los cultivos controles (FNT). Las barras representan la media \pm DS de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Los datos fueron analizados con el test ANOVA y posteriormente se realizó un post-test (Bonferroni), * $p < 0,05$ comparado con los cultivos crecidos en presencia de FNT, # $p < 0,05$ comparado con los cultivos tratados con geldanamicina.

5- Cascadas afectadas por la inhibición de la proteína HSP90

Barthélémy y colaboradores (2004) observaron que la proteína FOXO3 se encuentra en el citoplasma en su forma inactivada en cultivos de motoneuronas crecidos en presencia de factores tróficos, y que esta localización depende de la activación por fosforilación de la proteína Akt (Barthelemy y col., 2004). Este mismo trabajo demostró que la inhibición de la vía Akt produce la activación y la translocación al núcleo de la proteína FOXO3, la cual se uniría al ADN y estimularía la transcripción del Fas-L (**Figuras I.8**). Entre sus múltiples funciones, la proteína HSP90 actúa en la vía Akt, y su inhibición produce una disminución en la actividad de la proteína Akt (Basso y col., 2002; Sato y col., 2000). Tomando en cuenta estas observaciones y los siguientes resultados: 1- Aumento de Fas-L en motoneuronas incubadas con geldanamicina (**Figura 3.9**) y 2- Activación de la cascada Akt para la sobrevivencia de la motoneuronas (Capítulo I) decidimos evaluar si la proteína HSP90 ejerce su efecto mediante la activación de la vía Akt. Para estos experimentos utilizamos la técnica de Western blot, midiendo los niveles de Akt activada (Akt fosforilada) con respecto a los niveles de la proteína Akt total. Como se observa en la **Figura 3.11**, la fosforilación de la proteína Akt está significativamente reducida a las 24 horas del tratamiento con geldanamicina. Estos resultados demuestran una acción directa de la geldanamicina en la cascada de sobrevivencia de Akt, sugiriendo que la desfosforilación de la proteína Akt podría ser el mecanismo por el cual la geldanamicina ejerce su acción en los cultivos de motoneuronas.

A)



B)

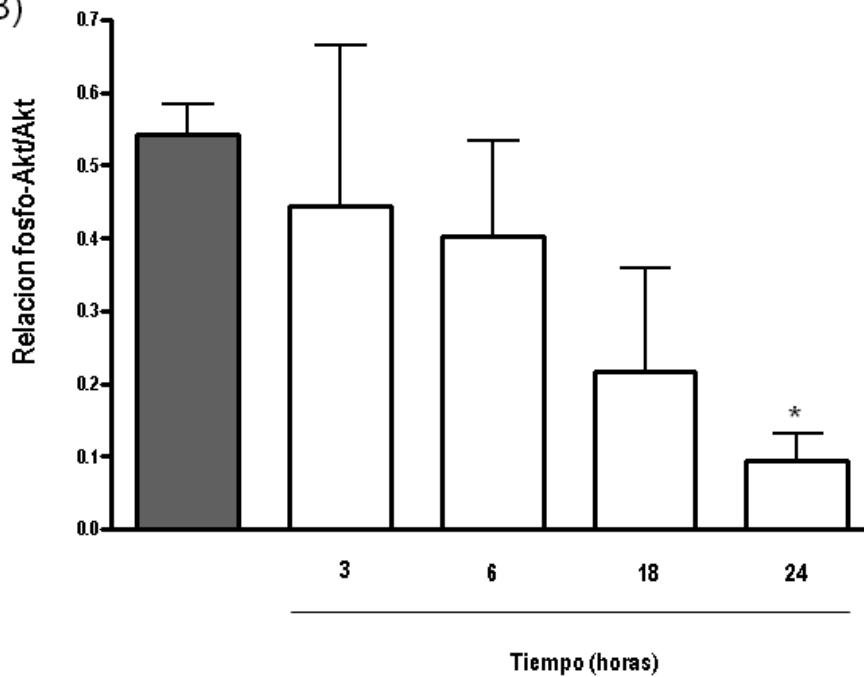


Figura 3.11: La geldanamicina disminuye la fosforilación de la proteína Akt: Las motoneuronas fueron cultivadas en placas de 33 mm a una densidad de 10.000 células/ml por 24 horas en presencia de FNT. Luego las células fueron tratadas con 0,4 nM de geldanamicina (barras vacías) o no (barras llenas), por un período de 3 a 24 horas, momento en el cual se lisaron las células y se realizó el Western blot (Materiales y Métodos). (A) Imagen representativa de un Western blot. (B) Cuantificación de los valores obtenidos luego de la densitometría de las bandas. Las barras representan la relación entre Akt fosforilado y no fosforilado (Akt total) de tres experimentos independientes. Los datos fueron analizados con el test ANOVA y posteriormente se realizó un post-test para la comparación entre grupos (Bonferroni), * $p < 0,05$ comparado con los cultivos crecidos en presencia de FNT.

Otra de las cascadas que inducen la liberación del Fas-L es la cascada de JNK. Como se describió en el Capítulo I, las motoneuronas crecidas en ausencia de factores tróficos o en presencia de NRG- β 1 y BDNF, desarrollan muerte apoptótica por un mecanismo que involucra la cascada de JNK. Sin embargo, la muerte celular

desencadenada por el tratamiento con Fas-L es independiente de dicha cascada (Raoul y col, 2005). En este contexto, investigamos si la muerte inducida por la inhibición de la proteína HSP90 depende de la activación de la cascada de JNK. Para estos experimentos, utilizamos dos inhibidores farmacológicos de JNK que inhiben la cascada a dos niveles diferentes. Como muestra la **Figura 3.12**, tanto el inhibidor para la proteína JNK (SB600125) como el inhibidor de la proteína MLK (CEP11004), no previnieron la muerte inducida por el tratamiento con geldanamicina (4 nM). Estos resultados demuestran que la vía de JNK no está involucrada en la muerte inducida por la inhibición de la proteína HSP90.

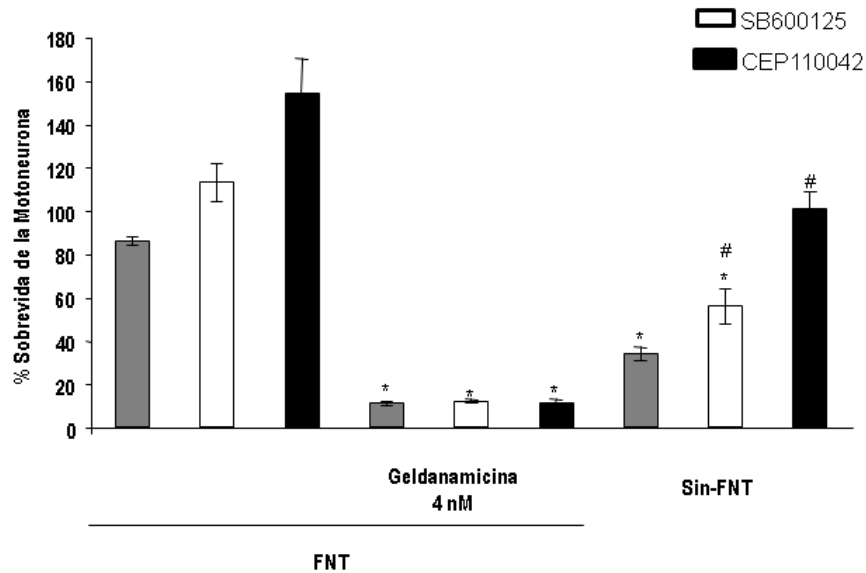


Figura 3.12: La muerte inducida por la geldanamicina es independiente de la vía JNK. Los cultivos fueron crecidos en medio suplementado con factores neurotróficos (FNT) por 24 horas. Luego fueron tratados con 4 nM de geldanamicina o puestos en medio sin factores neurotróficos (Sin-FNT) en presencia de SB600125 (5 μ M) o CEP110042 (500 nM). La viabilidad celular fue evaluada 24 horas después del tratamiento y normalizada contra los cultivos controles (FNT). Las barras representan la media \pm DS de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Los datos fueron analizados con el test ANOVA y posteriormente se realizó un post-test (Bonferroni), * $p < 0,05$ comparado con los cultivos crecidos en presencia de FNT, # $p < 0,05$ comparado con los cultivos crecidos en ausencia de factores neurotróficos.

Tomadas en conjunto, las observaciones presentadas en este capítulo sugieren que existe una sensibilidad especial de las motoneuronas a la inhibición de la proteína HSP90 lo cual desencadena su muerte celular. Esta susceptibilidad no se debe a una menor o mayor expresión de HSP90 en las motoneuronas, aunque se observó una diferencia en la expresión basal de HSP70 con respecto a otros tejidos o cultivos celulares. La muerte celular desencadenada por la inhibición de la proteína HSP90 es por vía apoptótica, y depende de la síntesis de nuevas proteínas. La geldanamicina ejerce su acción inhibiendo la proteína HSP90 y causando el bloqueo de la activación de la proteína Akt, aumentando de esta manera la producción de Fas-L, lo cual lleva a la activación de la vía extrínseca de la apoptosis. De hecho, cuando se inhibió dicha cascada con inhibidores de la caspasa 8, observamos una protección total en la supervivencia de las motoneuronas. También se observó una protección con los inhibidores de la caspasa 9, lo cual lleva a la conclusión de que la vía intrínseca de la apoptosis podría estar activada por la caspasa 8 (posiblemente por la vía de Bid, **Figura I.9**). Estos resultados concuerdan con lo observado por Raoul y col. (2005) en cultivos tratados con Fas-L.

Discusión

En los últimos años ha surgido un interés por las chaperonas HSP90 citoplasmáticas debido a su función en la maduración y activación de una variedad de proteínas oncogénicas como cRAF, bRAF, CDK4, ErbB2 y Akt (Whitesell y Lindquist, 2005; Workman y col., 2007). Adicionalmente, la HSP90 está ligada a las enfermedades causadas por los receptores de andrógenos, ya que dichos receptores forman parte de las

múltiples proteínas clientes de HSP90 (Katsuno y col., 2006). Por esta misma razón, tanto el inhibidor natural geldanamicina, como el inhibidor sintético 17-AAG, que inhiben la actividad ATPasa de la HSP90 (necesaria para la funcionalidad de HSP90), han cobrado interés en el campo de la oncología y de otras enfermedades causadas por proteínas clientes de la HSP90 (Pearl y col., 2008; Wandinger y col., 2008). En el marco de la neurodegeneración, los inhibidores de la HSP90 han sido utilizados en modelos animales de atrofia muscular espinal bulbar (SBMA, del inglés Spinal Bulbar Muscular Atrophy), la cual pertenece a las enfermedades de polyQ e involucra los receptores de andrógenos (Waza y col., 2005; Waza y col., 2006).

Si bien en todos estos estudios los inhibidores de la HSP90 se utilizaron con un fin terapéutico, en este capítulo utilizamos la geldanamicina como herramienta farmacológica para el estudio del rol de la proteína HSP90 en la sobrevivencia de la motoneurona. En el Capítulo I de esta tesis se mostró que la sobrevivencia de las motoneuronas depende de la activación de la vía de PI3K/Akt, de acuerdo con publicaciones previas (Dolcet y col., 1999b; Encinas y col., 2001; Namikawa y col., 2000; Newbern y col., 2005; Soler y col., 1999a). Por otro lado, en el Capítulo II se observó que la proteína HSP90 se encuentra nitrada en los cultivos crecidos en ausencia de factores tróficos, y que el bloqueo de la nitración de las proteínas protege a las motoneuronas de la muerte. En este capítulo demostramos que la nitración *in vitro* de HSP90 por el peroxinitrito produce una inhibición de la actividad ATPasa mayor al 75% de la actividad control. La actividad ATPasa es necesaria para la función de chaperona de la HSP90, si bien no lo es para la unión con las proteínas clientes en su actividad ATPasa (Drysdale y Brough, 2008; Pratt y col., 2008; Richter y Buchner, 2001). Este resultado en

combinación con lo previamente observado (que la proteína HSP90 se encuentra nitrada en los cultivos crecidos en ausencia de factores tróficos), sugiere un posible rol de dicha proteína en la sobrevivencia de las motoneuronas.

Interesantemente, los cultivos puros de motoneuronas fueron significativamente más sensibles a la inducción de muerte celular por la inhibición de la HSP90 que los otros tipos celulares en cultivo analizados. La CL_{50} en los cultivos de motoneuronas es 20.000 veces menor que en los cultivos de la línea celular NSC34 y entre 10 y 1.000 veces más sensible que una variedad de cultivos (**Tabla 3.1**) (Cen y col., 2006). Esta sensibilidad a la inhibición no se debe a una menor expresión de la proteína HSP90, ya que cuando se comparó la expresión de la chaperona en los cultivos de motoneuronas con otros cultivos celulares e incluso con diferentes tejidos, no se observó diferencia alguna en los niveles de expresión. En contraste, los tejidos del sistema nervioso (cerebro y médula espinal) presentaron menor expresión de la proteína HSP70 que el hígado. En cuanto a los cultivos celulares, las motoneuronas expresan 5 veces menos HSP70 que los cultivos de la línea celular NSC34. Estos resultados explicarían de alguna manera la mayor protección observada en los cultivos de la línea celular NSC34, ya que un aumento en la expresión de HSP70 está asociado con una mayor viabilidad y una mayor resistencia a la muerte en una amplia variedad de células cancerígenas y en otros tipos celulares (Powers y col., 2009), incluyendo las motoneuronas (Gifondorwa y col., 2007; Robinson y col., 2005). En el caso de las motoneuronas, se encontró que un aumento directo en la expresión de la proteína HSP70 (Robinson y col., 2005) por medio de la inducción de la respuesta de choque térmico (HSR, del inglés Heat Shock Response), o por medio de la translocación del factor de choque térmico 1 (HSF-1, del inglés Heat Shock Factor-1)

llevan a un aumento de la sobrevivencia (Batulan y col, 2006). Asimismo, la administración exógena de HSP70 a modelos animales de ELA resultó en un aumento de la sobrevivencia (Gifondorwa y col., 2007). Sin embargo, estos datos no explicarían la sensibilidad observada en las motoneuronas a la inhibición de la HSP90, aunque podríamos especular que la menor cantidad de HSP70 podría afectar la formación de los complejos HSP90 con sus proteínas clientes, y esto verse exacerbado cuando la HSP90 es inhibida. Ya que tanto la proteína HSP70, como la proteína HSC70 actúan como co-chaperonas para la HSP90. En células cancerígenas de colon se observó que el silenciamiento de los genes de HSC70 y HSP70 (simultáneamente) produce un aumento en la degradación de las proteínas clientes de HSP90, y esta disminución es similar a la observada en la inhibición de la HSP90 por sus inhibidores (Powers y col., 2008). Asimismo, estos mismos autores observaron que existe una relación negativa entre la expresión de HSP70 y la respuesta al inhibidor de HSP90 (17-AAG) en distintas líneas celulares de cáncer de colon (Powers y col., 2009).

Batulan y colaboradores mostraron una protección en la sobrevivencia de las motoneuronas en los cultivos mixtos de médulas espinales de ratones transgénicos para SOD1 cuando son tratados con 10 nM de geldanamicina (Batulan y col., 2006). Sin embargo, estas concentraciones de geldanamicina resultaron tóxicas en cultivos puros de motoneuronas (**Figura 3.2**). Esta discrepancia es debido a que en los cultivos mixtos existe una inducción de la HSP70 en las células no neuronales que podría proteger a las motoneuronas de la muerte celular, ya que al inhibir la HSP90 se produce la translocación del factor HSF-1 y la inducción de la respuesta de choque térmico (Batulan y col., 2006). Además, los astrocitos producen y liberan HSP70, la cual es captada por las

motoneuronas y ayuda a la sobrevivencia (Taylor y col., 2007b). Por otro lado, las motoneuronas presentan un umbral alto para la activación de la respuesta de choque térmico (Batulan y col., 2006), explicando por qué en los cultivos mixtos se observa protección, pero no en los cultivos puros de motoneuronas. Por otro lado, el agregado de HSP70 (externamente) protege a las motoneuronas de la muerte inducida por peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Robinson y col., 2005).

La muerte inducida por la geldanamicina es apoptótica ya que los distintos inhibidores de caspasas usados (vía extrínseca e intrínseca) protegieron a las células de este proceso (**Figura 3.6**). Por otro lado, la muerte es independiente de la producción de especies reactivas del nitrógeno o del oxígeno, ya que no se observó protección alguna cuando los cultivos fueron incubados en presencia del inhibidor de la enzima NOS (L-NAME) o en presencia de los sequestradores de anión superóxido o peroxinitrito (MnTBAP y FeTCP). Esto indica que la activación de la caspasa 9 podría deberse a un efecto secundario de la activación de la vía extrínseca por medio de la activación de Bid por parte de la caspasa 8 (**Figura I.9**). No obstante, la vía intrínseca resulta esencial ya que cuando los cultivos fueron preincubados con inhibidores de la caspasa 9, se previno la muerte inducida por geldanamicina.

Por otro lado, la vía de los receptores de muerte está directamente involucrada en la muerte inducida por geldanamicina en los cultivos de motoneuronas, ya que al incubarse las motoneuronas en presencia de una quimera que secuestra a Fas-L se observó una protección de la muerte. Estas observaciones sugieren que la proteína HSP90 tiene un rol en la inhibición de la expresión de Fas-L. También, la inhibición de la actividad ATPasa de la proteína HSP90 por la geldanamicina produce un aumento en el

mensajero para Fas-L (**Figura 3.9A**). Además, la proteína HSP90 no jugaría ningún rol en la expresión de Fas-R, ya que no se observó cambio alguno en el mensajero de dicho receptor.

En conclusión, estos resultados sugieren que la muerte celular desencadenada por la inhibición de la HSP90 envuelve la activación o inhibición de un mecanismo diferente al desencadenado en los cultivos crecidos en ausencia de factores tróficos donde sí existe un aumento en las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (**Figura 1.18**) (Estevez y col., 1998a). Estas observaciones también podrían indicar que la formación de radicales libres en los cultivos crecidos en ausencia de factores tróficos afecta un paso previo a la intervención de la proteína HSP90. Sin embargo, basándonos en la observación de que en los cultivos crecidos en ausencia de factores tróficos existe un aumento en la nitración en la proteína HSP90 (**Figura 2.6**), así como también el hecho de que las incubaciones in vitro de peroxinitrito y HSP90 disminuyen la actividad ATPasa de HSP90 (**Figura 3.1**), proponemos que los radicales libres afectarían directamente a la proteína HSP90, siendo éstos los responsables de la inhibición de la actividad ATPasa de la HSP90 mediante la nitración de la misma.

La proteína HSP90 forma un complejo con la proteína Akt, promoviendo así la estabilidad de la proteína fosforilada y su actividad kinasa (Sato y col., 2000). La inhibición de la función de la HSP90 produce la degradación de la proteína Akt (Basso y col., 2002; Solit y col., 2003). La fosforilación de Akt ejerce su acción antiapoptótica de diversas maneras. La proteína Akt fosforila a la proteína BAD, suprimiendo de esta manera su función proapoptótica (Datta y col., 1997), así como puede fosforilar la caspasa 9, previniendo su clivado (Cardone y col., 1998). Por otro lado, Akt regula la

actividad de los factores de transcripción FOXO (del inglés Forkhead Box Transcription Factor class O) (FKHRL1, FKHR, AFX) (Biggs y col., 1999; Brunet y col., 1999; Kops y Burgering, 1999). La fosforilación de FKHRL1 promueve la asociación con la proteína 14-3-3 y la retención del factor de transcripción en el citoplasma. La translocación al núcleo del factor de transcripción FKHRL1 produce la expresión de genes, y entre otros, estimula la transcripción del gen de Fas-L (Brunet y col., 1999). También la proteína Akt inhibe la actividad de la proteína supresora de tumores p53 (Yamaguchi y col., 2001). De esta manera, la proteína Akt ejerce su acción en la regulación tanto de la vía intrínseca, como de la vía extrínseca de la apoptosis. Cabe destacar en este punto que la sobrevivencia de las motoneuronas depende de la activación de la vía de Akt (como se describió en el Capítulo I de esta tesis). La inhibición de la proteína HSP90 en los cultivos de motoneuronas con geldanamicina produce la desfosforilación tiempo dependiente de la proteína Akt, no pudiendo detectarse proteína fosforilada luego de las 24 horas de tratamiento con geldanamicina (**Figura 3.11**). Esta ventana temporal es la misma a la observada en el aumento de mensajero para Fas-L, indicando una posible relación entre estos dos eventos (**Figuras 3.11 y 3.12**). Raoul y colaboradores (1999) demostraron que existe un aumento de Fas-L en los cultivos de motoneuronas crecidas en ausencia de factores tróficos, siendo Fas-L determinante para la activación de la apoptosis observada en dichos cultivos. Por otro lado, los factores de transcripción FOXO se encuentran en el citoplasma en los cultivos de motoneuronas crecidas en presencia de factores tróficos y esto es dependiente de la activación de la vía PI3K. Asimismo, la sobreexpresión de la proteína FOXO3a con los sitios de interacción con Akt mutados, desencadena la muerte de las motoneuronas crecidas en presencia de factores tróficos (Barthelemy y col., 2004).

Tantos nuestros resultados, como los resultados de la literatura, indican una clara dependencia de la activación de la vía de Akt en la sobrevivencia de la motoneurona, pero nuestros resultados, junto a los de la literatura podrían indicar que es necesaria la inhibición de los factores de FOXO para mantener la sobrevivencia en los cultivos de motoneuronas.

La vía de JNK también ha sido involucrada en la regulación de la expresión de Fas-L. En células granulares de cerebelo se observó un aumento en Fas-L mediado por la activación de la vía de JNK (Le-Niculescu y col., 1999). La muerte observada en las motoneuronas crecidas en ausencia de factores tróficos es dependiente de la activación de Fas-R (Raoul y col., 1999), y además es dependiente de la activación de la vía JNK (**Figura 1.15**). Sin embargo, Raoul y colaboradores mostraron que la muerte inducida por la activación directa del receptor de Fas es independiente de la activación de JNK (Raoul y col., 2002), indicando que la activación de JNK en los cultivos crecidos en ausencia de factores tróficos es un paso previo a la activación del receptor de Fas. En concordancia con estas observaciones, nuestros resultados demuestran que no existe activación de la vía JNK en la apoptosis inducida por la inhibición de la proteína HSP90 por la geldanamicina. Esto sugiere que la translocación del factor de transcripción FOXO al núcleo es independiente de JNK, y que la muerte desencadenada por Fas-L es independiente de la activación de esta cascada. Sin embargo, Barthélémy y col. (2004) observaron una colaboración entre la vía de Fas y la vía de JNK, la razón para esta aparente discrepancia entre nuestro trabajo y lo observado por dichos autores puede deberse al uso de diferentes inhibidores de la proteína JNK. En nuestro caso, utilizamos dos inhibidores diferentes que actúan en dos etapas de la vía JNK, observándose el

mismo resultados en las dos condiciones. Cabe destacar en este punto que la inhibición de la vía JNK tiene un efecto en los cultivos crecidos en presencia de factores tróficos (FNT), indicando cierta activación basal de esta vía que desencadena la muerte en una subpoblación de motoneuronas, incluso en cultivos crecidos en presencia de factores tróficos.

En resumen, nuestros resultados sugieren que la inhibición de la proteína HSP90 produce la inactivación de la proteína Akt, permitiendo así la translocación de los factores de transcripción FOXO al núcleo y activando la transcripción y traducción del gen de Fas-L, el cual ejerce su acción de muerte por medio del receptor Fas. Interesantemente, la muerte desencadena es independiente de la activación de JNK.

En conclusión, es importante destacar que cuando se activa directamente el receptor Fas en los cultivos de motoneuronas, se observa una muerte celular dependiente de las especies reactivas del nitrógeno y del oxígeno (Raoul y col., 2002). Sin embargo, la inhibición de la proteína HSP90 desencadena una muerte apoptótica dependiente de la activación de la vía de Fas, pero independiente de las especies reactivas. Esta diferencia puede deberse a que la inhibición de la proteína HSP90 afecta a varias proteínas clientes, afectando de una manera distinta la activación directa del receptor Fas. La proteína FLIP podría ser una de las proteínas afectadas, ya que es una proteína citoplasmática que actúa como señuelo, compitiendo con la proteína FADD por la unión a la caspasa-8, previniendo así su activación. La HSP90 es necesaria para el reclutamiento de la proteína FLIP al complejo de señalización de muerte (DISC, del inglés Death-Inducing Signaling Complex), y esto depende de la actividad ATPasa de la proteína HSP90 (Panner y col., 2007). Asimismo, los cultivos crecidos en presencia de factores tróficos presentan un

aumento en la expresión de la proteína FLIP (Raoul y col., 1999). De esta manera, es posible que la inhibición de la proteína HSP90 con la geldanamicina, no sólo produzca la inhibición de la proteína Akt, sino que también afecte el reclutamiento de la proteína FLIP, causando una mayor activación de la caspasa-8, que en los cultivos crecidos en presencia de factores tróficos y tratados con Fas-L (Raoul y col., 2002), y así independizarlo de la presencia de las especies reactivas.

CONCLUSIONES GENERALES

El objetivo principal de este trabajo fue el de estudiar los mecanismos involucrados en la sobrevida o muerte de una clase específica de neurona, las motoneuronas de la médula espinal. La caracterización de estos mecanismos proporciona un mayor entendimiento de la biología celular de las motoneuronas, aportando al conocimiento de la muerte celular durante el desarrollo y de la selectiva degeneración de motoneuronas en pacientes con ELA y otras enfermedades relacionadas.

Basándonos en los resultados presentados en esta Tesis Doctoral concluimos que la decisión de las motoneuronas en vivir o morir esta altamente regulada, y que una misma proteína puede ejercer efectos tan opuestos como activar la apoptosis o prevenirla, dependiendo del entorno celular y molecular. Asimismo, demostramos que diferentes estímulos, ya sea la ausencia de factores tróficos, la presencia de ciertos factores en conjunto (neuregulinas y neurotrofinas), o la inhibición de una determinada proteína (HSP90) activan diferentes mecanismos de muerte celular que convergen en un cierto nivel. Concretamente, nuestros estudios demuestran que las neurotrofinas y la neuregulina activan mecanismos de sobrevida en los cultivos de motoneuronas mediante la activación de la cascada de PI3K/Akt. Sin embargo, el tratamiento simultáneo con estos dos factores tróficos activa e inhibe diferentes cascadas de señalización que desencadenan la muerte celular a través de la formación de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno que conllevan a la formación de peroxinitrito y la nitración de proteínas. La muerte celular desencadenada por este tratamiento simultáneo con neuregulinas y

neurotrofinas depende de la activación de la vía de JNK y la inhibición de la vía PI3K/Akt, las mismas cascadas de señalización que son responsables de la muerte celular causada por la ausencia de factores tróficos.

Nuestros resultados también indican que la muerte celular de las motoneuronas causada por la ausencia de factores tróficos involucra la producción de peroxinitrito, siendo sus derivados los responsables de la nitración de los residuos de tirosina en las proteínas. La nitración de ciertas proteínas es determinante para la activación de la cascada de muerte celular apoptótica, ya que el agregado intracelular de péptidos conteniendo tirosinas protegen de la nitración, aumentando la viabilidad celular. De esta última observación se abre el interrogante de cuáles proteínas son afectadas por la nitración, y cuáles son necesarias para la activación de la muerte celular por apoptosis y la inhibición de las cascadas de sobrevida.

Ahondando en este interrogante, demostramos que la actividad ATPasa de la proteína HSP90 es necesaria para que los factores tróficos prevengan la muerte celular apoptótica de las motoneuronas, siendo su inhibición por la geldanamicina especialmente letal para los cultivos de motoneuronas. Además, la nitración de la proteína HSP90 disminuye la actividad ATPasa de ésta, sugiriendo que este mecanismo contribuye a la muerte celular apoptótica de las motoneuronas. De interés para la fisiopatología de la ELA, el contenido de HSP90 nitrada está elevado en las médulas espinales de pacientes con ELA y de los ratones transgénicos que son modelos experimentales de esta enfermedad.

Para concluir, este trabajo ha abierto nuevas interrogantes sobre la complejidad de la regulación de la sobrevivencia de las motoneuronas y la importancia del entorno de las mismas, proveyendo una explicación para la eficacia marginal de los factores neurotróficos en los estudios clínicos, exponiendo así un gran desafío para el desarrollo de nuevas drogas y tratamientos para el ELA y otras enfermedades asociadas con la degeneración de las motoneuronas. Asimismo, nuestros estudios promueven profundizar la caracterización de distintos mecanismos y proteínas que también podrían estar involucrados y contribuir a la muerte selectiva de las motoneuronas en la ELA.



Lic. Karina Ricart



Dr. Alvaro Estévez

REFERENCIAS

- Abe, K., Pan, L. H., Watanabe, M., Kato, T. y Itoyama, Y. (1995) Induction of nitrotyrosine-like immunoreactivity in the lower motor neuron of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett*, 199, 152-4.
- Ackery, A., Robins, S. y Fehlings, M. G. (2006) Inhibition of Fas-mediated apoptosis through administration of soluble Fas receptor improves functional outcome and reduces posttraumatic axonal degeneration after acute spinal cord injury. *J Neurotrauma*, 23, 604-16.
- Alexianu, M. E., Ho, B., Mohamed, A. H., La Bella, V., Smith, R. G. y Appel, S. H. (1994) The role of calcium-binding proteins in selective motoneuron vulnerability in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*, 36, 846-858.
- Alvarez, B. y Radi, R. (2001) Peroxynitrite decay in the presence of hydrogen peroxide, mannitol and ethanol: a reappraisal. *Free Radic Res*, 34, 467-75.
- Alvarez, B., Rubbo, H., Kirk, M., Barnes, S., Freeman, B. A. y Radi, R. (1996) Peroxynitrite-dependent tryptophan nitration. *Chem Res Toxicol*, 9, 390-6.
- Arakawa, Y., Sendtner, M. y Thoenen, H. (1990) Survival effect of ciliary neurotrophic factor (CNTF) on chick embryonic motoneurons in culture: comparison with other neurotrophic factors and cytokines. *J Neurosci*, 10, 3507-15.
- Arce, V., Pollock, R. A., Philippe, J. M., Pennica, D., Henderson, C. E. y deLapeyriere, O. (1998) Synergistic effects of schwann- and muscle-derived factors on motoneuron survival involve GDNF and cardiotrophin-1 (CT-1). *J Neurosci*, 18, 1440-8.
- Ashkenazi, A. y Dixit, V. M. (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 281, 1305-8.
- Aslan, M., Ryan, T. M., Townes, T. M., Coward, L., Kirk, M. C., Barnes, S., Alexander, C. B., Rosenfeld, S. S. y Freeman, B. A. (2003) Nitric oxide-dependent generation of reactive species in sickle cell disease. Actin tyrosine induces defective cytoskeletal polymerization. *J Biol Chem*, 278, 4194-204.
- Avila, C., Kornilayev, B. A. y Blagg, B. S. (2006) Development and optimization of a useful assay for determining Hsp90's inherent ATPase activity. *Bioorg Med Chem*, 14, 1134-42.
- Balafanova, Z., Bolli, R., Zhang, J., Zheng, Y., Pass, J. M., Bhatnagar, A., Tang, X. L., Wang, O., Cardwell, E. y Ping, P. (2002) Nitric oxide (NO) induces nitration of protein kinase Cepsilon (PKCepsilon), facilitating PKCepsilon translocation via enhanced PKCepsilon -RACK2 interactions: a novel mechanism of no-triggered activation of PKCepsilon. *J Biol Chem*, 277, 15021-7.
- Barbacci, E. G., Guarino, B. C., Stroh, J. G., Singleton, D. H., Rosnack, K. J., Moyer, J. D. y Andrews, G. C. (1995) The structural basis for the specificity of epidermal growth factor and heregulin binding. *J Biol Chem*, 270, 9585-9.

- Barthelemy, C., Henderson, C. E. y Pettmann, B. (2004) Foxo3a induces motoneuron death through the Fas pathway in cooperation with JNK. *BMC Neurosci*, 5, 48.
- Basso, A. D., Solit, D. B., Chiosis, G., Giri, B., Tschlis, P. y Rosen, N. (2002) Akt forms an intracellular complex with heat shock protein 90 (Hsp90) and Cdc37 and is destabilized by inhibitors of Hsp90 function. *J Biol Chem*, 277, 39858-66.
- Basso, M., Samengo, G., Nardo, G., Massignan, T., D'Alessandro, G., Tartari, S., Cantoni, L., Marino, M., Cheroni, C., De Biasi, S., Giordana, M. T., Strong, M. J., Estevez, A. G., Salmons, M., Bendotti, C. y Bonetto, V. (2009) Characterization of detergent-insoluble proteins in ALS indicates a causal link between oxidative stress and aggregation in pathogenesis. *PLoS One*, 4, e8130.
- Basu, A. y Haldar, S. (1998) The relationship between Bcl2, Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death. *Mol Hum Reprod*, 4, 1099-109.
- Basu, S., Azarova, N. A., Font, M. D., King, S. B., Hogg, N., Gladwin, M. T., Shiva, S. y Kim-Shapiro, D. B. (2008) Nitrite reductase activity of cytochrome c. *J Biol Chem*, 283, 32590-7.
- Basu, S., Keszler, A., Azarova, N. A., Nwanze, N., Perlegas, A., Shiva, S., Broniowska, K. A., Hogg, N. y Kim-Shapiro, D. B. (2009) A novel role for cytochrome c: Efficient catalysis of S-nitrosothiol formation. *Free Radic Biol Med*.
- Batinic-Haberle, I., Cuzzocrea, S., Reboucas, J. S., Ferrer-Sueta, G., Mazzon, E., Di Paola, R., Radi, R., Spasojevic, I., Benov, L. y Salvemini, D. (2009) Pure MnTBAP selectively scavenges peroxynitrite over superoxide: comparison of pure and commercial MnTBAP samples to MnTE-2-PyP in two models of oxidative stress injury, an SOD-specific Escherichia coli model and carrageenan-induced pleurisy. *Free Radic Biol Med*, 46, 192-201.
- Batulan, Z., Taylor, D. M., Aarons, R. J., Minotti, S., Doroudchi, M. M., Nalbantoglu, J. y Durham, H. D. (2006) Induction of multiple heat shock proteins and neuroprotection in a primary culture model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis*, 24, 213-25.
- Beal, M. F., Ferrante, R. J., Browne, S. E., Matthews, R. T., Kowall, N. W. y Brown, R. H., Jr. (1997) Increased 3-nitrotyrosine in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*, 42, 644-54.
- Beck, M., Flachenecker, P., Magnus, T., Giess, R., Reiners, K., Toyka, K. V. y Naumann, M. (2005) Autonomic dysfunction in ALS: a preliminary study on the effects of intrathecal BDNF. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*, 6, 100-3.
- Beckman, J. S. (1996a) Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chem Res Toxicol*, 9, 836-44.
- Beckman, J. S. (1996b) *The Physiological and Pathological Chemistry of Nitric Oxide*. New York: Academic Press, 1-82.
- Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A. y Freeman, B. A. (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 1620-4.
- Beckman, J. S., Carson, M., Smith, C. D. y Koppenol, W. H. (1993) ALS, SOD and peroxynitrite. *Nature*, 364, 584.

- Beckman, J. S., Ischiropoulos, H., Zhu, L., van der Woerd, M., Smith, C., Chen, J., Harrison, J., Martin, J. C. y Tsai, M. (1992) Kinetics of superoxide dismutase- and iron-catalyzed nitration of phenolics by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys*, 298, 438-45.
- Beckman, J. S. y Koppenol, W. H. (1996) Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol*, 271, C1424-37.
- Beere, H. M. (2004) "The stress of dying": the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *J Cell Sci*, 117, 2641-51.
- Beere, H. M. (2005) Death versus survival: functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways. *J Clin Invest*, 115, 2633-9.
- Ben-Baruch, N. y Yarden, Y. (1994) Neu differentiation factors: a family of alternatively spliced neuronal and mesenchymal factors. *Proc Soc Exp Biol Med*, 206, 221-7.
- Bermingham-McDonogh, O., McCabe, K. L. y Reh, T. A. (1996) Effects of GGF/neuregulins on neuronal survival and neurite outgrowth correlate with erbB2/neu expression in developing rat retina. *Development*, 122, 1427-38.
- Bermingham-McDonogh, O., Xu, Y. T., Marchionni, M. A. y Scherer, S. S. (1997) Neuregulin expression in PNS neurons: isoforms and regulation by target interactions. *Mol Cell Neurosci*, 10, 184-95.
- Bibel, M., Hoppe, E. y Barde, Y. A. (1999) Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR. *EMBO J*, 18, 616-22.
- Biggs, W. H., 3rd, Meisenhelder, J., Hunter, T., Cavenee, W. K. y Arden, K. C. (1999) Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 7421-6.
- Bowling, A. C., Barkowski, E. E., McKenna-Yasek, D., Sapp, P., Horvitz, H. R., Beal, M. F. y Brown, R. H., Jr. (1995) Superoxide dismutase concentration and activity in familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*, 64, 2366-9.
- Breuleux, M. (2007) Role of heregulin in human cancer. *Cell Mol Life Sci*, 64, 2358-77.
- Britsch, S., Li, L., Kirchhoff, S., Theuring, F., Brinkmann, V., Birchmeier, C. y Riethmacher, D. (1998) The ErbB2 and ErbB3 receptors and their ligand, neuregulin-1, are essential for development of the sympathetic nervous system. *Genes Dev*, 12, 1825-36.
- Brockes, J. P. (1997) Amphibian limb regeneration: rebuilding a complex structure. *Science*, 276, 81-7.
- Brown, R. H., Jr; Meininger V; Swash M (2000) Amyotrophic Lateral Sclerosis.
- Bruijn, L. I., Miller, T. M. y Cleveland, D. W. (2004) Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annu Rev Neurosci*, 27, 723-49.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J. y Greenberg, M. E. (1999) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*, 96, 857-68.
- Brunet, A., Datta, S. R. y Greenberg, M. E. (2001) Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Current Opinion in Neurobiology*, 11, 297-305.
- Buonanno, A. y Fischbach, G. D. (2001) Neuregulin and ErbB receptor signaling pathways in the nervous system. *Current Opinion in Neurobiology*, 11, 287-296.
- Burden, S. y Yarden, Y. (1997) Neuregulins and their receptors: a versatile signaling module in organogenesis and oncogenesis. *Neuron*, 18, 847-55.

- Burgess, A. W. (2008) EGFR family: structure physiology signalling and therapeutic targets. *Growth Factors*, 26, 263-74.
- Burgess, A. W., Cho, H. S., Eigenbrot, C., Ferguson, K. M., Garrett, T. P., Leahy, D. J., Lemmon, M. A., Sliwkowski, M. X., Ward, C. W. y Yokoyama, S. (2003) An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell*, 12, 541-52.
- Camu, W., Billiard, M. y Baldy-Moulinier, M. (1993) Fasting plasma and CSF amino acid levels in amyotrophic lateral sclerosis: a sub-type analysis. *Acta Neurol Scand*, 88, 51-55.
- Canoll, P. D., Musacchio, J. M., Hardy, R., Reynolds, R., Marchionni, M. A. y Salzer, J. L. (1996) GGF/neuregulin is a neuronal signal that promotes the proliferation and survival and inhibits the differentiation of oligodendrocyte progenitors. *Neuron*, 17, 229-43.
- Cardone, M. H., Roy, N., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., Franke, T. F., Stanbridge, E., Frisch, S. y Reed, J. C. (1998) Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*, 282, 1318-21.
- Carpenter, G., Lembach, K. J., Morrison, M. M. y Cohen, S. (1975) Characterization of the binding of 125-I-labeled epidermal growth factor to human fibroblasts. *J Biol Chem*, 250, 4297-304.
- Carroll, S. L., Miller, M. L., Frohnert, P. W., Kim, S. S. y Corbett, J. A. (1997) Expression of neuregulins and their putative receptors, ErbB2 and ErbB3, is induced during Wallerian Degeneration. *The Journal of Neuroscience*, 17, 1642-1659.
- Carter, B. D., Kaltschmidt, C., Kaltschmidt, B., Offenhauser, N., Bohm-Matthaei, R., Baeuerle, P. A. y Barde, Y. A. (1996) Selective activation of NF-kappa B by nerve growth factor through the neurotrophin receptor p75. *Science*, 272, 542-5.
- Carter, B. D. y Lewin, G. R. (1997) Neurotrophins live or let die: does p75NTR decide? *Neuron*, 18, 187-90.
- Casaccia-Bonnet, P., Carter, B. D., Dobrowsky, R. T. y Chao, M. V. (1996) Death of oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75. *Nature*, 383, 716-9.
- Casaccia-Bonnet, P., Gu, C., Khursigara, G. y Chao, M. V. (1999) p75 neurotrophin receptor as a modulator of survival and death decisions. *Microsc Res Tech*, 45, 217-24.
- Cassina, A. M., Hodara, R., Souza, J. M., Thomson, L., Castro, L., Ischiropoulos, H., Freeman, B. A. y Radi, R. (2000) Cytochrome c nitration by peroxynitrite. *J Biol Chem*, 275, 21409-15.
- Castro, L., Rodriguez, M. y Radi, R. (1994) Aconitase is readily inactivated by peroxynitrite, but not by its precursor, nitric oxide. *J Biol Chem*, 269, 29409-15.
- Cen, X., Nitta, A., Ohya, S., Zhao, Y., Ozawa, N., Mouri, A., Ibi, D., Wang, L., Suzuki, M., Saito, K., Ito, Y., Kawagoe, T., Noda, Y., Furukawa, S. y Nabeshima, T. (2006) An analog of a dipeptide-like structure of FK506 increases glial cell line-derived neurotrophic factor expression through cAMP response element-binding protein activated by heat shock protein 90/Akt signaling pathway. *J Neurosci*, 26, 3335-44.

- Cereda, C., Baiocchi, C., Bongioanni, P., Cova, E., Guareschi, S., Metelli, M. R., Rossi, B., Sbalsi, I., Cuccia, M. C. y Ceroni, M. (2008) TNF and sTNFR1/2 plasma levels in ALS patients. *J Neuroimmunol*, 194, 123-31.
- Chandler, C. E., Parsons, L. M., Hosang, M. y Shooter, E. M. (1984) A monoclonal antibody modulates the interaction of nerve growth factor with PC12 cells. *J Biol Chem*, 259, 6882-9.
- Chang, H., Riese, D. J., 2nd, Gilbert, W., Stern, D. F. y McMahan, U. J. (1997) Ligands for ErbB-family receptors encoded by a neuregulin-like gene. *Nature*, 387, 509-12.
- Chao, M. V. y Bothwell, M. (2002) Neurotrophins: To cleave or not to cleave. *Neuron*, 33, 9-12.
- Chao, M. V. y Hempstead, B. L. (1995) p75 and Trk: a two-receptor system. *Trends Neurosci*, 18, 321-6.
- Charcot, J. (1869) A J. Deux cas d'atrophie musculaire progressive avec lesions de la substance grise et de faisceaux anterolateraux de la moelle epiniere. *Arch Physiol Norm Pathol*, 1.
- Cheema, S. S., Barrett, G. L. y Bartlett, P. F. (1996) Reducing p75 nerve growth factor receptor levels using antisense oligonucleotides prevents the loss of axotomized sensory neurons in the dorsal root ganglia of newborn rats. *J Neurosci Res*, 46, 239-45.
- Cho, H. S. y Leahy, D. J. (2002) Structure of the extracellular region of HER3 reveals an interdomain tether. *Science*, 297, 1330-3.
- Citri, A., Skaria, K. B. y Yarden, Y. (2003) The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Exp Cell Res*, 284, 54-65.
- Cohen, O., Kohen, R., Lavon, E., Abramsky, O. y Steiner, I. (1996) Serum Cu/Zn superoxide dismutase activity is reduced in sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *J Neurol Sci*, 143, 118-20.
- Cohen, S. (1965) The stimulation of epidermal proliferation by a specific protein (EGF). *Dev Biol*, 12, 394-407.
- Cohen, S. y Levi-Montalcini, R. (1956) A Nerve Growth-Stimulating Factor Isolated from Snake Venom. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 42, 571-4.
- Cohen, S. y Levi-Montalcini, R. (1957) Purification and properties of a nerve growth-promoting factor isolated from mouse sarcoma 180. *Cancer Res.*, 17, 15-20.
- Cohen, S., Levi-Montalcini, R. y Hamburger, V. (1954) A Nerve Growth-Stimulating Factor Isolated from Sarcom as 37 and 180. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 40, 1014-8.
- Corfas, G., Rosen, K. M., Aratake, H., Krauss, R. y Fischbach, G. D. (1995) Differential expression of ARIA isoforms in the rat brain. *Neuron*, 14, 103-115.
- Coussens, L., Yang-Feng, T. L., Liao, Y. C., Chen, E., Gray, A., McGrath, J., Seeburg, P. H., Libermann, T. A., Schlessinger, J., Francke, U. y et al. (1985) Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science*, 230, 1132-9.
- Cowley, S., Paterson, H., Kemp, P. y Marshall, C. J. (1994) Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell*, 77, 841-52.

- Crosland, D. R., Schoell, M. C., Ford, G. D., Pulliam, J. V., Gates, A., Clement, C. M., Harris, A. E. y Ford, B. D. (2008) Neuroprotective effects of neuregulin-1 on B35 neuronal cells following ischemia. *Brain Res*, 1210, 39-47.
- Crow, J. P., Beckman, J. S. y McCord, J. M. (1995) Sensitivity of the essential zinc-thiolate moiety of yeast alcohol dehydrogenase to hypochlorite and peroxynitrite. *Biochemistry*, 34, 3544-52.
- Crow, J. P. y Ischiropoulos, H. (1996) Detection and quantitation of nitrotyrosine residues in proteins: in vivo marker of peroxynitrite. *Methods Enzymol*, 269, 185-94.
- Crow, J. P., Sampson, J. B., Zhuang, Y., Thompson, J. A. y Beckman, J. S. (1997a) Decreased zinc affinity of amyotrophic lateral sclerosis-associated superoxide dismutase mutants leads to enhanced catalysis of tyrosine nitration by peroxynitrite. *Journal of Neurochemistry*, 69, 1936-1944.
- Crow, J. P., Ye, Y. Z., Strong, M., Kirk, M., Barmes, S. y Beckman, J. S. (1997b) Superoxide Dismutase Catalyzes nitration of tyrosines by peroxynitrite in the rod and head domains of neurofilament-L. *Journal of Neurochemistry*, 69, 1945-1953.
- Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y. y Greenberg, M. E. (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*, 91, 231-41.
- Davis, R. J. (2000) Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*, 103, 239-52.
- Dawbarn, D. y Allen, S. J. (2003) Neurotrophins and neurodegeneration. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 29, 211-230.
- Deng, H. X., Hentati, A., Tainer, J. A., Iqbal, Z., Cayabyab, A., Hung, W. Y., Getzoff, E. D., Hu, P., Herzfeldt, B., Roos, R. P. y et al. (1993) Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase. *Science*, 261, 1047-51.
- Derkinderen, P., Enslin, H. y Girault, J. A. (1999) The ERK/MAP-kinases cascade in the nervous system. *Neuroreport*, 10, R24-34.
- Derynck, R., Roberts, A. B., Winkler, M. E., Chen, E. Y. y Goeddel, D. V. (1984) Human transforming growth factor- α : precursor structure and expression in *E. coli*. *Cell*, 38, 287-97.
- Dewil, M., dela Cruz, V. F., Van Den Bosch, L. y Robberecht, W. (2007) Inhibition of p38 mitogen activated protein kinase activation and mutant SOD1(G93A)-induced motor neuron death. *Neurobiol Dis*, 26, 332-41.
- Di Segni, A., Farin, K. y Pinkas-Kramarski, R. (2006) ErbB4 activation inhibits MPP⁺-induced cell death in PC12-ErbB4 cells: involvement of PI3K and Erk signaling. *J Mol Neurosci*, 29, 257-67.
- Di Segni, A., Shaharabani, E., Stein, R. y Pinkas-Kramarski, R. (2005) Neuregulins rescue PC12-ErbB-4 cells from cell death induced by beta-amyloid peptide: involvement of PI3K and PKC. *J Mol Neurosci*, 26, 57-69.
- Didelot, C., Schmitt, E., Brunet, M., Maingret, L., Parcellier, A. y Garrido, C. (2006) Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Handb Exp Pharmacol*, 171-98.
- Diller, K. R. (2006) Stress protein expression kinetics. *Annu Rev Biomed Eng*, 8, 403-24.

- Dobrowsky, R. T., Jenkins, G. M. y Hannun, Y. A. (1995) Neurotrophins induce sphingomyelin hydrolysis. Modulation by co-expression of p75NTR with Trk receptors. *J Biol Chem*, 270, 22135-42.
- Dolcet, X., Egea, J., Soler, R. M., Martin-Zanca, D. y Comella, J. X. (1999a) Activation of phosphatidylinositol 3-kinase, but not extracellular-regulated kinases, is necessary to mediate brain-derived neurotrophic factor-induced motoneuron survival. *J Neurochem*, 73, 521-31.
- Dolcet, X., Egea, J., Soler, R. M., Martin-Zanca, D. y Comella, J. X. (1999b) Activation of phosphatidylinositol 3-kinase, but not extracellular-regulated kinases, is necessary to mediate brain-derived neurotrophic factor-induced motoneuron survival. *Journal of Neurochemistry*, 521-531.
- Dong, Z., Brennan, A., Liu, N., Yarden, Y., Lefkowitz, G., Mirsky, R. y Jessen, K. R. (1995) Neu differentiation factor is a neuron-glia signal and regulates survival, proliferation, and maturation of rat Schwann cell precursors. *Neuron*, 15, 585-96.
- Drysdale, M. J. y Brough, P. A. (2008) Medicinal chemistry of Hsp90 inhibitors. *Curr Top Med Chem*, 8, 859-68.
- Eide, F. F., Vining, E. R., Eide, B. L., Zang, K., Wang, X. Y. y Reichardt, L. F. (1996) Naturally occurring truncated trkB receptors have dominant inhibitory effects on brain-derived neurotrophic factor signaling. *J Neurosci*, 16, 3123-9.
- Eiserich, J. P., Hristova, M., Cross, C. E., Jones, A. D., Freeman, B. A., Halliwell, B. y van der Vliet, A. (1998) Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature*, 391, 393-7.
- Encinas, M., Tansey, M. G., Tsui-Pierchala, B. A., Comella, J. X., Milbrandt, J. y Johnson, E. M., Jr. (2001) c-Src is required for glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) family ligand-mediated neuronal survival via a phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K)-dependent pathway. *J Neurosci*, 21, 1464-72.
- Enokido, Y., Wyatt, S. y Davies, A. M. (1999) Developmental changes in the response of trigeminal neurons to neurotrophins: influence of birthdate and the ganglion environment. *Development*, 126, 4365-73.
- Erickson, S. L., O'Shea, K. S., Ghaboosi, N., Loverro, L., Frantz, G., Bauer, M., Lu, L. H. y Moore, M. W. (1997) ErbB3 is required for normal cerebellar and cardiac development: a comparison with ErbB2- and heregulin-deficient mice. *Development*, 124, 4999-5011.
- Erlich, S., Goldshmit, Y., Lupowitz, Z. y Pinkas-Kramarski, R. (2001) ErbB-4 activation inhibits apoptosis in PC12 cells. *Neuroscience*, 107, 353-62.
- Ernfors, P., Henschen, A., Olson, L. y Persson, H. (1989) Expression of nerve growth factor receptor mRNA is developmentally regulated and increased after axotomy in rat spinal cord motoneurons. *Neuron*, 2, 1605-13.
- Estevez, A. G., Crow, J. P., Sampson, J. B., Reiter, C., Zhuang, Y., Richardson, G. J., Tarpey, M. M., Barbeito, L. y Beckman, J. S. (1999a) Induction of Nitric Oxide dependent apoptosis in motor neurons by zinc-deficient superoxide dismutase. *Science*, 286, 2498-2500.
- Estevez, A. G., Sampson, J. B., Zhuang, Y., Spear, N., Richardson, G. J., Crow, J. P., Tarpey, M. M., Barbeito, L. y Beckman, J. S. (2000) Liposome-delivered

- superoxide dismutase prevents nitric oxide-dependent motor neuron death induced by trophic factor withdrawal.
- Estevez, A. G., Spear, N., Manuel, S. M., Radi, R., Henderson, C. E., Barbeito, L. y Beckman, J. S. (1998a) Nitric Oxide and Superoxide contribute to Motor Neuron Apoptosis Induced by Trophic Factor Deprivation. *Journal of Neuroscience*, 18, 923-931.
- Estevez, A. G., Spear, N., Pelluffo, H., Kamaid, A., Barbeito, L. y Beckman, J. S. (1999b) Examined apoptosis in cultured cells after exposure to nitric oxide and peroxynitrite. *Methods in Enzymology*, 301, 393-402.
- Estevez, A. G., Spear, N., Thompson, J. A., Cornwell, T. L., Radi, R., Barbeito, L. y Beckman, J. S. (1998b) Nitric Oxide-Dependent Production of cGMP supports the survival of rat embryonic motor neurons cultured with Brain-Derived Neurotrophic Factor. *The journal of Neuroscience*, 18, 3708-3714.
- Estus, S., Zaks, W. J., Freeman, R. S., Gruda, M., Bravo, R. y Johnson, E. M., Jr. (1994) Altered gene expression in neurons during programmed cell death: identification of c-jun as necessary for neuronal apoptosis. *J Cell Biol*, 127, 1717-27.
- Falls, D. L. (2003a) Neuregulins and the neuromuscular system: 10 years of answers and questions. *J Neurocytol*, 32, 619-47.
- Falls, D. L. (2003b) Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. *Experimental Cell Research*, 284, 14-30.
- Falls, D. L., Harris, D. A., Johnson, F. A., Morgan, M. M., Corfas, G. y Fischbach, G. D. (1990) Mr 42,000 ARIA: a protein that may regulate the accumulation of acetylcholine receptors at developing chick neuromuscular junctions. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 55, 397-406.
- Falls, D. L., Rosen, K. M., Corfas, G., Lane, W. S. y Fischbach, G. D. (1993) ARIA, a protein that stimulates acetylcholine receptor synthesis, is a member of the neu ligand family. *Cell*, 72, 801-15.
- Ferguson, K. M., Berger, M. B., Mendrola, J. M., Cho, H. S., Leahy, D. J. y Lemmon, M. A. (2003) EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. *Mol Cell*, 11, 507-17.
- Ferrante, R. J., Browne, S. E., Shinobu, L. A., Bowling, A. C., Baik, M. J., MacGarvey, U., Kowall, N. W., Brown, R. H., Jr. y Beal, M. F. (1997) Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*, 69, 2064-74.
- Ferri, C. C., Moore, F. A. y Bisby, M. A. (1998) Effects of facial nerve injury on mouse motoneurons lacking the p75 low-affinity neurotrophin receptor. *J Neurobiol*, 34, 1-9.
- Fischbach, G. D. (1972) Synapse formation between dissociated nerve and muscle cells in low density cell cultures. *Dev Biol*, 28, 407-29.
- Fischbach, G. D. y Rosen, K. M. (1997) ARIA: a neuromuscular junction neuregulin. *Annu Rev Neurosci*, 20, 429-58.
- Fizman, M. L., Borodinsky, L. N., Ricart, K. C., Sanz, O. P. y Sica, R. E. (1999) Cu/Zn superoxide dismutase activity at different ages in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci*, 162, 34-7.

- Flores, A. I., Mallon, B. S., Matsui, T., Ogawa, W., Rosenzweig, A., Okamoto, T. y Macklin, W. B. (2000) Akt-Mediated Survival of Oligodendrocytes induced by neuregulin. *The Journal of Neuroscience*, 20, 7622-7630.
- Fornai, F., Longone, P., Cafaro, L., Kastsuchenka, O., Ferrucci, M., Manca, M. L., Lazzeri, G., Spalloni, A., Bellio, N., Lenzi, P., Modugno, N., Siciliano, G., Isidoro, C., Murri, L., Ruggieri, S. y Paparelli, A. (2008) Lithium delays progression of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 2052-7.
- Frank, E. y Fischbach, G. D. (1979) Early events in neuromuscular junction formation in vitro: induction of acetylcholine receptor clusters in the postsynaptic membrane and morphology of newly formed synapses. *J Cell Biol*, 83, 143-58.
- Freeman, B. C., Myers, M. P., Schumacher, R. y Morimoto, R. I. (1995) Identification of a regulatory motif in Hsp70 that affects ATPase activity, substrate binding and interaction with HDJ-1. *EMBO J*, 14, 2281-92.
- Frohnert, P. W., Stonecypher, M. S. y Carroll, S. L. (2003) Constitutive activation of the neuregulin-1/ErbB receptor signaling pathway is essential for the proliferation of a neoplastic Schwann cell line. *Glia*, 43, 104-18.
- Garrett, T. P., McKern, N. M., Lou, M., Elleman, T. C., Adams, T. E., Lovrecz, G. O., Zhu, H. J., Walker, F., Frenkel, M. J., Hoyne, P. A., Jorissen, R. N., Nice, E. C., Burgess, A. W. y Ward, C. W. (2002) Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha. *Cell*, 110, 763-73.
- Garrido, C., Gurbuxani, S., Ravagnan, L. y Kroemer, G. (2001) Heat Shock Proteins: Endogenous Modulators of Apoptotic Cell Death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 286, 433-442.
- Gifondorwa, D. J., Robinson, M. B., Hayes, C. D., Taylor, A. R., Pevette, D. M., Oppenheim, R. W., Caress, J. y Milligan, C. E. (2007) Exogenous delivery of heat shock protein 70 increases lifespan in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci*, 27, 13173-80.
- Glicksman, M. A., Chiu, A. Y., Dionne, C. A., Harty, M., Kaneko, M., Murakata, C., Oppenheim, R. W., Pevette, D., Sengelaub, D. R., Vaught, J. L. y Neff, N. T. (1998) CEP-1347/KT7515 prevents motor neuronal programmed cell death and injury-induced dedifferentiation in vivo. *J Neurobiol*, 35, 361-70.
- Goodearl, A. D., Davis, J. B., Mistry, K., Minghetti, L., Otsu, M., Waterfield, M. D. y Stroobant, P. (1993) Purification of multiple forms of glial growth factor. *J Biol Chem*, 268, 18095-102.
- Gow, A. J., McClelland, M., Garner, S. E., Malcolm, S. y Ischiropoulos, H. (1998) The determination of nitrotyrosine residues in proteins. *Methods Mol Biol*, 100, 291-9.
- Graus-Porta, D., Beerli, R. R., Daly, J. M. y Hynes, N. E. (1997) ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J*, 16, 1647-55.
- Grinspan, J. B., Marchionni, M. A., Reeves, M., Coulaloglou, M. y Scherer, S. S. (1996) Axonal interactions regulate Schwann cell apoptosis in developing peripheral nerve: neuregulin receptors and the role of neuregulins. *J Neurosci*, 16, 6107-18.
- Group, T. B. s. (1999) A controlled trial of recombinant methionyl human BDNF in ALS: The BDNF Study Group (Phase III). *Neurology*, 52, 1427-33.

- Gurney, M. E., Pu, H., Chiu, A. Y., Corto, M. C. D., Polchow, C. Y., Alexander, D. D., Caliendo, J., Hentati, A., Kwon, Y. W., Deng, H.-X., Chen, W., Zhai, P., Sufit, R. L. y Siddique, T. (1994) Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science*, 264, 1772-1775.
- Haase, G., Pettmann, B., Raoul, C. y Henderson, C. E. (2008) Signaling by death receptors in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol*, 18, 284-91.
- Haddad, I. Y., Holm, B. A., Hlavaty, L. y Matalon, S. (1994) Dependence of surfactant function on extracellular pH: mechanisms and modifications. *J Appl Physiol*, 76, 657-62.
- Hamburger, V. (1934) The effects of wing bud extirpation on the development of the central nervous system in chick embryos. *J. Exp. Zool.*, 68, 449-94.
- Hamburger, V. (1939) Motor and sensory hyperplasia following limb-bud transplantations in chick embryos. *Physiol. Zool.*, 12, 221-83.
- Hanson, M. G., Jr., Shen, S., Wiemelt, A. P., McMorris, F. A. y Barres, B. A. (1998) Cyclic AMP elevation is sufficient to promote the survival of spinal motor neurons in vitro. *J Neurosci*, 18, 7361-71.
- Harari, D., Tzahar, E., Romano, J., Shelly, M., Pierce, J. H., Andrews, G. C. y Yarden, Y. (1999) Neuregulin-4: a novel growth factor that acts through the ErbB-4 receptor tyrosine kinase. *Oncogene*, 18, 2681-9.
- Heldin, C. H. (1995) Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell*, 80, 213-23.
- Hempstead, B. L., Martin-Zanca, D., Kaplan, D. R., Parada, L. F. y Chao, M. V. (1991) High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature*, 350, 678-83.
- Henderson, C. E., Camu, W., Mettling, C., Gouin, A., Poulsen, K., Karihaloo, M., Rullamas, J., Evans, T., McMahan, S. B., Armanini, M. P. y et al. (1993) Neurotrophins promote motor neuron survival and are present in embryonic limb bud. *Nature*, 363, 266-70.
- Henderson, C. E., Phillips, H. S., Pollock, R. A., Davies, A. M., Lemeulle, C., Armanini, M., Simmons, L., Moffet, B., Vandlen, R. A., Simpson, L. C. y et al. (1994) GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. *Science*, 266, 1062-4.
- Hensley, K., Fedynyshyn, J., Ferrell, S., Floyd, R. A., Gordon, B., Grammas, P., Hamdheydari, L., Mhatre, M., Mou, S., Pye, Q. N., Stewart, C., West, M., West, S. y Williamson, K. S. (2003) Message and protein-level elevation of tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) and TNF alpha-modulating cytokines in spinal cords of the G93A-SOD1 mouse model for amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis*, 14, 74-80.
- Hensley, K., Mhatre, M., Mou, S., Pye, Q. N., Stewart, C., West, M. y Williamson, K. S. (2006) On the relation of oxidative stress to neuroinflammation: lessons learned from the G93A-SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Antioxid Redox Signal*, 8, 2075-87.
- Higashiyama, S., Horikawa, M., Yamada, K., Ichino, N., Nakano, N., Nakagawa, T., Miyagawa, J., Matsushita, N., Nagatsu, T., Taniguchi, N. y Ishiguro, H. (1997) A novel brain-derived member of the epidermal growth factor family that interacts with ErbB3 and ErbB4. *J Biochem*, 122, 675-80.

- Hightower, L. E. y Hendershot, L. M. (1997) Molecular chaperones and the heat shock response at Cold Spring Harbor. *Cell Stress Chaperones*, 2, 1-11.
- Ho, W. H., Armanini, M. P., Nuijens, A., Phillips, H. S. y Osheroff, P. L. (1995) Sensory and motor neuron-derived factor. A novel heregulin variant highly expressed in sensory and motor neurons. *J Biol Chem*, 270, 14523-32.
- Holmes, W. E., Sliwkowski, M. X., Akita, R. W., Henzel, W. J., Lee, J., Park, J. W., Yansura, D., Abadi, N., Raab, H., Lewis, G. D. y et al. (1992) Identification of heregulin, a specific activator of p185erbB2. *Science*, 256, 1205-10.
- Hu, S. y Reichardt, L. F. (1999) From membrane to cytoskeleton: enabling a connection. *Neuron*, 22, 419-22.
- Huber, L. J. y Chao, M. V. (1995) A potential interaction of p75 and trkA NGF receptors revealed by affinity crosslinking and immunoprecipitation. *J Neurosci Res*, 40, 557-63.
- Huettner, J. E. y Baughman, R. W. (1986) Primary culture of identified neurons from the visual cortex of postnatal rats. *J Neurosci*, 6, 3044-60.
- Hughes, R. A., Sendtner, M. y Thoenen, H. (1993) Members of several gene families influence survival of rat motoneurons in vitro and in vivo. *J Neurosci Res*, 36, 663-71.
- Ischiropoulos, H. y Gow, A. (2005) Pathophysiological functions of nitric oxide-mediated protein modifications. *Toxicology*, 208, 299-303.
- Ischiropoulos, H., Zhu, L., Chen, J., Tsai, M., Martin, J. C., Smith, C. D. y Beckman, J. S. (1992) Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys*, 298, 431-7.
- Jessell, T. M., Siegel, R. E. y Fischbach, G. D. (1979) Induction of acetylcholine receptors on cultured skeletal muscle by a factor extracted from brain and spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 5397-401.
- Ji, Y., Neverova, I., Van Eyk, J. E. y Bennett, B. M. (2006) Nitration of tyrosine 92 mediates the activation of rat microsomal glutathione s-transferase by peroxynitrite. *J Biol Chem*, 281, 1986-91.
- Jiang, Y., Chen, C., Li, Z., Guo, W., Gegner, J. A., Lin, S. y Han, J. (1996) Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta). *J Biol Chem*, 271, 17920-6.
- Jiang, Y., Gram, H., Zhao, M., New, L., Gu, J., Feng, L., Di Padova, F., Ulevitch, R. J. y Han, J. (1997) Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38delta. *J Biol Chem*, 272, 30122-8.
- Jo, S. A., Zhu, X., Marchionni, M. A. y Burden, S. J. (1995) Neuregulins are concentrated at nerve-muscle synapses and activate ACh-receptor gene expression. *Nature*, 373, 158-61.
- Jones, J. T., Akita, R. W. y Sliwkowski, M. X. (1999) Binding specificities and affinities of egf domains for ErbB receptors. *FEBS Lett*, 447, 227-31.
- Kalb, R. (2005) The protean actions of neurotrophins and their receptors on the life and death of neurons. *Trends Neurosci*, 28, 5-11.
- Kaplan, D. R. y Miller, F. D. (1997) Signal transduction by the neurotrophin receptors. *Curr Opin Cell Biol*, 9, 213-21.

- Kaplan, D. R. y Miller, F. D. (2000) Neurotrophic signal transduction in the nervous system. *Current Opinion in Neurobiology*, 10, 381-391.
- Karunakaran, D., Tzahar, E., Beerli, R. R., Chen, X., Graus-Porta, D., Ratzkin, B. J., Seger, R., Hynes, N. E. y Yarden, Y. (1996) ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer. *EMBO J*, 15, 254-64.
- Katsuno, M., Adachi, H., Waza, M., Banno, H., Suzuki, K., Tanaka, F., Doyu, M. y Sobue, G. (2006) Pathogenesis, animal models and therapeutics in spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA). *Exp Neurol*, 200, 8-18.
- Kerckhoff, H., Jennekens, F. G., Troost, D. y Veldman, H. (1991) Nerve growth factor receptor immunostaining in the spinal cord and peripheral nerves in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol*, 81, 649-56.
- Khurana, V. G., Feterik, K., Springett, M. J., Eguchi, D., Shah, V. y Katusic, Z. S. (2000) Functional interdependence and colocalization of endothelial nitric oxide synthase and heat shock protein 90 in cerebral arteries. *J Cereb Blood Flow Metab*, 20, 1563-70.
- Kim, D., Chi, S., Lee, K. H., Rhee, S., Kwon, Y. K., Chung, C. H., Kwon, H. y Kang, M. S. (1999) Neuregulin stimulates myogenic differentiation in an autocrine manner. *J Biol Chem*, 274, 15395-400.
- King, C. R., Kraus, M. H. y Aaronson, S. A. (1985) Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science*, 229, 974-6.
- Kinugasa, Y., Ishiguro, H., Tokita, Y., Oohira, A., Ohmoto, H. y Higashiyama, S. (2004) Neuroglycan C, a novel member of the neuregulin family. *Biochem Biophys Res Commun*, 321, 1045-9.
- Knowles, R. G. (1996) Nitric oxide synthases. *Biochem Soc Trans*, 24, 875-8.
- Knowles, R. G. y Moncada, S. (1994) Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J*, 298 (Pt 2), 249-58.
- Kodaki, T., Woscholski, R., Hallberg, B., Rodriguez-Viciana, P., Downward, J. y Parker, P. J. (1994) The activation of phosphatidylinositol 3-kinase by Ras. *Curr Biol*, 4, 798-806.
- Koliatsos, V. E., Crawford, T. O. y Price, D. L. (1991) Axotomy induces nerve growth factor receptor immunoreactivity in spinal motor neurons. *Brain Res*, 549, 297-304.
- Kong, H., Kim, A. H., Orlinick, J. R. y Chao, M. V. (1999) A comparison of the cytoplasmic domains of the Fas receptor and the p75 neurotrophin receptor. *Cell Death Differ*, 6, 1133-42.
- Kops, G. J. y Burgering, B. M. (1999) Forkhead transcription factors: new insights into protein kinase B (c-akt) signaling. *J Mol Med*, 77, 656-65.
- Kraus, M. H., Issing, W., Miki, T., Popescu, N. C. y Aaronson, S. A. (1989) Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 9193-7.
- Kregel, K. C. (2002) Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol*, 92, 2177-86.

- Kust, B. M., Copray, J. C. V. M., Brouwer, N., Troost, D. y Boddeker, H. W. G. M. (2002) Elevated levels of Neurotrophins in Human biceps brachii tissue of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Experimental Neurology*, 177, 419-427.
- Kyriakis, J. M. y Avruch, J. (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev*, 81, 807-69.
- Lanneau, D., de Thonel, A., Maurel, S., Didelot, C. y Garrido, C. (2007) Apoptosis versus cell differentiation: role of heat shock proteins HSP90, HSP70 and HSP27. *Prion*, 1, 53-60.
- Le-Niculescu, H., Bonfoco, E., Kasuya, Y., Claret, F. X., Green, D. R. y Karin, M. (1999) Withdrawal of survival factors results in activation of the JNK pathway in neuronal cells leading to Fas ligand induction and cell death. *Mol Cell Biol*, 19, 751-63.
- Lee, K. F., Simon, H., Chen, H., Bates, B., Hung, M. C. y Hauser, C. (1995) Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development. *Nature*, 378, 394-8.
- Lee, R., Kermani, P., Teng, K. K. y Hempstead, B. L. (2001) Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science*, 294, 1945-8.
- Levi-Montalcini, R. (1951) Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *J. Exp. Zool.*, 116, 321-61.
- Levi-Montalcini, R. (1953) A diffusible agent of mouse sarcoma producing hyperplasia of sympathetic ganglia and hyperneurotization of viscera in the chick embryo. *J. Exp. Zool.*, 123, 233-87.
- Li, L., Pevette, D., Oppenheim, R. W. y Milligan, C. E. (1996a) Involvement of specific caspase in motoneuron cell death in vivo and in vitro following trophic factor deprivation. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 12, 157-167.
- Li, Z., Jiang, Y., Ulevitch, R. J. y Han, J. (1996b) The primary structure of p38 gamma: a new member of p38 group of MAP kinases. *Biochem Biophys Res Commun*, 228, 334-40.
- Liepinsh, E., Ilag, L. L., Otting, G. y Ibanez, C. F. (1997) NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor. *EMBO J*, 16, 4999-5005.
- Lin, W., Sanchez, H. B., Deerinck, T., Morris, J. K., Ellisman, M. y Lee, K. F. (2000) Aberrant development of motor axons and neuromuscular synapses in erbB2-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 1299-304.
- Lindholm, T., Cullheim, S., Deckner, M., Carlstedt, T. y Risling, M. (2002) Expression of neuregulin and ErbB3 and ErbB4 after a traumatic lesion in the ventral funiculus of the spinal cord and in the intact primary olfactory system. *Exp Brain Res*, 142, 81-90.
- Liu, L., Cavanaugh, J. E., Wang, Y., Sakagami, H., Mao, Z. y Xia, Z. (2003) ERK5 activation of MEF2-mediated gene expression plays a critical role in BDNF-promoted survival of developing but not mature cortical neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 8532-7.
- Liu, Y., Ford, B., Mann, M. A. y Fischbach, G. D. (2001) Neuregulins increase alpha7 nicotinic acetylcholine receptors and enhance excitatory synaptic transmission in GABAergic interneurons of the hippocampus. *J Neurosci*, 21, 5660-9.

- Llinás, R. R. (2002) *I of the vortex: From Neurons to Self*, New York, The MIT Press.
- Locatelli, F., Corti, S., Papadimitriou, D., Fortunato, F., Del Bo, R., Donadoni, C., Nizzardo, M., Nardini, M., Salani, S., Ghezzi, S., Strazzer, S., Bresolin, N. y Comi, G. P. (2007) Fas small interfering RNA reduces motoneuron death in amyotrophic lateral sclerosis mice. *Ann Neurol*, 62, 81-92.
- Loeb, J. A. y Fischbach, G. D. (1997) Neurotrophic Factor increase neuregulin expression in embryonic ventral spinal cord neurons. *J Neurosci*, 17, 1416-1424.
- Mamidipudi, V. y Wooten, M. W. (2002) Dual Role for p75^{NTR} signaling in survival and cell death: Can Intracellular mediators provide an explanation? *Journal of Neuroscience Research*, 68, 373-384.
- Marchionni, M. A., Goodearl, A. D., Chen, M. S., Bermingham-McDonogh, O., Kirk, C., Hendricks, M., Danehy, F., Misumi, D., Sudhalter, J., Kobayashi, K. y et al. (1993) Glial growth factors are alternatively spliced erbB2 ligands expressed in the nervous system. *Nature*, 362, 312-8.
- Maroney, A. C., Finn, J. P., Bozyczko-Coyne, D., O'Kane, T. M., Neff, N. T., Tolkovsky, A. M., Park, D. S., Yan, C. Y., Troy, C. M. y Greene, L. A. (1999) CEP-1347 (KT7515), an inhibitor of JNK activation, rescues sympathetic neurons and neuronally differentiated PC12 cells from death evoked by three distinct insults. *J Neurochem*, 73, 1901-12.
- Maroney, A. C., Glicksman, M. A., Basma, A. N., Walton, K. M., Knight, E. J., Murphy, C. A., Bartlett, B. A., Finn, J. P., Angeles, T., Matsuda, Y., Neff, N. T. y Dionne, C. A. (1998) Motoneuron Apoptosis is Blocked by CEP-1347 (KT 7515), a Novel inhibitor of the JNK signaling pathway. *The Journal of Neuroscience*, 18, 104-111.
- Marquardt, H., Hunkapiller, M. W., Hood, L. E. y Todaro, G. J. (1984) Rat transforming growth factor type 1: structure and relation to epidermal growth factor. *Science*, 223, 1079-82.
- Marsh, H. N. y Palfrey, H. C. (1996) Neurotrophin-3 and brain-derived neurotrophic factor activate multiple signal transduction events but are not survival factors for hippocampal pyramidal neurons. *J Neurochem*, 67, 952-63.
- Marshall, C. J. (1995) Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*, 80, 179-85.
- Maurel, P. y Salzer, J. L. (2000) Axonal regulation of Schwann cell proliferation and survival and the initial events of myelination requires PI 3-kinase activity. *J Neurosci*, 20, 4635-45.
- McAllister, A. K., Katz, L. C. y Lo, D. C. (1999) Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci*, 22, 295-318.
- McManaman, J. L., Oppenheim, R. W., Prevet, D. y Marchetti, D. (1990) Rescue of motoneurons from cell death by a purified skeletal muscle polypeptide: effects of the ChAT development factor, CDF. *Neuron*, 4, 891-8.
- Meier, T., Masciulli, F., Moore, C., Schoumacher, F., Eppenberger, U., Denzer, A. J., Jone, G. y Brenner, H. R. (1998) Agrin can mediate acetylcholine receptor gene expression in muscle by aggregation of muscle-derived neuregulins. *The journal of Cell Biology*, 141, 715-726.

- Mesner, P. W., Winters, T. R. y Green, S. H. (1992) Nerve growth factor withdrawal-induced cell death in neuronal PC12 cells resembles that in sympathetic neurons. *J Cell Biol*, 119, 1669-80.
- Meyer, D. y Birchmeier, C. (1994) Distinct isoforms of neuregulin are expressed in mesenchymal and neuronal cells during mouse development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 1064-8.
- Meyer, D. y Birchmeier, C. (1995) Multiple essential functions of neuregulin in development. *Nature*, 378, 386-90.
- Meyer, D., Yamaai, T., Garrat, A., Reithmacher-Sonnenberg, E., Kane, D., Theill, L. E. y Birchmeier, C. (1997) Isoform-specific expression and function of neuregulin. *Development*, 124, 3575-3586.
- Milligan, C. E., Oppenheim, R. W. y Schwartz, L. M. (1994) Motoneurons deprived of trophic support in vitro require new gene expression to undergo programmed cell death. *Journal of Neurobiology*, 25, 1005-1012.
- Milligan, C. E., Prevette, D., Yaginuma, H., Homma, S., Cardwell, C., Fritz, L. C., Tomaselli, K. J., Oppenheim, R. W. y Schwartz, L. M. (1995) Peptide inhibitors of the ICE protease family arrest programmed cell death of motoneurons in vivo and in vitro. *Neuron*, 15, 385-393.
- Mimnaugh, E. G., Chavany, C. y Neckers, L. (1996) Polyubiquitination and proteasomal degradation of the p185c-erbB-2 receptor protein-tyrosine kinase induced by geldanamycin. *J Biol Chem*, 271, 22796-801.
- Minghetti, L., Goodearl, A. D., Mistry, K. y Stroobant, P. (1996) Glial growth factors I-III are specific mitogens for glial cells. *J Neurosci Res*, 43, 684-93.
- Miyasaka, T., Chao, M. V., Sherline, P. y Saltiel, A. R. (1990) Nerve growth factor stimulates a protein kinase in PC-12 cells that phosphorylates microtubule-associated protein-2. *J Biol Chem*, 265, 4730-5.
- Mohammadi, M., Honegger, A., Sorokin, A., Ullrich, A., Schlessinger, J. y Hurwitz, D. R. (1993) Aggregation-induced activation of the epidermal growth factor receptor protein tyrosine kinase. *Biochemistry*, 32, 8742-8.
- Monje, P. V., Bartlett Bunge, M. y Wood, P. M. (2006) Cyclic AMP synergistically enhances neuregulin-dependent ERK and Akt activation and cell cycle progression in Schwann cells. *Glia*, 53, 649-59.
- Montero, J. C., Rodriguez-Barrueco, R., Ocana, A., Diaz-Rodriguez, E., Esparis-Ogando, A. y Pandiella, A. (2008) Neuregulins and cancer. *Clin Cancer Res*, 14, 3237-41.
- Moreno, J. J. y Pryor, W. A. (1992) Inactivation of alpha 1-proteinase inhibitor by peroxy nitrite. *Chem Res Toxicol*, 5, 425-31.
- Morris, J. K., Lin, W., Hauser, C., Marchuk, Y., Getman, D. y Lee, K. F. (1999) Rescue of the Cardiac Defect in ErbB2 mutant mice reveals essential roles of ErbB2 in peripheral nervous system development. *Neuron*, 23, 273-283.
- Munoz, D. G., Greene, C., Perl, D. P. y Selkoe, D. J. (1988) Accumulation of phosphorylated neurofilaments in anterior horn motoneurons of amyotrophic lateral sclerosis patients. *J Neuropathol Exp Neurol*, 47, 9-18.
- Mutoh, T., Sobue, G., Hamano, T., Kuriyama, M., Hirayama, M., Yamamoto, M. y Mitsuma, T. (2000) Decreased phosphorylation levels of TrkB neurotrophin receptor in the spinal cords from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurochem Res*, 25, 239-45.

- Namikawa, K., Honma, M., Abe, K., Takeda, M., Mansur, K., Obata, T., Miwa, A., Okado, H. y Kiyama, H. (2000) Akt/protein kinase B prevents injury-induced motoneuron death and accelerates axonal regeneration. *J Neurosci*, 20, 2875-86.
- Newbern, J., Taylor, A., Robinson, M., Li, L. y Milligan, C. E. (2005) Decreases in phosphoinositide-3-kinase/Akt and extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling activate components of spinal motoneuron death. *J Neurochem*, 94, 1652-65.
- Newbern, J., Taylor, A., Robinson, M., Lively, M. O. y Milligan, C. E. (2007) c-Jun N-terminal kinase signaling regulates events associated with both health and degeneration in motoneurons. *Neuroscience*, 147, 680-92.
- Ochel, H. J., Eichhorn, K. y Gademann, G. (2001) Geldanamycin: the prototype of a class of antitumor drugs targeting the heat shock protein 90 family of molecular chaperones. *Cell Stress & Chaperones.*, 6, 105-112.
- Ochs, G., Penn, R. D., York, M., Giess, R., Beck, M., Tonn, J., Haigh, J., Malta, E., Traub, M., Sendtner, M. y Toyka, K. V. (2000) A phase I/II trial of recombinant methionyl human brain derived neurotrophic factor administered by intrathecal infusion to patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*, 1, 201-6.
- Okado-Matsumoto, A. y I., F. (2002) Amyotrophic lateral sclerosis: a proposed mechanism. *PNAS*, 99, 9010-9014.
- Olayioye, M. A., Graus-Porta, D., Beerli, R. R., Rohrer, J., Gay, B. y Hynes, N. E. (1998) ErbB-1 and ErbB-2 acquire distinct signaling properties dependent upon their dimerization partner. *Mol Cell Biol*, 18, 5042-51.
- Olayioye, M. A., Neve, R. M., Lane, H. A. y Hynes, N. E. (2000) The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *The EMBO Journal*, 19, 3159-3167.
- Oppenheim, R. W. (1991) Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci*, 14, 453-501.
- Oppenheim, R. W. (1996) Neurotrophic survival molecules for motoneurons: an embarrassment of riches. *Neuron*, 17, 195-197.
- Owada, K., Sanjo, N., Kobayashi, T., Mizusawa, H., Muramatsu, H., Muramatsu, T. y Michikawa, M. (1999) Midkine inhibits caspase-dependent apoptosis via the activation of mitogen-activation protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase in cultured neurons. *Journal of Neurochemistry*, 73, 2084-2092.
- Pacher, P., Beckman, J. S. y Liaudet, L. (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*, 87, 315-424.
- Panner, A., Murray, J. C., Berger, M. S. y Pieper, R. O. (2007) Heat shock protein 90alpha recruits FLIPS to the death-inducing signaling complex and contributes to TRAIL resistance in human glioma. *Cancer Res*, 67, 9482-9.
- Pardo, C. A., Xu, Z., Borchelt, D. R., Price, D. L., Sisodia, S. S. y Cleveland, D. W. (1995) Superoxide dismutase is an abundant component in cell bodies, dendrites, and axons of motor neurons and in a subset of other neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 954-8.
- Pearl, L. H. y Prodromou, C. (2000) Structure and in vivo function of Hsp90. *Curr Opin Struct Biol*, 10, 46-51.

- Pearl, L. H. y Prodromou, C. (2001) Structure, function, and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone. *Adv Protein Chem*, 59, 157-86.
- Pearl, L. H. y Prodromou, C. (2006) Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. *Annu Rev Biochem*, 75, 271-94.
- Pearl, L. H., Prodromou, C. y Workman, P. (2008) The Hsp90 molecular chaperone: an open and shut case for treatment. *Biochem J*, 410, 439-53.
- Pearson, R. J., Jr. y Carroll, S. L. (2004) ErbB transmembrane tyrosine kinase receptors are expressed by sensory and motor neurons projecting into sciatic nerve. *J Histochem Cytochem*, 52, 1299-311.
- Pehar, M., Cassina, P., Vargas, M. R., Castellanos, R., Viera, L., Beckman, J. S., Estevez, A. G. y Barbeito, L. (2004a) Astrocytic production of nerve growth factor in motor neuron apoptosis: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*, 89, 464-73.
- Pehar, M., Cassina, P., Viera, L., Vargas, M. R., Beckman, J. S., Estevez, A. G. y Barbeito, L. (2004b) Motor Neuron Apoptosis induced by astrocytic production of nerve growth factor and nitric oxide. *J Neurochem*.
- Pehar, M., Vargas, M. R., Robinson, K. M., Cassina, P., Diaz-Amarilla, P. J., Hagen, T. M., Radi, R., Barbeito, L. y Beckman, J. S. (2007) Mitochondrial superoxide production and nuclear factor erythroid 2-related factor 2 activation in p75 neurotrophin receptor-induced motor neuron apoptosis. *J Neurosci*, 27, 7777-85.
- Pehar, M., Vargas, M. R., Robinson, K. M., Cassina, P., England, P., Beckman, J. S., Alzari, P. M. y Barbeito, L. (2006) Peroxynitrite transforms nerve growth factor into an apoptotic factor for motor neurons. *Free Radic Biol Med*, 41, 1632-44.
- Peles, E., Bacus, S. S., Koski, R. A., Lu, H. S., Wen, D., Ogden, S. G., Levy, R. B. y Yarden, Y. (1992) Isolation of the neu/HER-2 stimulatory ligand: a 44 kd glycoprotein that induces differentiation of mammary tumor cells. *Cell*, 69, 205-16.
- Peles, E., Ben-Levy, R., Tzahar, E., Liu, N., Wen, D. y Yarden, Y. (1993) Cell-type specific interaction of Neu differentiation factor (NDF/heregulin) with Neu/HER-2 suggests complex ligand-receptor relationships. *Embo J*, 12, 961-71.
- Peluffo, H., Shacka, J. J., Ricart, K., Bisig, C. G., Martinez-Palma, L., Pritsch, O., Kamaid, A., Eiserich, J. P., Crow, J. P., Barbeito, L. y Estevez, A. G. (2004) Induction of motor neuron apoptosis by free 3-nitro-L-tyrosine. *J Neurochem*, 89, 602-12.
- Pennica, D., Arce, V., Swanson, T. A., Vejsada, R., Pollock, R. A., Armanini, M., Dudley, K., Phillips, H. S., Rosenthal, A., Kato, A. C. y Henderson, C. E. (1996) Cardiotrophin-1, a cytokine present in embryonic muscle, supports long-term survival of spinal motoneurons. *Neuron*, 17, 63-74.
- Picard, D. (2002) Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. *Cell Mol Life Sci*, 59, 1640-8.
- Plowman, G. D., Culouscou, J. M., Whitney, G. S., Green, J. M., Carlton, G. W., Foy, L., Neubauer, M. G. y Shoyab, M. (1993) Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *PNAS*, 90, 1746-1750.

- Posner, I., Engel, M. y Levitzki, A. (1992) Kinetic model of the epidermal growth factor (EGF) receptor tyrosine kinase and a possible mechanism of its activation by EGF. *J Biol Chem*, 267, 20638-47.
- Powers, M. V., Clarke, P. A. y Workman, P. (2008) Dual targeting of HSC70 and HSP72 inhibits HSP90 function and induces tumor-specific apoptosis. *Cancer Cell*, 14, 250-62.
- Powers, M. V., Clarke, P. A. y Workman, P. (2009) Death by chaperone: HSP90, HSP70 or both? *Cell Cycle*, 8, 518-26.
- Pratt, W. B., Morishima, Y. y Osawa, Y. (2008) The Hsp90 chaperone machinery regulates signaling by modulating ligand binding clefts. *J Biol Chem*, 283, 22885-9.
- Purves (1988) *Body and Brain, A Trophic Theory of neuronal connections*, Cambridge, MA.
- Raabe, T. D., Clive, D. R., Neuberger, T. J., Wen, D. y DeVries, G. H. (1996) Cultured neonatal Schwann cells contain and secrete neuregulins. *J Neurosci Res*, 46, 263-270.
- Radi, R. (1996a) Kinetic analysis of reactivity of peroxynitrite with biomolecules. *Methods Enzymol*, 269, 354-66.
- Radi, R. (1996b) Reactions of nitric oxide with metalloproteins. *Chem Res Toxicol*, 9, 828-35.
- Radi, R., Beckman, J. S., Bush, K. M. y Freeman, B. A. (1991) Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys*, 288, 481-7.
- Radi, R., Peluffo, G., Alvarez, M. N., Naviliat, M. y Cayota, A. (2001) Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Radic Biol Med*, 30, 463-88.
- Raoul, C., Buhler, E., Sadeghi, C., Jacquier, A., Aebischer, P., Pettmann, B., Henderson, C. E. y Haase, G. (2006) Chronic activation in presymptomatic amyotrophic lateral sclerosis (ALS) mice of a feedback loop involving Fas, Daxx, and FasL. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 6007-12.
- Raoul, C., Estevez, A. G., Nishimune, H., Cleveland, D. W., deLapeyriere, O., Henderson, C. E., Haase, G. y Pettmann, B. (2002) Motoneuron Death Triggered by a Specific Pathway Downstream of Fas: Potentiation by ALS-Linked SOD1 Mutations. *Neuron*, 35, 1067-1083.
- Raoul, C., Henderson, C. E. y Pettmann, B. (1999) Programmed Cell Death of Embryonic Motoneurons Triggered through the Fas Death Receptor. *The journal of Cell Biology*, 147, 1049-1061.
- Raoul, C., Pettmann, B. y Henderson, C. E. (2000) Active killing of neurons during development and following stress: a role for p75(NTR) and Fas? *Curr Opin Neurobiol*, 10, 111-7.
- Reaume, A. G., Elliott, J. L., Hoffman, E. K., Kowall, N. W., Ferrante, R. J., Siwek, D. F., Wilcox, H. M., Flood, D. G., Beal, M. F., Brown, R. H., Jr., Scott, R. W. y Snider, W. D. (1996) Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat Genet*, 13, 43-7.
- Rende, M., Giambanco, I., Buratta, M. y Tonali, P. (1995) Axotomy induces a different modulation of both low-affinity nerve growth factor receptor and choline

- acetyltransferase between adult rat spinal and brainstem motoneurons. *J Comp Neurol*, 363, 249-63.
- Ricart, K., J. Pearson R, J., Viera, L., Cassina, P., Kamaid, A., Carroll, S. L. y Estevez, A. G. (2006) Interactions between beta-neuregulin and neurotrophins in motor neuron apoptosis. *J Neurochem*, 97, 222-33.
- Ricart, K. C. y Fisman, M. L. (2001) Hydrogen peroxide-induced neurotoxicity in cultured cortical cells grown in serum-free and serum-containing media. *Neurochem Res*, 26, 801-8.
- Richter, K. y Buchner, J. (2001) Hsp90: chaperoning Signal Transduction. *Journal of Cellular Physiology*, 188, 281-290.
- Richter-Landsberg, C. y Goldbaum, O. (2003) Stress proteins in neural cells: functional roles in health and disease. *Cell Mol Life Sci*, 60, 337-49.
- Riethmacher, D., Sonnenberg-Riethmacher, E., Brinkmann, V., Yamaai, T., Lewin, G. R. y Birchmeier, C. (1997) Severe neuropathies in mice with targeted mutations in the ErbB3 receptor. *Nature*, 389, 725-30.
- Ritch, P. S., Carroll, S. L. y Sontheimer, H. (2005) Neuregulin-1 enhances survival of human astrocytic glioma cells. *Glia*, 51, 217-28.
- Robberecht, W., Sapp, P., Viaene, M. K., Rosen, D., McKenna-Yasek, D., Haines, J., Horvitz, R., Theys, P. y Brown, R., Jr. (1994) Cu/Zn superoxide dismutase activity in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*, 62, 384-7.
- Robinson, M. B., Tidwell, J. L., Gould, T., Taylor, A. R., Newbern, J. M., Graves, J., Tytell, M. y Milligan, C. E. (2005) Extracellular heat shock protein 70: a critical component for motoneuron survival. *J Neurosci*, 25, 9735-45.
- Rodriguez-Viciano, P., Warne, P. H., Dhand, R., Vanhaesebroeck, B., Gout, I., Fry, M. J., Waterfield, M. D. y Downward, J. (1994) Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature*, 370, 527-32.
- Roe, S. M., Prodromou, C., O'Brien, R., Ladbury, J. E., Piper, P. W. y Pearl, L. H. (1999) Structural basis for inhibition of the Hsp90 molecular chaperone by the antitumor antibiotics radicicol and geldanamycin. *J Med Chem*, 42, 260-6.
- Rosen, D. R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D. A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J. P., Deng, H. X. y et al. (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 362, 59-62.
- Rosenbaum, C., Karyala, S., Marchionni, M. A., Kim, H. A., Krasnoselsky, A. L., Happel, B., Isaacs, I., Brackenbury, R. y Ratner, N. (1997) Schwann cells express NDF and SMDF/n-ARIA mRNAs, secrete neuregulin and show constitutive activation of erbB3 receptors: evidence for a neuregulin autocrine loop. *Exp Neurol*, 148, 604-615.
- Ryden, M. y Ibanez, C. F. (1996) Binding of neurotrophin-3 to p75LNGFR, TrkA, and TrkB mediated by a single functional epitope distinct from that recognized by trkC. *J Biol Chem*, 271, 5623-7.
- Ryden, M., Murray-Rust, J., Glass, D., Ilag, L. L., Trupp, M., Yancopoulos, G. D., McDonald, N. Q. y Ibanez, C. F. (1995) Functional analysis of mutant neurotrophins deficient in low-affinity binding reveals a role for p75LNGFR in NT-4 signalling. *EMBO J*, 14, 1979-90.

- Sacksteder, C. A., Qian, W. J., Knyushko, T. V., Wang, H., Chin, M. H., Lacan, G., Melega, W. P., Camp, D. G., 2nd, Smith, R. D., Smith, D. J., Squier, T. C. y Bigelow, D. J. (2006) Endogenously nitrated proteins in mouse brain: links to neurodegenerative disease. *Biochemistry*, 45, 8009-22.
- Sanchez-Carbente, M. R., Castro-Obregon, S., Covarrubias, L. y Narvaez, V. (2005) Motoneuronal death during spinal cord development is mediated by oxidative stress. *Cell Death Differ*, 12, 279-91.
- Sato, S., Fujita, N. y Tsuruo, T. (2000) Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 10832-7.
- Scaltriti, M. y Baselga, J. (2006) The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. *Clin Cancer Res*, 12, 5268-72.
- Schlesinger, M. J. (1990) Heat shock proteins. *J Biol Chem*, 265, 12111-4.
- Schlesinger, M. J. (1996) Heat shock in vertebrate cells. *Cell Stress Chaperones*, 1, 213-4.
- Schlessinger, J. (2000) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 103, 211-25.
- Schopfer, F., Baker, P. R. S. y Freeman, B. A. (2003) NO-dependent protein nitration: a cell signaling event or an oxidative inflammatory response? *TRENDS in Biochemical Sciences*, 28, 646-654.
- Sedel, F., Bechade, C. y Triller, A. (1999) Nerve growth factor (NGF) induces motoneuron apoptosis in rat embryonic spinal cord in vitro. *Eur J Neurosci*, 11, 3904-12.
- Seeburger, J. L., Tarras, S., Natter, H. y Springer, J. E. (1993) Spinal cord motoneurons express p75NGFR and p145trkB mRNA in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res*, 621, 111-5.
- Shah, N. M., Marchionni, M. A., Isaacs, I., Stroobant, P. y Anderson, D. J. (1994) Glial growth factor restricts mammalian neural crest stem cells to a glial fate. *Cell*, 77, 349-60.
- Shamovsky, I. L., Ross, G. M., Riopelle, R. J. y Weaver, D. F. (1999) The interaction of neurotrophins with the p75NTR common neurotrophin receptor: a comprehensive molecular modeling study. *Protein Sci*, 8, 2223-33.
- Shaul, P. W., North, A. J., Brannon, T. S., Ujjiie, K., Wells, L. B., Nisen, P. A., Lowenstein, C. J., Snyder, S. H. y Star, R. A. (1995) Prolonged in vivo hypoxia enhances nitric oxide synthase type I and type III gene expression in adult rat lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 13, 167-74.
- Shin, J. H., Cho, S. I., Lim, H. R., Lee, J. K., Lee, Y. A., Noh, J. S., Joo, I. S., Kim, K. W. y Gwag, B. J. (2007) Concurrent administration of Neu2000 and lithium produces marked improvement of motor neuron survival, motor function, and mortality in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Pharmacol*, 71, 965-75.
- Shiva, S., Huang, Z., Grubina, R., Sun, J., Ringwood, L. A., MacArthur, P. H., Xu, X., Murphy, E., Darley-Usmar, V. M. y Gladwin, M. T. (2007) Deoxymyoglobin is a nitrite reductase that generates nitric oxide and regulates mitochondrial respiration. *Circ Res*, 100, 654-61.
- Sidera, K., Gaitanou, M., Stellas, D., Matsas, R. y Patsavoudi, E. (2008) A critical role for HSP90 in cancer cell invasion involves interaction with the extracellular domain of HER-2. *J Biol Chem*, 283, 2031-41.

- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. y Klenk, D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 150, 76-85.
- Soler, R. M., Dolcet, X., Encinas, M., Egea, J., Bayascas, J. R. y Comella, J. X. (1999a) Receptors of the glial cell line-derived neurotrophic factor family of neurotrophic factors signal cell survival through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in spinal cord motoneurons. *J Neurosci*, 19, 9160-9.
- Soler, R. M., Dolcet, X., Encinas, M., Egea, J., Bayascas, J. R. y Comella, J. X. (1999b) Receptors of the glial cell line-derived neurotrophic factor family of neurotrophic factors signal cell survival through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in spinal cord motoneurons. *Journal of Neuroscience*, 19, 9160-9169.
- Solit, D. B., Basso, A. D., Olshen, A. B., Scher, H. I. y Rosen, N. (2003) Inhibition of heat shock protein 90 function down-regulates Akt kinase and sensitizes tumors to Taxol. *Cancer Res*, 63, 2139-44.
- Sotthibundhu, A., Sykes, A. M., Fox, B., Underwood, C. K., Thangnipon, W. y Coulson, E. J. (2008) Beta-amyloid(1-42) induces neuronal death through the p75 neurotrophin receptor. *J Neurosci*, 28, 3941-6.
- Souza, J. M., Daikhin, E., Yudkoff, M., Raman, C. S. y Ischiropoulos, H. (1999) Factors determining the selectivity of protein tyrosine nitration. *Arch Biochem Biophys*, 371, 169-78.
- Stove, C. y Bracke, M. (2004) Roles for neuregulins in human cancer. *Clin Exp Metastasis*, 21, 665-84.
- Strachan, L., Murison, J. G., Prestidge, R. L., Sleeman, M. A., Watson, J. D. y Kumble, K. D. (2001) Cloning and biological activity of epigen, a novel member of the epidermal growth factor superfamily. *J Biol Chem*, 276, 18265-71.
- Suhara, T., Kim, H. S., Kirshenbaum, L. A. y Walsh, K. (2002) Suppression of Akt signaling induces Fas ligand expression: involvement of caspase and Jun kinase activation in Akt-mediated Fas ligand regulation. *Mol Cell Biol*, 22, 680-91.
- Sweatt, J. D. (2001) The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *J Neurochem*, 76, 1-10.
- Syroid, D. E., Maycox, P. R., Burrola, P. G., Liu, N., Wen, D., Lee, K. F., Lemke, G. y Kilpatrick, T. J. (1996) Cell death in the Schwann cell lineage and its regulation by neuregulin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 9229-34.
- Tansey, M. G., Chu, G. C. y Merlie, J. P. (1996) ARIA/HRG regulates AChR epsilon subunit gene expression at the neuromuscular synapse via activation of phosphatidylinositol 3-kinase and Ras/MAPK pathway. *J Cell Biol*, 134, 465-76.
- Taylor, A. R., Gifondorwa, D. J., Newbern, J. M., Robinson, M. B., Strupe, J. L., Prevette, D., Oppenheim, R. W. y Milligan, C. E. (2007a) Astrocyte and muscle-derived secreted factors differentially regulate motoneuron survival. *J Neurosci*, 27, 634-44.
- Taylor, A. R., Robinson, M. B., Gifondorwa, D. J., Tytell, M. y Milligan, C. E. (2007b) Regulation of heat shock protein 70 release in astrocytes: role of signaling kinases. *Dev Neurobiol*, 67, 1815-29.
- Tohgi, H., Abe, T., Yamazaki, K., Murata, T., Ishizaki, E. y Isobe, C. (1999) Remarkable increase in cerebrospinal fluid 3-nitrotyrosine in patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*, 46, 129-131.

- Tokita, Y., Keino, H., Matsui, F., Aono, S., Ishiguro, H., Higashiyama, S. y Oohira, A. (2001) Regulation of neuregulin expression in the injured rat brain and cultured astrocytes. *J Neurosci*, 21, 1257-64.
- Tortora, V., Quijano, C., Freeman, B., Radi, R. y Castro, L. (2007) Mitochondrial aconitase reaction with nitric oxide, S-nitrosoglutathione, and peroxynitrite: mechanisms and relative contributions to aconitase inactivation. *Free Radic Biol Med*, 42, 1075-88.
- Tournier, C., Dong, C., Turner, T. K., Jones, S. N., Flavell, R. A. y Davis, R. J. (2001) MKK7 is an essential component of the JNK signal transduction pathway activated by proinflammatory cytokines. *Genes Dev*, 15, 1419-26.
- Trachtenberg, J. T. y Thompson, W. J. (1996) Schwann cell apoptosis at developing neuromuscular junctions is regulated by glial growth factor. *Nature*, 379, 174-7.
- Tzahar, E., Levkowitz, G., Karunagaran, D., Yi, L., Peles, E., Lavi, S., Chang, D., Liu, N., Yayon, A., Wen, D. y et al. (1994) ErbB-3 and ErbB-4 function as the respective low and high affinity receptors of all Neu differentiation factor/herectin isoforms. *J Biol Chem*, 269, 25226-33.
- Ugolini, G., Raoul, C., Ferri, A., Haenggeli, C., Yamamoto, Y., Salaun, D., Henderson, C. E., Kato, A. C., Pettmann, B. y Hueber, A. O. (2003) Fas/Tumor necrosis factor receptor death signaling is required for axotomy-induced death of motoneurons in vitro. *Journal of Neuroscience*, 23, 8526-8531.
- Urschel, B. A. y Hulsebosch, C. E. (1992) Distribution and relative density of p75 nerve growth factor receptors in the rat brain as a function of age and treatment with antibodies to nerve growth factor. *Brain Res*, 591, 223-38.
- Van Damme, P., Van Den Bosch, L., Van Houtte, E., Callewaert, G. y Robberecht, W. (2002) GluR2-dependent properties of AMPA receptors determine the selective vulnerability of motor neurons to excitotoxicity. *J Neurophysiol*, 88, 1279-87.
- Van der Zee, C. E., Ross, G. M., Riopelle, R. J. y Hagg, T. (1996) Survival of cholinergic forebrain neurons in developing p75NGFR-deficient mice. *Science*, 274, 1729-32.
- Vaskovsky, A., Lupowitz, Z., Erlich, S. y Pinkas-Kramarski, R. (2000) ErbB-4 activation promotes neurite outgrowth in PC12 cells. *J Neurochem*, 74, 979-87.
- Veglianese, P., Lo Coco, D., Bao Cutrona, M., Magnoni, R., Pennacchini, D., Pozzi, B., Gowing, G., Julien, J. P., Tortarolo, M. y Bendotti, C. (2006) Activation of the p38MAPK cascade is associated with upregulation of TNF alpha receptors in the spinal motor neurons of mouse models of familial ALS. *Mol Cell Neurosci*, 31, 218-31.
- Verdi, J. M., Groves, A. K., Farinas, I., Jones, K., Marchionni, M. A., Reichardt, L. F. y Anderson, D. J. (1996) A reciprocal cell-cell interaction mediated by NT-3 and neuregulins controls the early survival and development of sympathetic neuroblasts. *Neuron*, 16, 515-27.
- Viera, L., Ye, Y. Z., Estevez, A. G. y Beckman, J. S. (1999) Immunohistochemical methods to detect nitrotyrosine. *Methods Enzymol*, 301, 373-81.
- Wandinger, S. K., Richter, K. y Buchner, J. (2008) The Hsp90 chaperone machinery. *J Biol Chem*, 283, 18473-7.
- Wang, X. (2001) The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*, 15, 2922-33.

- Waterman, H., Alroy, I., Strano, S., Seger, R. y Yarden, Y. (1999) The C-terminus of the kinase-defective neuregulin receptor ErbB-3 confers mitogenic superiority and dictates endocytic routing. *EMBO J*, 18, 3348-58.
- Watson, A., Eilers, A., Lallemand, D., Kyriakis, J., Rubin, L. L. y Ham, J. (1998) Phosphorylation of c-Jun is necessary for apoptosis induced by survival signal withdrawal in cerebellar granule neurons. *J Neurosci*, 18, 751-62.
- Waza, M., Adachi, H., Katsuno, M., Minamiyama, M., Sang, C., Tanaka, F., Inukai, A., Doyu, M. y Sobue, G. (2005) 17-AAG, an Hsp90 inhibitor, ameliorates polyglutamine-mediated motor neuron degeneration. *Nat Med*, 11, 1088-95.
- Waza, M., Adachi, H., Katsuno, M., Minamiyama, M., Tanaka, F., Doyu, M. y Sobue, G. (2006) Modulation of Hsp90 function in neurodegenerative disorders: a molecular-targeted therapy against disease-causing protein. *J Mol Med*, 84, 635-46.
- Wedegaertner, P. B. y Gill, G. N. (1989) Activation of the purified protein tyrosine kinase domain of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem*, 264, 11346-53.
- Weiss, A. y Schlessinger, J. (1998) Switching signals on or off by receptor dimerization. *Cell*, 94, 277-80.
- Welch, W. J. y Feramisco, J. R. (1982) Purification of the major mammalian heat shock proteins. *J Biol Chem*, 257, 14949-59.
- Wetzel, M., Li, L., Harms, K. M., Roitbak, T., Ventura, P. B., Rosenberg, G. A., Khokha, R. y Cunningham, L. A. (2008) Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 facilitates Fas-mediated neuronal cell death following mild ischemia. *Cell Death Differ*, 15, 143-51.
- Whitesell, L. y Lindquist, S. L. (2005) HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat Rev Cancer*, 5, 761-72.
- Wieduwilt, M. J. y Moasser, M. M. (2008) The epidermal growth factor receptor family: biology driving targeted therapeutics. *Cell Mol Life Sci*, 65, 1566-84.
- Wiese, S., Metzger, F., Holtmann, B. y Sendtner, M. (1999) The role of p75^{NTR} in modulating neurotrophin survival effects in developing motoneurons. *Eur J Neurosci*, 11, 1668-76.
- Woldeyesus, M. T., Britsch, S., Riethmacher, D., Xu, L., Sonnenberg-Riethmacher, E., Abou-Rebyeh, F., Harvey, R., Caroni, P. y Birchmeier, C. (1999) Peripheral nervous system defects in erbB2 mutants following genetic rescue of heart development. *Genes & Development*, 13, 2538-2548.
- Wolf, D. E., McKinnon, C. A., Daou, M. C., Stephens, R. M., Kaplan, D. R. y Ross, A. H. (1995) Interaction with TrkA immobilizes gp75 in the high affinity nerve growth factor receptor complex. *J Biol Chem*, 270, 2133-8.
- Workman, P., Burrows, F., Neckers, L. y Rosen, N. (2007) Drugging the cancer chaperone HSP90: combinatorial therapeutic exploitation of oncogene addiction and tumor stress. *Ann N Y Acad Sci*, 1113, 202-16.
- Wu, W. (1996) Potential roles of gene expression change in adult rat spinal motoneurons following axonal injury: a comparison among c-jun, off-affinity nerve growth factor receptor (LNGFR), and nitric oxide synthase (NOS). *Exp Neurol*, 141, 190-200.

- Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R. J. y Greenburg, M. E. (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*, 270, 1326-1331.
- Xu, Z., Maroney, A. C., Dobrzanski, P., Kukekov, N. V. y Greene, L. A. (2001) The MLK family mediates c-Jun N-terminal kinase activation in Neuronal Apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, 21, 4713-4724.
- Yamaguchi, A., Tamatani, M., Matsuzaki, H., Namikawa, K., Kiyama, H., Vitek, M. P., Mitsuda, N. y Tohyama, M. (2001) Akt activation protects hippocampal neurons from apoptosis by inhibiting transcriptional activity of p53. *J Biol Chem*, 276, 5256-64.
- Yan, Q., Elliott, J. L., Matheson, C., Sun, J., Zhang, L., Mu, X., Rex, K. L. y Snider, W. D. (1993) Influences of neurotrophins on mammalian motoneurons in vivo. *J Neurobiol*, 24, 1555-77.
- Yan, Q. y Johnson, E. M., Jr. (1988) An immunohistochemical study of the nerve growth factor receptor in developing rats. *J Neurosci*, 8, 3481-98.
- Yao, R. y Cooper, G. M. (1995) Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science*, 267, 2003-6.
- Yarden, Y. y Schlessinger, J. (1985) The EGF receptor kinase: evidence for allosteric activation and intramolecular self-phosphorylation. *Ciba Found Symp*, 116, 23-45.
- Yarden, Y. y Schlessinger, J. (1987) Epidermal growth factor induces rapid, reversible aggregation of the purified epidermal growth factor receptor. *Biochemistry*, 26, 1443-51.
- Yarden, Y. y Sliwkowski, M. X. (2001) Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2, 127-37.
- Ye, X., Mehlen, P., Rabizadeh, S., VanArsdale, T., Zhang, H., Shin, H., Wang, J. J., Leo, E., Zapata, J., Hauser, C. A., Reed, J. C. y Bredesen, D. E. (1999) TRAF family proteins interact with the common neurotrophin receptor and modulate apoptosis induction. *J Biol Chem*, 274, 30202-8.
- Ye, Y., Quijano, C., Robinson, K. M., Ricart, K. C., Strayer, A. L., Sahawneh, M. A., Shacka, J. J., Kirk, M., Barnes, S., Accavitti-Loper, M. A., Radi, R., Beckman, J. S. y Estevez, A. G. (2007) Prevention of peroxynitrite-induced apoptosis of motor neurons and PC12 cells by tyrosine-containing peptides. *J Biol Chem*, 282, 6324-37.
- Ye, Y. Z., Strong, M., Huang, Z. Q. y Beckman, J. S. (1996) Antibodies that recognize nitrotyrosine. *Methods Enzymol*, 269, 201-9.
- Yeo, T. T., Chua-Couzens, J., Butcher, L. L., Bredesen, D. E., Cooper, J. D., Valletta, J. S., Mobley, W. C. y Longo, F. M. (1997) Absence of p75NTR causes increased basal forebrain cholinergic neuron size, choline acetyltransferase activity, and target innervation. *J Neurosci*, 17, 7594-605.
- Yoon, S. O., Casaccia-Bonnel, P., Carter, B. y Chao, M. V. (1998) Competitive signaling between TrkA and p75 nerve growth factor receptors determines cell survival. *J Neurosci*, 18, 3273-81.
- Zhang, Y. y Rosenberg, P. A. (2004) Caspase-1 and poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors may protect against peroxynitrite-induced neurotoxicity independent of their enzyme inhibitor activity. *Eur J Neurosci*, 20, 1727-36.

Zorzano, A., Kaliman, P., Guma, A. y Palacin, M. (2003) Intracellular signals involved in the effects of insulin-like growth factors and neuregulins on myofibre formation. *Cellular Signalling*, 15, 141-149.

Los resultados presentados en esta tesis han sido incluidos total o parcialmente en los siguientes trabajos publicados, enviados o en preparación:

Publicados.

1. Ricart K, Pearson Jr. RJ, Viera L, Cassina P, Kamaid A, Carroll SL & Estevez AG (2006). Interactions between β -neuregulins and neurotrophins in motor neuron apoptosis. J Neurochem 97(1): 222-233.

2. Ye Y, Quijano C, Robinson KM, **Ricart K**, Strayer AL, Sahawneh MA, Shacka JJ, Kirk M, Barnes S, Accavitti-Loper MA, Radi R, Beckman JS & Estevez AG (2007). Prevention of peroxynitrite-induced apoptosis of motor neurons and PC12 cells by tyrosine-containing peptides. J Biol Chem 282(9): 6324-6337.

3. Pelufo H, Shacka JJ, **Ricart K**, Bisig CG, Martinez-Palma L, Pritsch O, Kamaid A, Eiserich JP, Crow JP, Barbeito L & Estevez AG (2004). Induction of motor neuron apoptosis by free 3-nitro-L-tyrosine. J Neurochem 89 (3): 602-612.

Enviados.

1. Sahawneh M.A.*, **Ricart K***, Roberts B.R., Bomben V, Basso M, Sahawneh J, Ye Y, Beckman J, Estevez A.G. (2009). Cu, Zn SOD increases toxicity of mutant and Zn-deficient SOD by enhancing the enzyme stability and solubility. J Biol Chem, submitted

Manuscrito en preparación

19. Strayer A*, **Ricart K***, Estevez A. HSP90 ATPase activity is necessary to prevent spontaneous Fas-induced motor neuron death. * Los dos autores contribuyeron de igual manera al trabajo.

AGRADECIMIENTOS

En los años transcurridos durante la gestación de esta Tesis, fueron muchas las personas que directamente o indirectamente contribuyeron a su realización, siendo casi imposible recordar todos sus nombres. No obstante, acudiendo a mi buena memoria quiero empezar estos agradecimientos con la persona que estuvo en todo el proceso de esta Tesis, y que pensó que nunca la iba terminar.

A Maria Luisa, por el apoyo incondicional y porque la distancia no hace otra cosa que hacer más indestructible nuestro amor.

A Martina y Santiago, porque la vida sin ellos no tiene sentido, por su amor, por su alegría y su inagotable energía, por hacerme reír cada día.

A Lucas, por el amor de todos estos años, por la comprensión, por nuestros hermosos hijos y por su apoyo. Al profe Hippie (Dr. Pozzo-Miller) por las correcciones, los consejos, las discusiones sobre ciencia y las corridas de último momento.

A Alvaro Estévez, por confiar en mí y abrirme con generosidad y calidez las puertas de su laboratorio. Por la dirección de esta Tesis, por su paciencia en la discusión de los resultados, por no perder la confianza en mí y apoyarme hasta el final.

A todos los miembros del laboratorio de Alvaro: Yaozu por todas las técnicas compartidas, por su paciencia y sus enseñanzas, por sus anticuerpos imprescindibles para esta Tesis. Amy y Mary Anne, por su paciencia con mi inglés y por todos los momentos compartidos. A Liliana, por enseñarme muchas de las técnicas de esta tesis, pero principalmente por abrirme las puertas de su casa y adoptarme como parte de la familia. Por ser una amiga incondicional en todos estos años.

A Osvaldo Uchitel, por ser mi consejero de estudios y brindarme toda la información necesaria para cumplir con los requisitos de la universidad.

A Steven Carroll, por facilitarnos la neuregulina, parte fundamental de esta Tesis.

A Aimee Landar y Victor Darley-USmar, por darme un lugar en su laboratorio, por escuchar mis opiniones y permitirme ser independiente a pesar de no tener el PhD. Por apoyarme y darme el tiempo para terminar mi Tesis a pesar de ser en detrimento de mi proyecto actual. Y a todos los miembros de sus respectivos laboratorios por su apoyo en estos últimos días.

A la UBA, por mi formación y por permitirme realizar el doctorado a distancia. A la UAB, por permitirme realizar mi proyecto de tesis y por su apoyo económico.

A Alejandro, por todos sus asesoramientos médicos en la Tesis y en la vida, por las llamadas de urgencia, por todo. Por ser un gran hermano.

A Cacho, por su apoyo, por su amor a pesar de las diferencias.

A toda la banda de Birmingham: a los que estuvieron, sin los cuales la vida en Birmingham habría sido mucho más difícil en los comienzos. A Ale, Francisco, Mariela, Pablo, Silvia, Rafa, Brenda, Cecilia, Carlos, Patricia y Pancho, por su alegría, su amistad y su apoyo incondicional en los malos momentos. Por todos los tiempo compartidos, por mantener la amistad y por los reencuentros en la playa. A los que están Sole y Gaston, Fred, Bronwyn, Gaby, Lili, Victoria, Jessica, Nadia y Darío, sin los cuales la vida en Birmingham sería mucho más dura. Por su amistad, por su apoyo, por todo lo compartido. Y a todos sus niños que hacen que Martina y Santiago tengan muy buenos amigos.

A todos los que quedaron en Argentina, pero siguen estando ahí para lo que los necesite y se pelean por verme en mis visitas. A Ile, Fede, Karina, Marcelo, Alejandra, Charly, Norma, Edgar. También por pensar que puedo ser buena madrina a pesar de la distancia.

A Joaquín, Juampi y Camila por darme todo su amor aunque sólo nos vemos una vez al año.

A Sole, por toda la ayuda con los chicos siempre, y especialmente en los finales de esta Tesis.

A Mariela, por la ayuda con Martina en los comienzos de la escritura de esta Tesis, bastante tiempo atrás. Por compartir juntas los comienzos de esta experiencia de ser madres.

A Ale y Fran, por sus consejos y apoyo a pesar de la distancia. Por siempre pensar en nosotros, por toda su ayuda, por sus anécdotas y su alegría.

A Ile, por estar ahí SIEMPRE y no dejar pasar una semana sin hablar en estos 9 años de estar lejos.

A Fede por su amistad y por los consejos para los trámites de esta Tesis.

A Fred, porque sin él no podría haber sobrevivido los primeros días en Birmingham, por saber que podemos contar con él.

A Luquitas, por la ayuda con la bibliografía, y por ser un buen hermano mayor con los Pirulos.

Al más chiquito de la familia Esteban, por traer alegría.

A todos los que me ayudaron con el español de la tesis: Vero, Bea, Darío, Lili, Jessica.

A Marcelino y Marta, por todos estos años de ir y venir a Ezeiza, por siempre estar ahí acercando la distancia. Por la paz que me da saber que están cerca.

A los miembros del jurado por aceptar revisar este trabajo de tesis y por las fechas ajustadas.

A Ana Bondia, por todos estos años de trámites a larga distancia

Muchas gracias a todos...



Fontanarrosa