

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II

**Vías de señalización intracelular moduladas por
productos avanzados de glicación y diversos agentes
terapéuticos en diversas líneas celulares.**



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

Nora Montero Martín

Directores

Rafael Salto González y José Dámaso Vílchez Rienda

Facultad de Farmacia

Programa de Doctorado de Farmacia

2024

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Nora Montero Martín
ISBN: 978-84-1195-554-6
URI: <https://hdl.handle.net/10481/97426>

Esta Memoria ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Universidad de Granada. Los gastos experimentales derivados de la misma han sido sufragados por un Proyecto de Investigación de la Fundación Marcelino Botín y por las ayudas a la investigación de la Junta de Andalucía al grupo BIO-212.



PAIDI2020
PLAN ANDALUZ
DE INVESTIGACIÓN,
DESARROLLO E INNOVACIÓN

A mi abuelo

Agradecimientos

Como una semilla, mi abuelo me lanzó a un surco de tierra mientras lo regaba. Yo me revolcaba en el fango, y mi madre preocupada le decía: “¡La niña se va a poner perdida!” Pero él, con una sonrisa serena, le respondía: “¡Déjala, que se haga dura! Es uno de los primeros recuerdos que tengo de él. Siempre fue una persona de coraje, con una fuerza y valentía inquebrantables, que nunca se rendía ante ninguna adversidad. Siempre he admirado esa fortaleza suya, y en los momentos de flaqueza, pienso en él para encontrar la fuerza y seguir adelante. Así que sí, ¡el fango me hizo fuerte!

Durante el largo y desafiante proceso de “hacerme doctora” he pensado mucho en él para atraer esa fuerza. Esta Tesis ha requerido mucho tiempo, esfuerzo, fuerza de voluntad y mucha dedicación. Hubo momentos de agotamiento en los que pensé rendirme, pero ahora al llegar al final de este camino ¡mañana deposito mi Tesis! Estoy orgullosa de haber superado este reto. Luchar por tus sueños siempre trae una satisfacción especial. Gracias abuelo inculcarme tu coraje!

Desde pequeña, siempre mostré un profundo interés por la ciencia; mis juegos favoritos consistían en crear “pócimas mágicas”, y con el tiempo decidí estudiar Farmacia con la firme intención de dedicarme a la investigación. Sin embargo, la vida me llevó por otros caminos, aunque la chispa de la curiosidad científica nunca se apagó. Mientras trabajaba creando “pócimas reales”, mi sed insaciable de conocimiento me impulsó a matricularme en un máster, en un intento de apaciguar esa inquietud intelectual que siempre me acompaña.

Y entonces el destino puso a Rafa en mi camino. Él impartía una asignatura sobre bioquímica y biología molecular a la que no pude asistir, así que para aprobar su asignatura tuve que hacer una exposición sobre “expresión de proteínas recombinantes en bacterias” y creo que le gustó tanto que me dejó hacer el TFM en su laboratorio. El camino hacia mi anhelo investigador por fin se abría ante mí. ¡Qué alegría! Al fin, podría reconectar con la bioquímica, esa pasión que siempre había latido en mí.

Doce años después, la vida ha dado giros inesperados, y esos cambios me han llevado a dedicarme finalmente a lo que realmente amo: la ciencia. ¡Gracias, Rafa! Gracias por haber confiado en mí, por darme la oportunidad de hacer el TFM a tu lado, por acogerme en tu grupo y

guiarme en mis primeros pasos en el fascinante mundo de la investigación. Gracias por haber hecho TODO lo posible, y más, para que hoy pueda culminar esta Tesis.

Loles, lo primero que recuerdo de ti es ese brillo en los ojos al observar las "células verdes" bajo el microscopio, como si hubieras descubierto un tesoro secreto. Me encanta poder "achucharte", entenderme contigo, disfrutar de tu buen humor, y trabajar codo a codo a tu lado. Me has salvado más de una vez con los experimentos y, sin duda, me has traído buena suerte. Te he cogido mucho cariño y te has ganado un rincón especial en mi corazón.

Rafa y Loles, gracias de todo corazón por haber luchado a mi lado para hacer realidad este sueño. Vuestro apoyo, tanto profesional como personal, ha sido una luz constante a lo largo de este camino. La pasión que ponéis en vuestro trabajo es contagiosa, y me llena de alegría veros en el laboratorio: Rafa, siempre inmerso en su mundo de bacterias, y Loles, la reina de la transfección, complementándoos a la perfección. Sin embargo, más allá de ser un equipo excepcional, lo que más valoro es vuestra calidad humana.

Dámaso, gracias por estar siempre ahí, dentro y fuera del laboratorio, escuchando mis inquietudes, ya fueran de ciencia o de la vida misma. Has sido un pilar inquebrantable. Por explicarme una y otra vez lo que no entendía, por ayudarme a ver con claridad y por tu infinita paciencia, te estaré eternamente agradecida. Eres, sin duda, mi ángel de la guarda científico. No sé cómo habría superado ciertos experimentos sin tu colaboración y apoyo. Atesoro tus consejos, nuestras conversaciones y esas recomendaciones que, con generosidad, siempre me ofreciste. Y, por supuesto, esos tés que compartimos, donde entre charlas profundas o simples tonterías, siempre había espacio para una buena risa. Aunque ya no compartimos momentos en el laboratorio, no importa, porque siempre serás mi amigo, más allá de cualquier lugar o circunstancia.

¡A mis compañeros Antonio, Chiara, Dani, Guille y Elena! Gracias por los momentos compartidos, por las charlas interminables sobre experimentos y esos ratitos de café que tanto alivian el día. También, gracias por aguantar mis malos chistes con tanta paciencia. No me olvido de quienes pasaron por el laboratorio a lo largo de estos años: Alejandro, Paco, Simona, Azahara e Inés, ¡gracias a todos! Y a ti, Elena, un agradecimiento especial por estar a mi lado en cada paso de este proceso. Tu apoyo ha sido fundamental.

Al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, gracias por acogerme durante todo este tiempo. Ha sido un verdadero placer compartir sonrisas y conversaciones, tanto en los pasillos como en los ascensores, especialmente a Carmen, M^a Carmen, Luis y Ali.

A nivel institucional, agradezco a Abbott Laboratories S.A. por brindarme la oportunidad de desarrollarme como investigadora tanto en esta Tesis, como al permitirme ser parte de sus proyectos.

Papá y mamá, vuestras semillas han florecido, y hoy tres árboles frutales se alzan firmes, con raíces profundas y ramas cargadas de buenos frutos. Gracias por haberme dado la vida, por haberme guiado con sabiduría, y por el inmenso esfuerzo que habéis hecho para criarnos.

Papá, de ti aprendí la fuerza de la tenacidad y la curiosidad por el latido oculto de las cosas. Me enseñaste a mirar más allá de lo evidente, a desarmar los misterios con paciencia. Y sé, con certeza, que en tus brazos siempre hallaré un refugio, un hogar donde el tiempo se detiene y el corazón descansa en calma.

Mamá, en ti vive el coraje que heredaste del abuelo, y en mí palpita ese constante afán de aprender que recibí de ti. Gracias por ser no solo mi madre, sino también mi amiga, siempre a mi lado. Tu luz, incansable, brilla en las noches más oscuras, atraviesa la niebla y me abraza en los momentos de calma. Es reconfortante saber que, sin importar el camino, siempre encuentro en ti una guía, un faro que ilumina mis pasos.

A Viviana y Violeta, mis hermanas pequeñas, siempre os he mirado con ojos de madre, protegiéndoos, preocupada porque nada os ocurra. Qué tonta he sido al no daros cuenta de que ya habéis crecido, de que os habéis convertido en dos grandes guerreras. Ahora sé que no solo estaréis a mi lado, sino que también me cuidaréis cuando lo necesite. Puedo contar con vosotras para todo, en los momentos de flaqueza y en los de alegría. Gracias por vuestro apoyo incondicional y por ser ese aliento en los días difíciles.

Luchi, eres como ese pez loro que se asoma entre los corales, un destello de vida inesperada; el arcoíris que emerge tras la tormenta, un estallido de colores vibrantes como una obra de Sonia Delaunay. Eres el pulso profundo del bajo en una melodía de jazz, ese rayo de luz que atraviesa el mar para acariciar suavemente el fondo. Este año nos hemos enfrentado a nuevos monstruos: la Tesis y el TFM, y juntas los hemos

vencido. Pero lo más hermoso ha sido descubrir, a través de las plantas medicinales de la Alhambra, esa conexión sutil entre la historia y la ciencia que nos ha unido aún más. Me siento inmensamente afortunada de haberte encontrado, y doy gracias al Universo por cruzar nuestros caminos.

Otro tesoro que me he topado en este viaje eres tú, Fran. Aunque compartimos la misma vocación farmacéutica, lo que más disfruto es descubrir contigo esa ciencia oculta que habita en lo cotidiano.

Sonia, El destino tuvo que esmerarse un poco más con nosotras, porque fue a la segunda cuando la bala dio en el blanco. Espero que podamos volver a Copenhague cuando termine la Tesis. gracias por regalarme esa piedra mágica, desde entonces, todo ha ido de maravilla.

Y hablando de cosas mágicas, gracias, Manuela y Paco, por esas maravillosas agendas que me regalasteis, permitiéndome mantener todo el trabajo en orden. Qué curioso y lleno de significado que la de este año lleve escrito: "Sueño perseguido, sueño cumplido". Como si el destino hubiera querido susurrarme lo que estaba por venir.

Gracias a todos los que, de una forma u otra, han estado conmigo en este trocito del camino.

"Es preciso sacudir enérgicamente el bosque de las neuronas cerebrales adormecidas; es menester hacerlas vibrar con la emoción de lo nuevo e infundirles nobles y elevadas inquietudes."

Santiago Ramón y Cajal

Índice de abreviaturas

3

3-DG. *3-deoxiglucosona*

A

ActA. Activina A

AD. enfermedad de Alzheimer. En inglés *Alzheimer's disease*

AGE-R1. *receptor de productos finales de glicación avanzada 1*

AGEs. productos de glicación avanzada. En inglés *advanced glycation end products*

APP. *proteína precursora de amiloide-β*

APS. persulfato amónico

Ascl1. *achaete-scute homolog 1*

ATP. adenosín trifosfato

Aβ. péptido β-amiloide

B

B3C. bis (3)-Cognitin

BDNF. factor neurotrófico derivado del cerebro. En inglés *brain-derived neurotrophic factor*

BHE. barrera hematoencefálica

bp. pares de bases

BSA. albúmina sérica bovina

C

CaMKII. Ca²⁺/calmodulina proteína quinasa II

CBP. proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc

Cdks. ciclinas dependientes de quinasas. En inglés *cyclin-dependent kinases*

cDNA. DNA complementario

CKII. caseína quinasa II. En inglés *casein kinase II*

CKIs. inhibidores de las ciclinas dependientes de quinasas. En inglés *cyclin-dependent kinases inhibitors*

CMA. autofagia mediada por chaperonas. En inglés *chaperone-mediated autophagy*

CML. *Nε-carboxymethyl-lysine*

CMV. citomegalovirus

COX. ciclooxigenasa

D

DG. giro dentado. En inglés *dentate gyrus*

DHAP. dihidroxiacetona fosfato

DMEM. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO. dimetilsulfóxido

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

DNA. ácido desoxirribonucleico

dpm. desintegraciones por minuto

DTT. ditioneitol

E

ECM. matriz extracelular

EDTA. ácido etildiaminotetraacético

EGFP. *enhanced green fluorescent protein*

EGTA. ácido tetraacético de etilenglicol

ELA. esclerosis lateral amiotrófica

ERK1/2. quinasa regulada por señales extracelulares. En inglés *extracellular signal-regulated kinase*

F

FBS. suero bovino fetal

FLNC. filamina C dimerizada

FN3K. *fructosamina 3-quinasa*

FoxO. *forkhead box O*

G

GAP. gliceraldehído-3-fosfato

GEF. *factor potenciador de GLUT4*

GFP. proteína fluorescente verde. En inglés *green fluorescent protein*

gHSA. albúmina sérica humana glucosilada

GLO1. glioxalasa I

GLO2. glioxalasa II

GLUT. transportador de glucosa

GO. glioxal

GOLD. dímero de glioxal-lisina

GPx. glutatión peroxidasa

GSH. glutatión

GSK3 β . glucógeno sintasa quinasa-3 β

H

HbA1c. hemoglobina glicosilada

HBMECs. células endoteliales microvasculares humanas

HDACs. histona desacetilasas. En inglés *histone deacetylases*

HMGB1. proteínas de alta movilidad del grupo 1. En inglés *high mobility group box 1*

I

IGF. factor de crecimiento similar a la insulina

IL-10. interleucina 10

ILK. quinasa ligada a integrina

IPCs. células madre progenitoras intermedias. En inglés *intermediate pluripotent stem cells*

J

JAK/STAT. Janus quinasa/Transductores de señal y activadores de proteínas de transcripción. En inglés *transducers, and activators of the Janus kinase signal from transcription*

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

K

Kb. kilobase

L

LB. Luria-Bertani

LDH. lactato deshidrogenasa

lnc-RNAs. *RNA largos no codificantes*

M

MAML1. proteína similar a
Mastermind 1

MAPKs. proteínas quinasas activadas
por mitógenos. En inglés *mitogen-
activated protein kinases*

MEF2. factor potenciador de miocito 2.
En inglés *myocyte-enhancer factor 2*

MGO. metilglioxal

MHC. cadena pesada de miosina

MHC class III. complejo Mayor de
Histocompatibilidad III

miRNA. micro RNA

MMPs. metaloproteinasas de matriz.
En inglés *matrix metalloproteinasas*

MOLD. dímero de metilglioxal-lisina

MPTP. 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-
tetrahidropiridina

Mrf-4. factor específico regulador del
músculo 4. En inglés *muscle-specific
regulatory factor 4*

MRFs. factores reguladores
miogénicos. En inglés *myogenic
regulatory factors*

mRNA. RNA mensajero

MTT. *bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-
2-ilo)-2,5-difeniltetrazol*

Myf-5. factor miogénico 5. En inglés
myogenic factor 5

MyoD. proteína de determinación de
los mioblastos. En inglés *myoblast
determination protein*

N

Na₂WO₄. tungstato sódico

NADPH. nicotinamida adenina
dinucleótido fosfato

ncRNA. RNA no codificante

NF-κB. *factor de transcripción nuclear*
potenciador de las cadenas ligeras
kappa de las células B activadas

NICD. *dominio intracelular del*
receptor Notch

NOS. la óxido nítrico sintasa

NPCs. células progenitoras neurales. En
inglés *neural progenitor cells*

NSCs. células madre neurales. En
inglés *neural stem cells*

O

OB. bulbo olfatorio. En inglés *olfactory
bulb*

P

p38. proteína quinasa activada por
mitógenos p38

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

PBS. tampón fosfato salino. En inglés *phosphate buffered-saline*

PCR. reacción en cadena de la polimerasa. En inglés *polymerase chain reaction*

PD. Enfermedad de Parkinson. En inglés: *Parkinson's disease*

PGC-1 α . proteína 1 α coactivadora del receptor activado por el proliferador de peroxisomas. En inglés *peroxisome proliferator-activated receptor y co-activator 1 α*

PI3K. fosfoinositol 3 quinasa

PINCH. proteína rica en cisteína e histidina. En inglés *cysteine-histidine-rich protein*

PKA. *proteína quinasa A.* En inglés *protein kinase A*

PKC. proteína quinasa C

PMSF. fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PP2B. proteína fosfatasa 2B

PVDF. fluoruro de polivinilideno

R

RAGE. receptor de AGEs

RNA. ácido ribonucleico

ROS. especies reactivas de oxígeno

RTqPCR. PCR a tiempo real

S

S6K1. *ribosomal* quinasa de la proteína ribosomal S6. En inglés *protein S6 kinase*

SDS. dodecil sulfato sódico

SGZ. zona subgranular

SNC. sistema nervioso central

SOD. superóxido dismutasa

SOD1. superóxido dismutasa 1

SOX2. *SRY (sex determining region Y)-box 2)*

SREBP-1c. proteína de unión al elemento de respuesta a los esteroides. En inglés *sterol regulatory element-binding protein-1c*

SURE. elemento regulador ascendente *slow.* En inglés *slow upstream regulatory element*

SVZ. zona subventricular

T

TBS. tampón Tris salino

TCA. ácido tricloroacético

TCE. 2,2,2-Tricloroetanol

TEMED. tetrametiletilendiamina

TLRs. receptores tipo *Toll.* En inglés *Toll-like receptors*

TNF- α . *factor* de necrosis tumoral alfa

TPI. triosa fosfato isomerasa

TrkB. receptor neurotrófico de tirosina quinasa

U

UPS. ubiquitina-proteasoma

X

X-Gal. 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

ÍNDICE

1 RESUMEN.....	23
2 INTRODUCCIÓN.....	27
3 ANTECEDENTES.....	33
3.1 Neurogénesis.....	33
3.1.1 Células madre neurales	34
3.1.2 Nichos neurogénicos.....	36
3.1.2.1 Zona subventricular	36
3.1.2.2 Zona subgranular.....	37
3.1.3 Regulación de la neurogénesis.....	39
3.1.3.1 Señales extracelulares.....	39
3.1.3.2 Señales intracelulares	42
3.1.3.3 Regulación ambiental/entorno.....	47
3.1.4 Neurodegeneración	47
3.2 AGEs	49
3.2.1 Formación de los AGEs	49
3.2.2 Tipos de AGEs	51
3.2.2.1 AGEs exógenos.....	51
3.2.2.2 AGEs endógenos.....	53
3.2.3 Detoxificación de los AGEs	54
3.2.4 Mecanismos fisiopatológicos de los AGES.....	55
3.2.4.1 Modificación de la estructura y función de biomoléculas:.....	55
3.2.4.2 Unión a receptores celulares	56
3.2.5 Receptores de los AGEs.....	56
3.2.5.1 RAGE.....	57
3.2.5.2 Ligandos	59

ÍNDICE

3.2.6 Vías de señalización de los AGEs.....	59
3.2.7 Patologías asociadas a los AGEs.....	60
3.2.7.1 Implicación de los AGEs en enfermedades neurodegenerativas.....	61
3.2.7.1.1 Modificación de proteínas.....	61
3.2.7.1.2 Neuroinflamación.....	63
3.2.7.1.3 Estrés oxidativo y apoptosis.....	65
3.2.7.1.4 Déficit de enzimas redox y glioxalastas.....	65
3.2.7.1.5 Ruta polirol.....	66
3.2.7.1.6 Efecto de los AGEs en la neurogénesis.....	67
3.2.7.1.7 Vía de señalización AGE-RAGE.....	68
3.2.8 Estrategias terapéuticas para modular el eje AGE-RAGE.....	69
3.2.8.1 Cambios en el estilo de vida.....	69
3.2.8.2 Intervenciones terapéuticas para modular el eje AGE-RAGE.....	69
3.3 MEF2.....	71
3.3.1 La familia MEF2.....	71
3.3.2 Regulación.....	72
3.3.2.1 Vías de señalización.....	72
3.3.2.2 Activadores y represores.....	73
3.3.2.3 Fosforilación desfosforilación y modificaciones covalentes.....	74
3.3.2.4 Degradación mediada por caspasas.....	75
3.3.2.5 Localización celular.....	75
3.3.3 MEF2 en el SNC.....	76
3.3.3.1 Funciones de MEF2.....	76
3.3.3.2 MEF2 en enfermedades neurodegenerativas.....	79
3.3.3.2.1 Parkinson.....	79

ÍNDICE

3.3.3.2 Alzheimer	81
3.3.3.3 MEF2 como diana terapéutica en enfermedades neurodegenerativas....	83
3.3.4 MEF2 en el músculo esquelético	83
3.3.4.1 Diferenciación muscular	84
3.3.4.2 Fusión miogénica	87
3.3.4.3 Regeneración muscular.....	89
3.3.4.4 Tipo de fibra muscular.....	89
3.3.4.5 MEF2 en enfermedades musculoesqueléticas	89
3.3.4.6 MEF2 como diana terapéutica en enfermedades musculares	95
3.3.5 MEF2 perspectivas futuras.....	96
4 OBJETIVOS.....	99
5. MATERIALES Y MÉTODOS	103
5.1 Materiales.....	103
5.1.1 Instrumentación	103
5.1.2 Líneas celulares	106
5.1.2.1 Procariotas	106
5.1.2.2 Eucariotas	106
5.1.3 Material para el cultivo de células	107
5.1.3.1 Medios de cultivo para bacterias	107
5.1.3.2 Medios de cultivo para líneas celulares eucariotas	108
5.1.4 Material utilizado para la manipulación de ácidos nucleicos.....	109
5.1.4.1 Plásmidos comerciales.....	109
5.1.4.2 Construcciones realizadas en plásmidos de DNA	113
5.1.4.3 Oligonucleótidos	114
5.1.4.3.1 Ensayos de PCR a tiempo real	114

ÍNDICE

5.1.4.3.2 Ensayos de clonación y mutagénesis	116
5.1.4.4 Reactivos.....	116
5.1.5 Material para la manipulación de proteínas	117
5.1.6 Aplicaciones informáticas	118
5.2 Métodos.....	120
5.2.1. Métodos de cultivo y manipulación de bacterias.....	120
5.2.1.1 Preparación de células competentes.....	120
5.2.1.2 Transformación por choque térmico	120
5.2.2 Métodos de cultivo, manipulación y observación de células eucariotas	121
5.2.2.1 Generalidades	121
5.2.2.2 Tripsinización.....	121
5.2.2.3 Recuento de células	121
5.2.2.4 Congelación y almacenamiento de líneas celulares	122
5.2.2.5 Transfección eucariota	122
5.2.2.6 Microscopía de fluorescencia	124
5.2.2.7 Ensayos de viabilidad y proliferación celular basados en MTT	124
5.2.2.8 Ensayo de citotoxicidad basado en la actividad LDH	125
5.2.2.9 Recuento de formación y longitud de neuritas	126
5.2.2.10 Tinción β -galactosidasa asociada a senescencia	126
5.2.2.11 Análisis del ciclo celular	127
5.2.2.12 Determinación de la captación de glucosa.....	128
5.2.2.13 Estudio de promotores mediante el uso de genes reporteros codificantes de luciferasas	128
5.2.3 Técnicas para el análisis de ácidos nucleicos	129
5.2.3.1 Aislamiento y purificación de DNA plasmídico.....	129

Minipreps de DNA Plasmídico	129
Midipreps de DNA plasmídico	129
5.2.3.2 Cuantificación de DNA	130
Método fluorimétrico	130
Cuantificación espectrofotométrica.....	130
5.2.3.3 Digestión con endonucleasas de restricción.....	131
5.2.3.4 Electroforesis de DNA en geles horizontales de agarosa	131
5.2.3.5 Ligación de DNA	132
5.2.3.6 Reacción en cadena de la polimerasa	132
5.2.3.7 Secuenciación de DNA.....	133
5.2.3.8 Extracción de RNA	133
5.2.3.9 Cuantificación de RNA.....	134
5.2.3.10 Electroforesis de RNA en geles horizontales de agarosa	134
5.2.3.11 Retrotranscripción de RNA	135
5.2.3.12 PCR cuantitativa o PCR en tiempo real	135
5.2.3.13 Vectores de expresión de MEF2D y construcciones de genes reporteros	136
5.2.4. Técnicas para el análisis de proteínas.....	137
5.2.4.1 Preparación de extractos proteicos	137
5.2.4.2 Cuantificación de proteínas.....	138
5.2.4.3 Western blot.....	138
5.2.4.4 Ensayo de degradación de proteínas.....	142
5.2.4.5 Determinación de la síntesis de proteínas	142
6 RESULTADOS.....	147
6.1 Efecto del Na ₂ WO ₄ en la diferenciación de células Neuro2a y SH-SY5Y	148
6.1.1 Efecto del Na ₂ WO ₄ en el crecimiento de neuritas.....	148

ÍNDICE

6.1.2 Efecto del Na_2WO_4 en el ciclo celular.....	150
6.1.3 Efecto del Na_2WO_4 en la proliferación celular.....	153
6.1.4 Efecto del Na_2WO_4 sobre marcadores de diferenciación neuronal	155
6.1.5 Mecanismo molecular del Na_2WO_4 en la diferenciación celular.	156
6.1.6 Efecto del Na_2WO_4 en el metabolismo neuronal.....	159
6.2 Efecto del Na_2WO_4 sobre el factor de transcripción MEF2D.....	161
6.3 Efecto del Na_2WO_4 en la neuroprotección	166
7 DISCUSIÓN.....	175
8 CONCLUSIONES.....	191
9 BIBLIOGRAFÍA	195

RESUMEN

1 RESUMEN

El tungstato de sodio (Na_2WO_4) es una molécula bioactiva con múltiples propiedades, destacando su capacidad para regular la homeostasis glucémica y favorecer la pérdida de peso. Sus efectos sobre la glucosa se manifiestan en tejidos como el hígado, músculo y páncreas, donde activa la vía MAPK/ERK, independientemente de la presencia de la insulina [1].

En el músculo esquelético, el Na_2WO_4 , al activar ERK1/2, aumenta la expresión y translocación de GLUT4 e incrementa la síntesis de proteínas, previniendo la degradación muscular [2, 3], lo que anima a estudiar de nuevas aplicaciones terapéuticas.

Las enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer, Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica (ELA), están asociadas a la resistencia a la insulina y alteraciones en el metabolismo de la glucosa. La hiperglucemia crónica genera estrés oxidativo y daño mitocondrial, acelerando la neurodegeneración. La desensibilización de los receptores de insulina en el cerebro contribuye a la disfunción sináptica y la progresión de estas patologías [4-6].

Una estrategia prometedora para combatir la neurodegeneración es la estimulación de la plasticidad neuronal, regulada por vías de señalización como PI3K/Akt y MAPK/ERK [7, 8], que activan factores de transcripción clave como MEF2D. Este factor es crucial para la supervivencia, diferenciación y plasticidad neuronal [9], y desempeña un papel neuroprotector al inhibir la inflamación y proteger las neuronas frente al daño por privación de oxígeno y glucosa [10, 11].

En esta Tesis Doctoral se han investigado los efectos del Na_2WO_4 en neuronas, enfocándose en su capacidad para promover la diferenciación neuronal y su potencial neuroprotector. En cultivos celulares de neuroblastoma de ratón (Neuro2a) y humano (SH-SY5Y), el Na_2WO_4 promovió la diferenciación hacia neuritas colinérgicas, deteniendo el ciclo celular en la fase G1/G0 mediante la activación de PI3K/Akt y ERK1/2. Además, en células Neuro2a, el Na_2WO activó mTOR y S6K, potenciando la síntesis proteica y aumentando la captación de glucosa a través de GLUT3, proporcionando la energía y los recursos biosintéticos necesarios para el crecimiento de neuritas.

RESUMEN

El Na_2WO_4 también aumentó los niveles de MEF2D mediante un mecanismo postraducciona, prolongando su vida media. Las mutaciones en los sitios de sumoilación de MEF2D anularon los efectos positivos del Na_2WO_4 sobre su actividad transcripcional. Además, el Na_2WO_4 mostró efectos neuroprotectores frente a productos avanzados de glicación (AGEs), que reducen la diferenciación de neuritas al provocar una disminución en la fase G1/G0 del ciclo celular, disminuyen la expresión de MEF2D y GLUT3 y aumentan la apoptosis. Estos efectos fueron revertidos tras la incubación con Na_2WO_4 .

Nuestros resultados sugieren que el Na_2WO_4 es un agente terapéutico prometedor para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, al modular factores de transcripción clave, restaurar la homeostasis energética y prevenir la apoptosis. Dada su capacidad de cruzar la barrera hematoencefálica y su eficacia en la normalización de la glucosa, el Na_2WO_4 tiene un considerable potencial terapéutico en el sistema nervioso central. Sin embargo, se requieren estudios adicionales en modelos animales para esclarecer los mecanismos moleculares y su eficacia en enfermedades neurodegenerativas específicas.

INTRODUCCIÓN

2 INTRODUCCIÓN

La búsqueda de la inmortalidad y la eterna juventud ha fascinado a la humanidad durante milenios, impulsando un creciente interés en la investigación del proceso de envejecimiento. La esperanza de vida ha aumentado notablemente y se proyecta que alcanzará una media de 90 años para el año 2050. Este envejecimiento poblacional es un desafío global urgente para las sociedades desarrolladas del siglo XXI. Impulsado por el aumento de la esperanza de vida y la disminución de la tasa de natalidad, este fenómeno ha provocado un cambio demográfico significativo, con un notable incremento en la proporción de personas mayores [12].

A medida que las personas envejecen, aumenta el riesgo de desarrollar enfermedades relacionadas con la edad, como cáncer, Alzheimer (AD, por su nombre en inglés: *Alzheimer's disease*), Parkinson (PD por su nombre en inglés: *Parkinson's disease*), accidentes cerebrovasculares, enfermedades cardíacas, fragilidad muscular, artritis, diabetes tipo 2, obesidad y deterioro cognitivo. Estas enfermedades son las principales causas de morbilidad y mortalidad en la población envejecida y suelen acompañarse de trastornos de la salud mental como la depresión y la ansiedad, además de problemas sociales como el estrés, la soledad, el aislamiento social, el estigma, la pobreza, las dificultades financieras y el desempleo [13]. Estas enfermedades no solo afectan la calidad de vida de las personas, sino que representan una carga económica para los sistemas de salud, con repercusiones sociales, económicas y emocionales a nivel comunitario [14].

La multimorbilidad, la presencia de dos o más enfermedades crónicas en un mismo individuo, es un problema prevalente en la población mayor. Por ejemplo, personas mayores de 75 años con diabetes tienen más del doble de probabilidades de desarrollar otra enfermedad en comparación con aquellas sin una patología previa [15]. Además, entre el 25 % y el 50 % de las personas mayores de 80 años experimenta fragilidad, lo que dificulta su recuperación frente a infecciones, caídas u otros estresores menores. La interconexión entre la multimorbilidad y la fragilidad aún no está completamente comprendida, planteando preguntas sobre si una condición conduce a la otra o si son independientes.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades relacionadas con la edad, como la diabetes, PD y AD comparten mecanismos comunes que incluyen daño al DNA, senescencia celular, inflamación y autofagia [14]. La modulación de estos mecanismos puede retrasar el inicio y mitigar el desarrollo de estas enfermedades [16]. El desarrollo de fármacos que actúen sobre las vías de señalización celular involucradas en el envejecimiento es un enfoque terapéutico prometedor para el tratamiento y prevención de múltiples patologías asociadas con la edad.

Los marcadores del envejecimiento están estrechamente relacionados, de modo que la intervención en uno de ellos puede afectar a otros. Esta interconexión subraya la complejidad del envejecimiento, que debe abordarse de manera integral, considerándose cada aspecto como una vía prometedora para el desarrollo de nuevas terapias anti-envejecimiento [17].

El tungstato sódico (Na_2WO_4) es un agente hipoglucemiante oral con baja o nula toxicidad [1]. Tiene capacidad para normalizar la producción de glucosa en hígado [18], páncreas [19], y nuestro grupo de investigación ha confirmado que favorece la entrada de glucosa al músculo tanto en modelos in vivo [20] como in vitro [2]. En estos tejidos, la actividad del Na_2WO_4 se basa en la activación de la vía MAPK/ERK, independientemente de la presencia de insulina [21]. Además, el Na_2WO_4 tiene la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE), lo que lo convierte en un compuesto atractivo para la modulación de procesos fisiológicos y patológicos en diversos tejidos y tipos celulares [22]. Además, presenta un efecto antiobesidad [23].

Nuestro grupo ha investigado sus efectos en el músculo esquelético, observando un aumento en la translocación del transportador de glucosa 4 (GLUT4) hacia la membrana plasmática, dependiente de la fosforilación de ERK1/2, y un incremento en la cantidad total de GLUT4, mediado por la activación de factores de transcripción específicos del músculo, como los pertenecientes a la familia del factor potenciador de miocito (MEF2 por su nombre en inglés *myocyte enhancer factor 2*) [2]. Además, el Na_2WO_4 estimula la síntesis de proteínas y previene su degradación mediante la activación de la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK1/2 por su nombre en inglés *extracellular signal-regulated kinase*) [3], por lo que podría considerarse como una alternativa a IGF-I y sus análogos para prevenir la atrofia muscular.

Dados los resultados positivos en el músculo esquelético, es plausible que el Na_2WO_4 pudiera tener efectos beneficiosos en neuronas, donde también se expresan factores de transcripción de la familia MEF2 que juegan un papel fundamental en la supervivencia y plasticidad de las neuronas. En esta Tesis Doctoral se ha investigado los posibles efectos del Na_2WO_4 en neuronas, evaluando su capacidad para promover la diferenciación y plasticidad neuronal, así como su potencial neuroprotector. La modulación de las vías de señalización intracelulares y de la expresión del factor transcripcional MEF2D en neuronas podría abrir nuevas perspectivas terapéuticas para enfermedades neurodegenerativas y trastornos relacionados con el envejecimiento.

El estudio de los efectos del Na_2WO_4 en neuronas es de gran interés debido a su potencial para combinar efectos antidiabéticos, antiobesidad, de protección frente a la sarcopenia y neuroprotección. La diabetes tipo 2, cuya prevalencia aumenta con la edad, también afecta al cerebro y eleva el riesgo de disfunción cognitiva. Los productos finales de glicación avanzada (AGEs, por nombre en inglés: *advanced glycation end products*), aumentan durante la inflamación, el envejecimiento, la diabetes y las enfermedades neurodegenerativas. Los AGEs juegan un papel crucial en la patogénesis de complicaciones diabéticas y en trastornos neurodegenerativos [24, 25].

Disponer de un agente terapéutico que aborde estas patologías a través de dianas moleculares específicas sería muy atractivo. En esta Tesis Doctoral, se presentarán resultados que demuestran que el Na_2WO_4 , a través de rutas de señalización que implican a las MAP quinasas es capaz de promover la diferenciación y plasticidad neuronal y proteger frente a AGEs en células neuronales. Estos efectos están mediados por rutas de señalización y dianas moleculares específicas, validando el potencial terapéutico de esta molécula.

Aunque es posible que el Na_2WO_4 no se convierta en un medicamento disponible en farmacias, su mecanismo de acción único y efecto pleiotrópico sobre patologías concomitantes a la diabetes y el envejecimiento lo hacen un modelo valioso para el desarrollo de fármacos más potentes dirigidos a las mismas dianas moleculares. Esta es la premisa que da validez a este trabajo.

ANTECEDENTES

3 ANTECEDENTES

3.1 Neurogénesis

El sistema nervioso central (SNC) es el componente más importante del sistema nervioso humano. Recibe e integra señales aferentes de todo el cuerpo, desempeñando un papel crucial en funciones cerebrales como el aprendizaje, la memoria y las emociones [26]. Está compuesto por una vasta red de 86.1 billones de neuronas y un número aún mayor de células gliales [27].

Hasta el siglo XX, la neurociencia estaba dominada por un dogma central que sostenía que el cerebro era una estructura estática. Se creía que la neurogénesis, es decir, la formación de nuevas neuronas se producía exclusivamente durante el desarrollo y cesaba poco después del nacimiento. Sin embargo, en la década de 1960, el neurocientífico Joseph Altman desafió este paradigma con estudios pioneros que evidenciaron la generación de nuevas neuronas en regiones del cerebro posnatal, como el neocórtex, el giro dentado (DG por su nombre en inglés *dentate gyrus*) del hipocampo, el bulbo olfatorio (OB por su nombre en inglés *olfactory bulb*) y la corteza cerebelosa de diversos mamíferos [28-31]. Aunque inicialmente controvertidos, estos hallazgos sentaron las bases para la investigación futura sobre la neurogénesis adulta.

La década de 1990 marcó un punto de inflexión con el desarrollo de nuevas técnicas de marcaje neuronal más precisas. Estas herramientas permitieron visualizar y rastrear las nuevas neuronas en cerebros vivos, proporcionando evidencia irrefutable de su existencia e integración funcional en el SNC [32]. Avances posteriores confirmaron la presencia de neurogénesis adulta no solo en el hipocampo, sino también en otras regiones cerebrales clave como el OB y el núcleo estriado [33, 34].

La neurogénesis, un aspecto esencial a lo largo de todo el ciclo vital, implica la generación de nuevas neuronas funcionales a partir de diferentes tipos celulares como las células madre neurales (NSCs por su nombre en inglés *neural stem cells*), las células progenitoras neurales (NPCs por su nombre en inglés *neural progenitor cells*) y la proliferación de neuroblastos. Este proceso también abarca la diferenciación, maduración y mantenimiento de las neuronas, así como su migración e integración en los circuitos cerebrales preexistentes [35].

ANTECEDENTES

La neurogénesis adulta tiene importantes implicaciones para la comprensión del funcionamiento cerebral y la plasticidad neuronal. Se cree que este proceso juega un papel clave en procesos cognitivos como el aprendizaje, la memoria, el estado de ánimo y la reparación del daño cerebral [36-38]. Además, la alteración de la neurogénesis adulta se ha asociado con trastornos cognitivos y enfermedades neurodegenerativas. La regulación de la neurogénesis depende de la interacción entre factores extrínsecos e intrínsecos en los nichos neurogénicos, áreas especializadas del cerebro donde se generan y desarrollan nuevas neuronas a partir de NSCs [34].

Comprender estos mecanismos en el SNC abre nuevas y prometedoras posibilidades para el desarrollo de estrategias terapéuticas contra enfermedades neurodegenerativas como AD, PD y la esclerosis múltiple. La estimulación de la neurogénesis en áreas específicas del cerebro podría contribuir a la recuperación de funciones cognitivas perdidas y mejorar la calidad de vida de los pacientes [39-41].

3.1.1 Células madre neurales

Una de las principales barreras para la aceptación de la neurogénesis adulta era la idea inconcebible de que las neuronas maduras, consideradas terminalmente diferenciadas e incapaces de volver al ciclo de división celular, pudieran dividirse y generar nuevas neuronas. Sin embargo, el año 1992 marcó un antes y un después en la comprensión del funcionamiento del cerebro. Los estudios pioneros de Reynolds y Weiss lograron identificar por primera vez las NSCs en el cerebro adulto de ratón, desafiando este paradigma establecido [42].

Estas NSCs desempeñan un papel crucial en el mantenimiento de la función fisiológica, la formación cerebral durante los períodos prenatal y postnatal, y la regeneración del tejido nervioso y la plasticidad cerebral [43, 44].

Las NSCs se caracterizan por dos propiedades fundamentales:

1. Capacidad de autorrenovación: las NSCs pueden dividirse para generar dos células hijas idénticas, ambas NSCs. Esta capacidad les permite mantener su población a lo largo del tiempo y actuar como un reservorio de células madre en el cerebro [45].

2. **Potencialidad neurogénica:** las NSCs también pueden dividirse de forma asimétrica, dando lugar a una célula hija NSCs y una célula hija diferenciada, como una neurona, un astrocito u otro tipo de célula glial [46, 47]. Esta capacidad les permite contribuir al crecimiento, reparación y plasticidad del cerebro a lo largo de la vida.

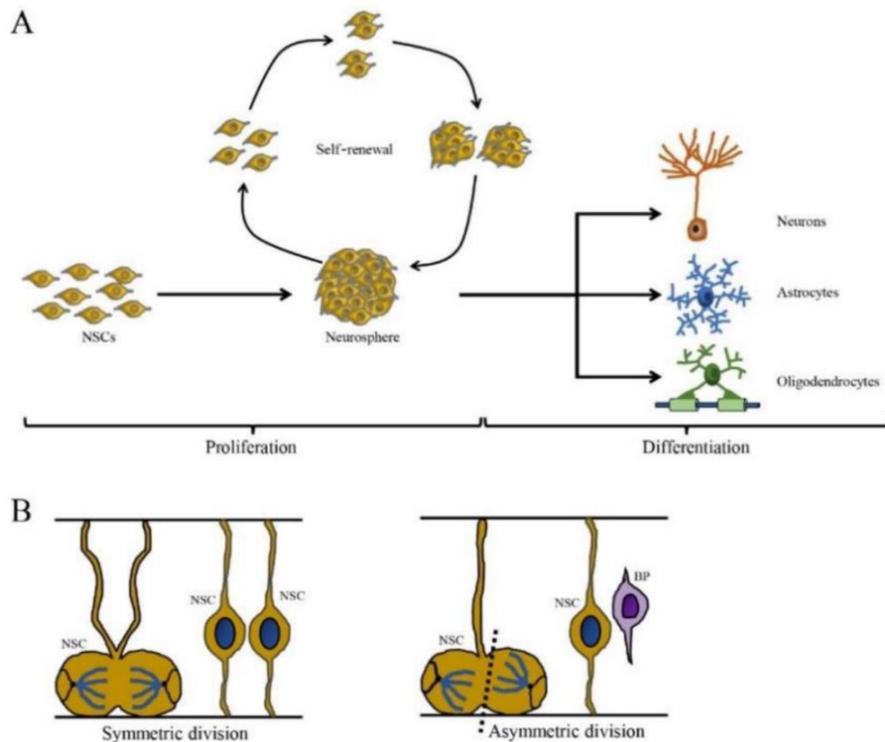


Figura 1. Capacidad de autorrenovación y patrón de división celular de las NSCs.

(A) Las NSCs son células autorrenovables y multipotentes capaces de diferenciarse en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. (B) La división celular de las NSCs ocurre de dos maneras: División simétrica (genera dos células hijas NSCs). División asimétrica (genera una célula NSC y una célula progenitora basal. Imagen tomada de [48].

Las NSCs proliferan formando estructuras esféricas no adherentes denominadas neuroesferas, compuestas por precursores derivados clonalmente. Estas NSCs proliferan continuamente dando lugar a numerosas neuroesferas hijas que comparten el mismo fenotipo, demostrando así su capacidad de autorrenovación [49, 50].

ANTECEDENTES

Tradicionalmente, la quiescencia, el estado de inactividad de las NSCs adultas, se ha considerado un mecanismo para resistir el estrés metabólico y preservar la integridad del DNA a lo largo de la vida. Sin embargo, investigaciones recientes han revelado que las NSCs quiescentes conservan la capacidad de responder a señales y activarse cuando reciben estímulos intracelulares o del nicho [51]. Entre los factores que pueden desencadenar esta activación se encuentran la reducción en la expresión de GABA o la inhibición de la vía de señalización Wnt [52, 53].

Lejos de ser un estado pasivo, la quiescencia de las NSCs se considera como un estado dinámico y funcional de gran importancia. Al modular su estado de quiescencia y activación, las NSCs pueden adaptarse a las necesidades del cerebro, participando en procesos como el mantenimiento de la función fisiológica, la formación cerebral durante los períodos prenatal y postnatal, la regeneración del tejido nervioso y la plasticidad cerebral [43, 44].

3.1.2 Nichos neurogénicos

En mamíferos adultos las NSCs se localizan principalmente en dos regiones específicas: la zona subventricular (SVZ) de los ventrículos laterales y la zona subgranular (SGZ) del DG del hipocampo. [54]. Estas regiones proporcionan un microambiente especializado, denominado nicho neurogénico, que nutre y regula a las NSCs. Dentro de estos nichos, las NSCs generan NPCs que se dividen rápidamente y producen neuroblastos migratorios. Estos neuroblastos se diferencian en neuronas que posteriormente se integran en los circuitos neuronales preexistentes [55].

El nicho actúa como un regulador crucial de las capacidades de las NSCs in vivo, limitando su autorrenovación y multipotencialidad, y dando lugar a una neurogénesis específica de cada región del cerebro. Este microambiente extracelular, conformado por diversos tipos de células vecinas que secretan o presentan señales específicas en su membrana plasmática, junto con las moléculas de la matriz extracelular (ECM), desempeña un papel fundamental en la determinación del linaje y el potencial de las NSCs [56-59].

3.1.2.1 Zona subventricular

La SVZ representa el principal nicho neurogénico del cerebro adulto de mamíferos. Se localiza a lo largo de la capa de células endimarias que

revisten las paredes de los ventrículos laterales y alberga una subpoblación de NSCs en estado de quiescencia, denominadas células tipo B. Estas células poseen características similares a las de la glía radial y están integradas en la vasculatura, conectándose con vasos sanguíneos de la SVZ [60, 61].

Las células tipo B, se dividen asimétricamente para generar células progenitoras intermedias, conocidas como células tipo C. Estas, a su vez, se diferencian en neuroblastos o células tipo A [57]. Estos neuroblastos migran a través de la corriente migratoria rostral hacia el OB, donde se diferencian en células granulares olfativas GABAérgicas, que carecen de axón y establecen sinapsis dendrodendríticas con células mitrales y en penacho. Una minoría se transforma en neuronas periglomerulares, GABAérgicas, algunas de las cuales también son dopaminérgicas, integrándose en el circuito neuronal del OB [62-65].

3.1.2.2 Zona subgranular

El otro nicho neurogénico en el cerebro de mamíferos adultos donde residen las NSCs es la SGZ del DG del hipocampo. Las NSCs ubicadas en la SGZ, conocidas como células tipo 1, presentan características electrofisiológicas similares a las de los astrocitos y morfología de las células gliales radiales [66, 67]. Las células tipo 1 desarrollan prolongaciones que les permiten establecer contacto tanto con la capa molecular, a través de procesos apicales, como con los vasos sanguíneos. Estas células permanecen en estado de quiescencia y rara vez se dividen, mantenidas así por la liberación de GABA por las interneuronas locales. Sin embargo, pueden activarse en respuesta a estímulos internos y externos [52, 68, 69].

Cuando las células tipo 1 se activan y salen del estado de quiescencia, generan células progenitoras intermedias, que a su vez generan neuroblastos [68, 70]. Los neuroblastos recién nacidos migran hacia la capa interna de las células granulares del DG donde continúan su proceso de maduración. Durante esta etapa, proyectan sus axones hacia la región hilar, estableciendo conexiones con el área CA3 del hipocampo. Simultáneamente extienden sus dendritas hacia la capa molecular, formando conexiones sinápticas con los axones de la corteza entorrinal [71-73].

ANTECEDENTES

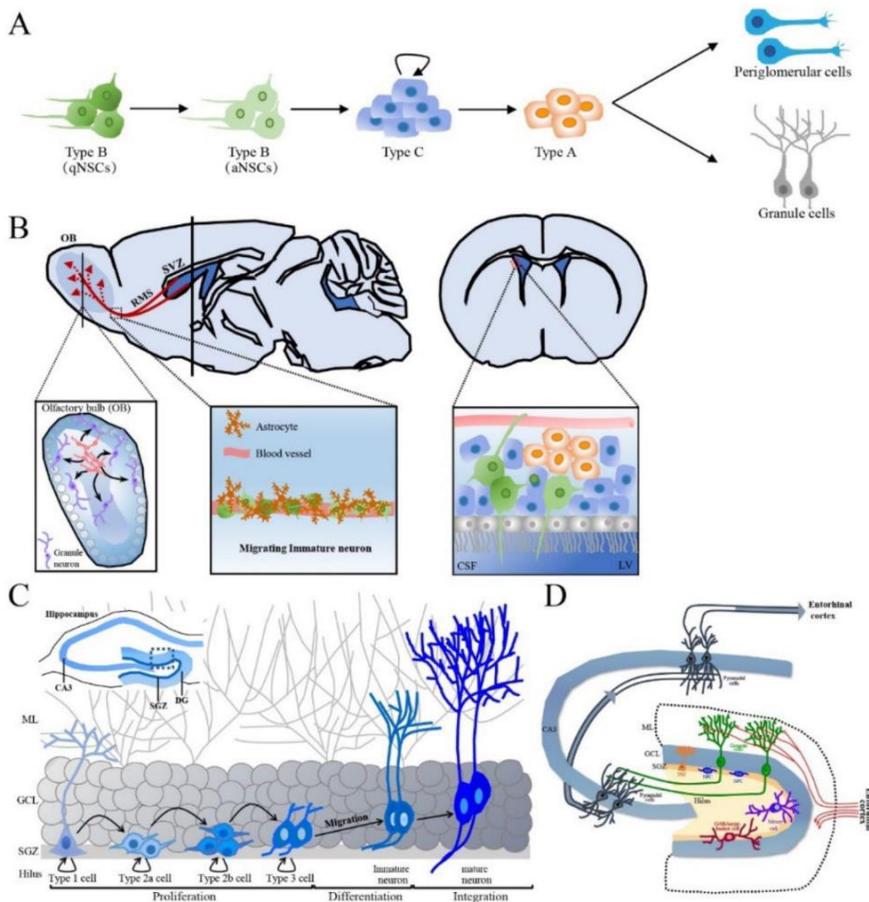


Figura 2. Proceso de neurogénesis en la SVZ y SGZ y la integración de neuronas recién nacidas en el hipocampo.

(A) Representación esquemática de la neurogénesis en la SVZ adulta en cinco etapas de desarrollo. (B) Se muestran la sección sagital y la sección transversal del cerebro, la integración sináptica y maduración de células granulares y periglomerulares en el OB, la composición del flujo migratorio rostral (RMS) y la conexión entre las NSCs de la SVZ y el líquido cefalorraquídeo (CSF) del ventrículo lateral (LV). Las células verdes son células tipo B, las células azules son células tipo C y las células naranjas son células tipo A. (C) Representación esquemática de la neurogénesis en el hipocampo adulto DG. (D) La estructura y circuitos del hipocampo. Representación esquemática de una sección transversal del hipocampo que muestra el DG, CA3 y SGZ. Imagen tomada de [48].

La neurogénesis adulta en el hipocampo es crucial para funciones dependientes del hipocampo como la plasticidad, la cognición, el aprendizaje, la memoria espacial, la separación de patrones y algunos comportamientos emocionales como la depresión y la ansiedad [74, 75]. Además, se ha observado su participación en la formación, consolidación

y declive de la memoria, en la separación y discriminación de patrones, así como en procesos de adicción y atención [76].

3.1.3 Regulación de la neurogénesis

3.1.3.1 Señales extracelulares

La regulación de la neurogénesis implica una compleja interacción de señales del nicho, factores de crecimiento, vías de señalización y neurotransmisores. Estos elementos, junto con la ECM, desempeñan un papel crucial en la autorrenovación, proliferación y diferenciación de las NSCs. La regulación precisa de estas señales es esencial para mantener la homeostasis del nicho neurogénico y garantizar el funcionamiento adecuado del sistema nervioso adulto.

Las NSCs extienden prolongaciones celulares que se asocian estrechamente con los vasos sanguíneos, permitiendo un intercambio bidireccional de señales entre las células endoteliales y las NSCs. Las células endoteliales secretan diversos factores que influyen en el comportamiento de las NSCs. Por ejemplo, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) promueve la autorrenovación de las NSCs, mientras que la neurotrofina-3 (NT-3) induce a la quiescencia y el mantenimiento a largo plazo [77].

Además, la BHE se vuelve más permeable en las áreas donde proliferan las NSCs, facilitando el acceso de las células a los factores presentes en la sangre, proporcionándoles nutrientes y señales adicionales que son esenciales para su supervivencia y función [78].

En condiciones de homeostasis, las microglías mantienen el equilibrio en el nicho neurogénico mediante la fagocitosis de células madre progenitoras intermediarias (IPCs por su nombre en inglés *intermediate pluripotent stem cells*) apoptóticas. Sin embargo, la activación de la microglía inhibe la neurogénesis [79, 80].

Las NSCs liberan factores que intervienen en la señalización autocrina y paracrina, regulando así su propio comportamiento y el de las células que integran el microambiente [81]. La progenie inmediata de las NSCs emite señales que difunden, como el neurotransmisor GABA [82], o mediadas por contacto como el ligando Notch Dll1 [83]. Estas señales regulan la quiescencia de las NSCs y garantizan la estabilidad del nicho.

ANTECEDENTES

Además, los astrocitos segregan citocinas como IL-1b e IL-6, que favorecen el proceso de diferenciación neuronal de las NSCs [84].

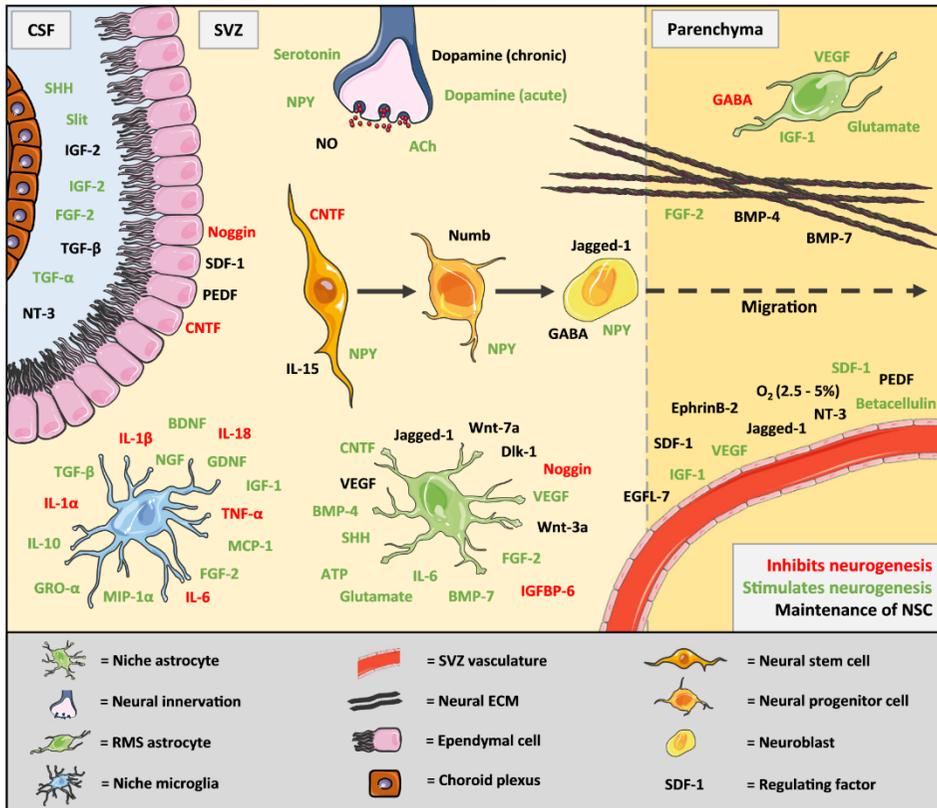


Figura 3. Regulación extracelular de la neurogénesis en la SVZ. Imagen tomada de [85].

La ECM proporciona un andamiaje tridimensional que guía la migración de las NSCs y la formación de nuevas neuronas. Entre sus componentes se encuentran lamininas, proteoglicanos y tenascina C, que se unen a receptores específicos de las NSCs activando cascadas de señalización que regulan la supervivencia, proliferación y diferenciación neuronal [86]. La molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1), altamente expresada en los extremos apicales de las NSCs de SVZ, juega un papel crucial en la organización estructural de la arquitectura de las células endimarias [87]. Además, la interacción de la ECM con proteínas como la quinasa ligada a integrina (ILK) modula la proliferación de las NSCs. La pérdida de ILK en NSCs adultas conlleva a un aumento de la proliferación celular [88].

Las vías de señalización BMPs, Notch, Wnt y *Sonic Hedgehog* (SHH), son esenciales en la regulación del desarrollo embrionario y la

neurogénesis en la edad adulta [89]. Por ejemplo, BMP inhibe la neurogénesis al promover la diferenciación de las NSCs en astrocitos en la SVZ y la quiescencia en la SGZ [90, 91]. La vía de señalización Notch induce la proliferación y el mantenimiento de las NSCs en ambos nichos neurogénicos. Su inhibición induce la salida de las NSCs del ciclo celular y su diferenciación a progenitores neuronales, limitando su capacidad de autorrenovación [92]. La señalización de Wnt contribuye al mantenimiento de las NSCs, sus inhibidores Dickkopf-1 (Dkk1) y la proteína relacionada con *Frizzled* secretada 3 (sFRP3), promueven la quiescencia, regulando así su proliferación y diferenciación [53, 93]. En la SVZ, la señalización de SHH es necesaria para el mantenimiento de las NSCs; sin embargo, una sobre activación promueve la división simétrica, expandiendo inicialmente la población, pero agotándola a largo plazo [94].

Diversos factores de crecimiento como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF por su nombre en inglés: *brain-derived neurotrophic factor*), IGF-I, FGF-2, EGF, HB-EGF y VEGF modulan el destino celular, afectando el tamaño de las poblaciones neuronales y gliales tanto en el desarrollo cerebral como en la edad adulta. En modelos neurodegenerativos, se observa una sobreexpresión de estos factores, que pueden actuar como protectores del daño neuronal o como inductores de la generación y diferenciación de nuevas células para reemplazar a las lesionadas. Por ejemplo, la administración de IGF-I por vía periférica, incrementa la neurogénesis en el hipocampo de ratas adultas [95-98].

Aunque las NSCs no establecen conexiones sinápticas, poseen receptores que responden a diversos neurotransmisores [99]. El GABA, principal neurotransmisor inhibitorio del cerebro induce la quiescencia de las NSCs al detener la progresión del ciclo celular [100]. En la SVZ, el GABA liberado por los neuroblastos limita la división de las NSCs mediante un mecanismo de retroalimentación negativa [82]. Las NSCs de SGZ detectan el GABA liberado por interneuronas de parvalbúmina, y la reducción de la señalización de GABA las activa e induce a la división simétrica [52]. La dopamina fomenta la quiescencia de las NSCs [101]. Por otro lado, la serotonina y la acetilcolina activan las NSC de SVZ [102, 103].

Las NSCs adultas también se comunican con otras células mediante uniones de hendidura e interacciones directas célula-célula. Principalmente, las NSCs están conectadas entre sí mediante uniones de hendidura formadas por conexina 43 (Cx43) [104]. La pérdida de Cx30 y Cx43 en NSCs de SGZ el número de NSCs. Además, las NSCs interactúan directamente con células endoteliales del sistema vascular y astrocitos. En

ANTECEDENTES

la SGZ, la expresión de efrinaB2 en los astrocitos promueve la diferenciación neuronal de las NSCs al incrementar la actividad del factor de transcripción pro-neuronal mediado por el receptor EphB4 [105]. En la SVZ, la expresión de efrinaB2 y Jagged1 en células endoteliales favorece la quiescencia de NSCs al reprimir su entrada al ciclo celular e inhibir su diferenciación. La pérdida de cualquiera de los genes conduce a la activación y posterior disminución de las NSCs [106].

Además de interactuar con su entorno inmediato, las NSCs también pueden detectar cambios sistémicos a través de factores circulantes. Las NSCs de la SVZ tienen acceso directo al LCR, el cual constituye un reservorio complejo de señales diversas. En el cerebro embrionario, el LCR promueve la proliferación de progenitores neurales corticales mediante la acción de IGF-2 [107].

En resumen, las NSCs están reguladas de manera dinámica por una amplia gama de factores sinérgicos y antagonistas tanto dentro de sus nichos neurogénicos como a nivel sistémico.

3.1.3.2 Señales intracelulares

La transducción de señales desde el entorno extracelular activa cascadas de señalización que desencadenan mecanismos reguladores dentro de la célula, como los factores de transcripción, las modificaciones epigenéticas y los procesos metabólicos. Aunque algunos de estos reguladores influyen directamente en la expresión génica o en la función celular, existe una amplia interrelación entre ellos, dando lugar a una red compleja de interacciones [33].

Factores de transcripción

La activación secuencial de diversos factores de transcripción garantiza un desarrollo adecuado de las NPCs en adultos. La familia *forkhead box O* (FoxO) regula múltiples vías de señalización intracelular y es esencial para el mantenimiento a largo plazo de los precursores neurales en adultos [108, 109]. En contraste, factores como Prox1, NeuroD y el factor 9 tipo Krüppel (KLF9) son indispensables para la maduración y supervivencia de nuevas neuronas en el hipocampo adulto [110-112].

Las NSCs adultas expresan el factor de transcripción SRY (sex determining region Y)-box 2) (SOX2), cuya expresión está regulada por la activación de la vía de señalización Notch. La supresión de SOX2 reduce la cantidad de las NSCs [113, 114]. Otro factor de transcripción crucial es

Ascl1 (achaete-scute homolog 1), presente exclusivamente en NSCs activadas, que induce la salida de estas células del estado de quiescencia, permitiendo su proliferación y diferenciación en nuevas neuronas [115]. El receptor nuclear TLX es esencial para la autorrenovación y el mantenimiento de las NPCs en el cerebro adulto, probablemente a través de una vía canónica de Wnt/ β -catenina [116].

El factor silenciador de la transcripción del elemento represor-1/factor silenciador neuronal restrictivo (REST/NRSF) mantiene la población de las NSCs en el SGZ bloqueando la expresión de genes que promueven la diferenciación neuronal [117]. En la SVZ adulta, Olig2 determina el destino de las células amplificadoras transitorias, mientras que Pax6 y Dlx-2 dirigen el destino neuronal y promueven un fenotipo periglomerular dopaminérgico en ratones adultos [118-120].

El factor de transcripción MEF2 influye en la diferenciación y maduración de las NPCs en neuronas durante el desarrollo embrionario, facilitando la plasticidad sináptica al regular negativamente la cantidad y la función de las sinapsis en roedores adultos *in vivo*. Además, la eliminación de MEF2A o MEF2D también demuestra esta regulación negativa de la morfogénesis sináptica. MEF2C dirige la diferenciación de NPCs de células madre embrionarias hacia neuronas, suprimiendo destinos gliales y promoviendo la supervivencia celular durante la diferenciación neuronal [121-126].

Factores epigenéticos

Los mecanismos epigenéticos, como la metilación del DNA, las modificaciones de las histonas y los RNA no codificantes, son esenciales en la neurogénesis adulta al regular la expresión génica [127].

Metilación del DNA

La metilación del DNA generalmente conduce a la represión de la expresión génica. Durante la neurogénesis, la enzima DNMT3B (*DNA methyl transferase 3B*) se expresa en las NSCs. Su eliminación acelera la maduración neuronal, como lo demuestra el aumento en la expresión de varios genes neuronales como NeuroD1, Map2m and Ncam1 [128]. Por otro lado, la desmetilación del DNA, a través de la vía de señalización TET-GADD45, regula la proliferación de las NSCs de la SGZ [129] y modula la expresión de factores de crecimiento en las neuronas granulares maduras [130]. La proteína de unión al DNA metilado MeCpG1 regula el equilibrio entre proliferación y diferenciación durante la neurogénesis adulta en el

ANTECEDENTES

hipocampo, suprimiendo la expresión de FGF-2 y varios micro RNA (miRNA) [131].

Modificaciones de histonas

Las modificaciones en las histonas también desempeñan un papel importante en la regulación epigenética de la neurogénesis en la etapa adulta. Un ejemplo destacado es la proteína Bmi-1, que forma parte del complejo de remodelación de la cromatina Polycomb y es fundamental para preservar la capacidad de autorrenovación de las NSCs presentes en SVZ [132]. Ezh2, un componente del complejo represor Polycomb 2, actúa como metiltransferasa en la histona H3K27 y está presente en las NSCs que se encuentran en división activa en la SGZ, promoviendo la proliferación de las NSCs mediante la inhibición de Pten y la activación de la vía de señalización Akt-mTOR [133]. Por otro lado, las histona desacetilasas (HDACs por su nombre en inglés *histone deacetylases*) HDAC3 y HDAC5 muestran una alta expresión en las NSCs y regulan tanto la proliferación como la diferenciación neuronal. La eliminación de HDAC3 en neuronas y células gliales causa desorganización del neocórtex y el cerebelo, además de ocasionar la muerte perinatal en estos ratones [134].

RNA no codificantes

Los mecanismos epigenéticos también incluyen RNA no codificantes (ncRNA), que establecen una red de interacciones cruzadas. Los ncRNA y los RNA largos no codificantes (lnc-RNAs), desempeñan funciones regulatorias en la neurogénesis adulta [135]. Los lnc-RNAs, como Six3os y Dlx1as, favorecen la diferenciación neuronal y suprimen la diferenciación astrocítica de las NSCs, mientras que otros, como Pnky, inhiben la diferenciación [136, 137].

Los miRNA regulan la expresión génica al unirse a regiones no traducidas de los RNAm objetivo, inhibiendo la síntesis proteica. El miR-124 fomenta la progresión de linajes en la SVZ al inhibir a SOX9 [138], mientras que el miR-137 impide la diferenciación y estimula la proliferación de las NSC mediante la modulación de Ezh2 [139].

Reguladores del ciclo celular

Los reguladores del ciclo celular, como las ciclinas dependientes de quinasas (Cdks por su nombre en inglés: *cyclin-dependent kinases*), HDACs e inhibidores de las ciclinas dependientes de quinasas (CKIs por su nombre en inglés: *cyclin-dependent kinases inhibitors*), desempeñan un papel crucial en la neurogénesis.

En el hipocampo adulto, la inhibición de Cdk6 alarga la fase G1, promoviendo la salida prematura del ciclo celular y la diferenciación [140]. La sobreexpresión de Cdk4-ciclina D1 produce una expansión de la reserva de NSCs en detrimento de la diferenciación neuronal, lo que conduce a una disminución en la neurogénesis [141]. En la SVZ adulta, la ausencia del gen antiproliferativo PC3/Tis21 incrementa la expresión de las ciclinas D1 y D2, acelerando la proliferación de las NSCs [142].

Cdk5 se activa principalmente en células postmitóticas del cerebro regulando la migración, diferenciación neuronal y la plasticidad sináptica [143]. Estudios en ratones knockout sugieren que Cdk5 es crucial para la arquitectura y orientación de la cadena de neuroblastos en la SVZ del cerebro adulto [144].

Las ciclinas D1 y D2 son proteínas esenciales para la diferenciación de las NSCs en el DG. La ciclina D2 es necesaria para el compromiso de las NSCs con la diferenciación neuronal, mientras que la ciclina D1 es indispensable para la diferenciación astrocítica [145, 146].

La HDAC3 regula la proliferación de las NSCs y NPCs mediante la estabilización de la Cdk1 [147].

Los CKIs comprenden integrantes de las familias Cip/Kip (p21cip1, p27kip1 y p57kip2) e Ink4 (p16Ink4a, p15Ink4b, p18Ink4c y p19Ink4d. p57kip2 controla la duración de la fase G1 y la salida del ciclo celular en NPCs. En neuronas posmitóticas promueve la formación de neuritas inmaduras, la migración neuronal y el transporte axonal. También es esencial para la maduración de las espinas dendríticas y la memoria a largo plazo en el hipocampo adulto [148].

Metabolismo

Las neuronas de mamíferos dependen exclusivamente de la glucosa como su principal fuente de energía, y su metabolismo está rigurosamente regulado durante la diferenciación y la degeneración neuronal [149, 150].

Durante la diferenciación neuronal, se produce una importante reorganización metabólica, caracterizada por la transición de la glucólisis aeróbica a la fosforilación oxidativa en las NPCs que se transforman en neuronas [151]. Esta transición se manifiesta mediante la reducción en la expresión de hexoquinasa (HK2) y lactato deshidrogenasa (LDH), así como por un cambio en la isoforma de la piruvato quinasa de PKM2 a PKM1.

ANTECEDENTES

Además, la diferenciación neuronal se asocia con el aumento de la expresión de reguladores clave de la biogénesis mitocondrial, incluyendo a la proteína 1α coactivadora del receptor activado por el proliferador de peroxisomas (PGC- 1α por su nombre en inglés *peroxisome proliferator-activated receptor* y *co-activator 1 α*), ERR γ y TFAM. El aumento de la masa mitocondrial proporcional al crecimiento neuronal sugiere que la activación de la biogénesis mitocondrial contribuye al crecimiento celular, incluyendo el desarrollo axonal y dendrítico [152].

Durante la diferenciación terminal de las neuronas corticales, se observa un aumento en el metabolismo de la glucosa, caracterizado por una mayor captación de glucosa y una mayor expresión GLUT3. La glucólisis aeróbica en las neuronas es crucial para mantener la elongación axonal y la sinaptogénesis. La producción de metabolitos como acetil-CoA, es esencial para la síntesis de lípidos necesarios para la expansión de la membrana durante el crecimiento de las neuritas. Esta reprogramación metabólica está mediada por la activación del eje PI3K/mTOR [153, 154].

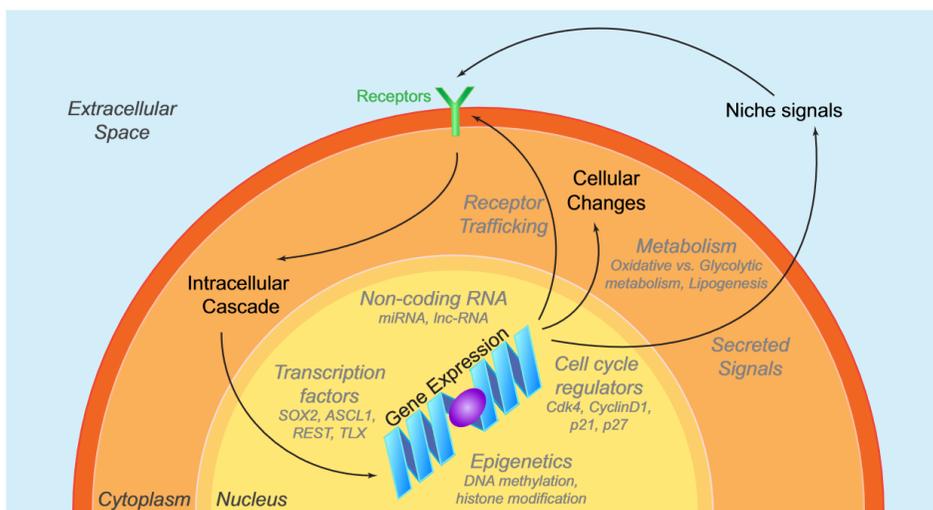


Figura 4. Regulación intracelular de la neurogénesis. Imagen tomada de [155].

La glutamina también desempeña un papel significativo en la homeostasis energética celular, ya que puede convertirse en glutamato y luego en α -cetoglutarato que será oxidado en el ciclo del ácido tricarbóxico para sintetizar ATP. La diferenciación neuronal terminal también está asociada con un aumento en el metabolismo de la glutamina, lo que resulta en un aumento en la expresión de neurotransmisores como

el glutamato y el GABA, y una mayor actividad del ciclo del ácido tricarbóxico [153].

3.1.3.3 Regulación ambiental/entorno

La regulación de la neurogénesis adulta está influenciada por diversos estímulos fisiológicos, patológicos y ambientales. La actividad física, por ejemplo, promueve la proliferación celular en el hipocampo. [156], mientras que el aprendizaje de nuevas habilidades, la interacción social y actividades que fomentan la estimulación mental, favorecen la supervivencia de nuevas neuronas. [33]. En contraste, el estrés crónico, la depresión y la inflamación local o sistémica, tienen un efecto negativo en la neurogénesis [157].

3.1.4 Neurodegeneración

La neurodegeneración, un conjunto de enfermedades que afectan progresivamente el sistema nervioso, se asocia estrechamente con el envejecimiento. Esta relación se fundamenta en los cambios que ocurren en el microambiente cerebral a medida que avanzamos en edad. Entre los diversos factores de riesgo para la neurodegeneración, los biomarcadores del envejecimiento cobran especial relevancia [158].

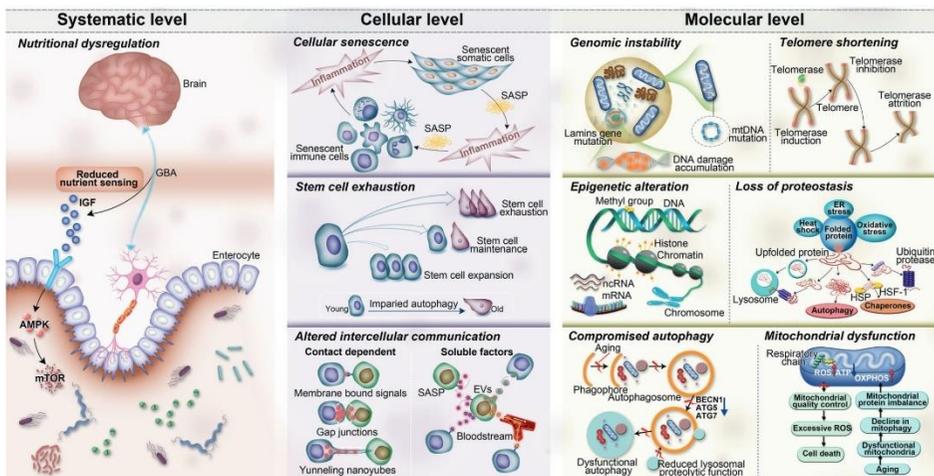


Figura 4. Características distintivas del proceso de envejecimiento. Imagen tomada de [159]

Se han identificado doce características distintivas del proceso de envejecimiento. Cada una de estas características se ha relacionado con la

ANTECEDENTES

patogénesis de al menos una enfermedad neurodegenerativa [17, 160]. Entre las más relevantes encontramos:

Agotamiento de las células madre: la neurogénesis adulta disminuye con la edad debido al agotamiento de las NSCs en el hipocampo. Este fenómeno está relacionado con el deterioro cognitivo asociado al envejecimiento [161].

Disrupción metabólica: la disminución del transporte de glucosa y de los niveles de oxígeno en el cerebro son fenómenos que ocurren durante el envejecimiento normal. Estas alteraciones pueden conducir a trastornos neurodegenerativos, como AD, PD y enfermedad de Huntington [162]. En animales con deficiencia de insulina como en ratones con resistencia a la insulina, la diabetes afecta negativamente a la plasticidad sináptica y la neurogénesis del hipocampo, así como a los déficits cognitivos asociados, a través de un mecanismo mediado por glucocorticoides [163].

Inflamación crónica: el envejecimiento induce un estado de neuroinflamación crónica, caracterizado por la activación de células gliales como la microglía y los astrocitos, así como la infiltración de macrófagos periféricos. Estas células liberan diversas moléculas proinflamatorias, como citoquinas, quimiocinas, neurotransmisores y especies reactivas de oxígeno (ROS); que generan un ambiente tóxico para las NSCs y reducen la neurogénesis. La neuroinflamación crónica se ve aumentada por otros factores como el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial, contribuyendo no solo a la disminución de la neurogénesis sino también a la neurodegeneración y a enfermedades como AD y PD [164].

Agregación de proteínas: las enfermedades neurodegenerativas más prevalentes, AD y PD, comparten la característica común de la agregación de proteínas, a pesar de sus diversos síntomas clínicos. En AD, la formación de placas seniles que contienen péptido β -amiloide ($A\beta$) extracelular y ovillos neurofibrilares (NFTs) intraneuronales son las principales características patogénicas. En el Parkinson, la acumulación de alfa-sinucleína (α -syn) mal plegada es el sello distintivo de la enfermedad [165].

La comprensión de los mecanismos que regulan la neurogénesis abre nuevas posibilidades para el diseño de nuevas moléculas capaces de modular los mecanismos moleculares que la regulan, potenciando su capacidad para regenerar el tejido cerebral dañado, lo que permitiría el

tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, como AD, PD, la depresión, accidentes cerebrovasculares y lesiones cerebrales.

3.2 AGEs

Los AGEs constituyen un grupo heterogéneo de compuestos que se forman tanto exógena como endógenamente, a través de diversos mecanismos y a partir de una amplia variedad de precursores (Figura 6). Las reacciones que conducen a la formación de AGEs son conocidas desde hace más de un siglo, remontándose a la descripción inicial de Maillard en 1912.

3.2.1 Formación de los AGEs

La formación de AGEs ocurre mediante un proceso denominado glicación no enzimática. En la fase inicial de este proceso, el grupo carbonilo electrófilo de un azúcar reductor se condensa con un grupo amino libre (especialmente residuos de lisina o arginina) presentes en proteínas, lípidos o ácidos nucleicos. El grupo carbonilo puede derivar de una aldosa, como la D-glucosa, o una cetosa, como la D-fructosa. Las cetosas pueden ser generadas in vivo a través de la ruta poliol, donde la D-glucosa se reduce a sorbitol mediante la aldosa reductasa y luego se convierte en D-fructosa por la acción de la sorbitol deshidrogenasa [166].

Los compuestos formados en esta reacción reversible son inestables y se conocen como bases de Schiff. Estas bases de Schiff se reorganizan estructuralmente para formar de un producto de Amadori estable mediante la ruta de Maillard, o a un producto Heyns por la ruta del poliol [167]. Estos compuestos, conocidos como productos de glicación temprana, incluyen AGE derivados de fructosa (Fru-AGE) y de glucosa (Glu-AGE). Ejemplos relevantes de esta última categoría son la hemoglobina glicosilada (HbA1c) y la albúmina sérica humana glicosilada (gHSA), que sirven como marcadores de estados hiperglucémicos, resistencia a la insulina y diabetes [168-170].

Los productos de glicación temprana experimentan una serie de reordenamientos estructurales a través de reacciones como ciclación, deshidratación, condensación, entrecruzamiento y polimerización para producir los carbonilos reactivos. Entre los ejemplos más destacados se encuentran el glioxal (GO), metilglioxal (MGO), el gliceraldehído, el glicolaldehído, el diacetilo y la 1 y 3-desoxiglucosona [171].

ANTECEDENTES

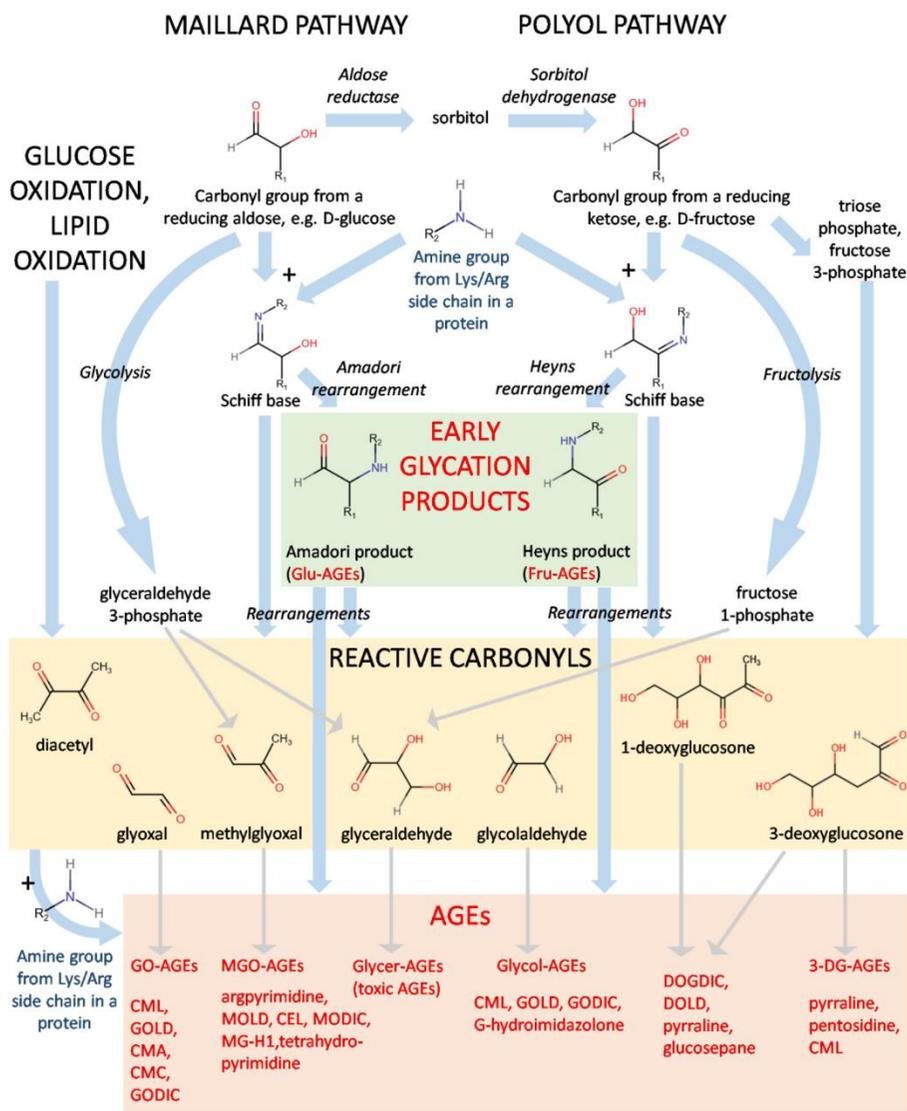


Figura 6. Proceso de formación de los AGEs. Abreviaciones: derivados de glucosa (Glu-AGEs), derivados de fructosa (Fru-AGEs), derivados de glicoxal (GO-AGEs), derivados de metilglicoxal (MGO-AGEs), derivados de gliceraldehído (Glycer-AGEs), derivados de glicolaldehído (Glycol-AGEs) y derivados de 3-desoxiglucosona (3-DG-AGEs. Imagen tomada de [172].

Existen diversas vías in vivo que también pueden generar carbonilos reactivos. Por ejemplo, el MGO y el gliceraldehído pueden producirse durante la glucólisis (a partir de gliceraldehído-3-fosfato (GAP)) o la fructólisis (a partir de fructosa 1-fosfato). La oxidación de la glucosa y el metabolismo de la D-fructosa, que produce triosa fosfato y fructosa 3-fosfato, son otros ejemplos que conducen a la formación de esta clase de compuestos [166].

Es importante destacar la existencia de otro grupo significativo de compuestos, los productos finales de lipoxidación avanzada (ALE), que se originan a partir de los carbonilos reactivos formados como resultado de la peroxidación lipídica [166].

Los carbonilos reactivos pueden condensarse adicionalmente con los grupos amino de lisinas y argininas, en una reacción similar a la de Maillard. Estas reacciones producen una amplia variedad de AGEs finales, que generalmente se clasifican en dos categorías: aductos de proteínas y entrecruzamientos de proteínas [166, 171].

Algunos de los AGEs mejor caracterizados son N ϵ -carboxymethyl-lysine (CML), la pentosidina, pirralina, MGO, dímero de metilglioxal-lisina (MOLD) y dímero glioxal-lisina (GOLD) [173].

3.2.2 Tipos de AGEs

Los AGEs se han detectado tanto en la sangre y los tejidos humanos como en los alimentos. Debido a su diversidad, pueden clasificarse en varios grupos según diferentes criterios, como su origen, los precursores involucrados, su estructura química, su capacidad de fluorescencia, su peso molecular y su toxicidad para el organismo.

La acumulación de AGEs puede ocurrir a través de dos vías principales: exógena y endógena.

3.2.2.1 AGEs exógenos

Los AGEs exógenos se encuentran en una gran variedad de alimentos [174]. Los AGEs exógenos se encuentran ampliamente presentes en la dieta occidental moderna. El procesamiento térmico de los alimentos, en particular mediante métodos de calor seco como la cocción, la fritura, el asado, la parrilla y el horneado, incrementa significativamente la concentración de AGEs [175]. Además, los alimentos procesados suelen contener aditivos químicos y altos niveles de azúcares y grasas, lo que se hace para mejorar su conservación, seguridad, apariencia y sabor, contribuyendo a la generación de AGEs derivados de alimentos, conocidos como glicotoxinas [176].

Se ha demostrado que los AGEs de la dieta contribuyen significativamente al total de AGEs en el organismo, con una tasa de absorción que varía entre el 10 % y el 30 %. La farmacocinética de los AGEs

ANTECEDENTES

exógenos está influenciada por varios factores, como su tamaño molecular, la complejidad de su estructura química y las interacciones con la microbiota intestinal de los AGEs no absorbidos.

Producto de la Reacción de Maillard	Tipo de Alimentos	Procesamiento de los Alimentos	Rango de Productos Finales de Glicación Avanzada en Diferentes Alimentos
<i>Acrilamida</i>	Alimentos ricos en almidón, como papas fritas.	Freír, Asar a la parrilla, Hornear	Papas fritas: 272–570 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ Productos de panadería: 75–1044 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ Cereales de desayuno: 149 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$
<i>Furano</i>	Alimentos ricos en PUFA, carotenoides, o alimentos que contienen vitaminas	Asar, Freír, Caramelizar, Pasteurización	Café expreso: 936 ng/g^{-1} Papas fritas: 259 ng/g^{-1} Comida para bebé en frascos: 8.5 ng/g^{-1} Jugo de naranja: 7.0 ng/g^{-1}
<i>CML</i>	Fórmula infantil, leche y productos lácteos, huevos cocidos, mantequilla de cacahuete, carne de res, pollo, carne.	Asar, Quemar, Hervir, Hornear, Asar a la parrilla, Tostar	Mantequilla de cacahuete: 5–7 $\text{mg}/100 \text{ g}$ de proteína Chocolates con leche: 0.01 $\text{mg}/100 \text{ g}$ de proteína Muestras de leche: 2.7 $\text{mg}/100 \text{ g}$ de proteína Pan blanco, huevos hervidos: 11.2 $\text{mg}/100 \text{ g}$ de proteína
<i>CEL</i>	Pasteles, papas fritas, mantequilla de cacahuete	Hornear, Asar, Freír	Pollo asado: 5–500 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ de producto Pescado de aguas profundas: 2.49–249 ng/mL , Mantequilla de cacahuete: 7 $\text{mg}/100 \text{ g}$ de producto
<i>Metilgloxal, glicoxal, 3-deoxiglucosona</i>	Jarabe de maíz de alta fructosa	Pasteurización, Hervir, Hornear, Procesamiento a alta presión	Jugos de frutas: 410 mg/L Vinagre balsámico: 2622 mg/L Galletas: 385 mg/kg Refrescos carbonatados: 0.3–1 mg/L

Tabla 1. Productos de glicación avanzada exógenos comúnmente encontrados, medidos mediante HPLC y ELISA, y su rango aproximado en consumibles. Basada en [174].

Los AGEs de bajo peso molecular (<5 kDa) se absorben fácilmente y otros como la fructosa-lisina y la CML se unen a péptidos de menos de 1000 Da que facilitan su absorción [177]. Por otro lado, los AGEs de alto peso molecular no son absorbidos en el intestino, sino que llegan al colon, donde son metabolizados por la microbiota intestinal, ya que ciertas bacterias poseen enzimas que degradan las proteínas glicadas [178]. Además, los AGEs pueden alterar el microbioma intestinal y desencadenar una respuesta inflamatoria, afectando la integridad de la barrera intestinal y aumentando las citoquinas inflamatorias en la circulación sistémica [179, 180].

Una vez absorbidos, los AGEs se distribuyen por diversos tejidos, como el hígado y los riñones, donde pueden acumularse cuando sobrepasan los sistemas para su detoxificación [181]. Una vez en la circulación sistémica, los AGEs de bajo peso molecular se excretan principalmente por los riñones mediante filtración glomerular. Varios estudios han demostrado que tanto los AGEs libres como los unidos a peptídicos pueden ser reabsorbidos en el túbulo proximal renal [182, 183]. El humo del tabaco también contiene productos de glicación altamente

reactivos que pueden provocar la formación de AGEs en el organismo [184].

Varias enzimas y sistemas de detoxificación participan en la degradación de AGEs. Por ejemplo, el receptor de productos finales de glicación avanzada 1 (AGE-R1), presente en los macrófagos induce la endocitosis de AGEs e inhibe la activación del receptor de AGEs (RAGE) asociada al factor de transcripción nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B)). La eliminación y depuración de AGEs endógenos dependen del transporte mediado por receptores hacia las células, donde pueden ser degradados en los lisosomas [171, 181, 185].

Se ha demostrado que los AGEs exógenos poseen efectos proinflamatorios y prooxidantes, mientras que una restricción dietética de alimentos ricos en AGEs se ha asociado significativamente con una reducción tanto en la inflamación como en las modificaciones de proteínas [186, 187].

3.2.2.2 AGEs endógenos

Los AGEs se generan de forma natural en todos los tejidos y fluidos del organismo como parte del metabolismo normal de los azúcares, a través de reacciones de glicación no enzimáticas. En individuos sanos, los niveles de proteínas plasmáticas glicadas suelen ser inferiores al 3 % y su acumulación gradual está asociada al envejecimiento. La formación de los AGEs es lenta en condiciones fisiológicas, y estos tienden a acumularse principalmente en proteínas con una vida media larga, como las de la ECM, la mielina, el cartílago y el cristalino [188].

Si bien la formación de AGEs es un proceso natural asociado al envejecimiento, diversas condiciones patológicas la aceleran de forma considerable, como la hiperglicemia sostenida, el estrés oxidativo, la obesidad, la insuficiencia renal crónica, la deficiencia en glioxalasa o procesos autoinmunes e inflamatorios [189]. Además de la reacción no enzimática de formación de AGEs, la autooxidación de la glucosa a través de la vía del poliol y la peroxidación lipídica también generan los α -oxoaldehídos, que son precursores de AGEs [190]. En condiciones de hiperglucemia sostenida, como en la diabetes mellitus tipo 2, se ha demostrado que la glucosa puede ser tóxica para las células, ya que un exceso de glucosa puede sobrecargar la vía glucolítica [191]. Un paso crítico en la glucólisis es la conversión de glucosa en dihidroxiacetona

ANTECEDENTES

fosfato (DHAP) y GAP mediante la enzima triosa fosfato isomerasa (TPI). Cuando la actividad de TPI es insuficiente, DHAP se acumula, lo que conduce a la formación espontánea de MGO, una molécula altamente reactiva capaz de causar daño celular [192].

3.2.3 Detoxificación de los AGEs

Los AGEs endógenos son detectados por los receptores *scavenger* en los macrófagos, que los fagocitan y los degradan parcialmente en AGEs de bajo peso molecular. Estos péptidos contienen intermediarios carbonilos reactivos que amplifican el daño tisular [171].

Además, en el organismo existen diversos sistemas enzimáticos que contrarrestan la formación de AGEs a partir de precursores MGO, glicoxal y 3-deoxiglucosona (3-DG). Estos compuestos son susceptibles a los efectos de detoxificación de varias enzimas, como la aldosa reductasa dependiente de NADPH, la aldehído deshidrogenasa y la 2-oxoaldehído deshidrogenasa, así como el sistema glioxalasa. Este último consiste en dos enzimas, la glioxalasa I (GLO1) y la glioxalasa II (GLO2), y una cantidad catalítica de glutatión (GSH). Sin embargo, durante el estrés oxidativo, la concentración de tioles se reduce, lo que impide la detoxificación de los α -oxoaldehídos y promueve su acumulación. Por otro lado, un sistema enzimático reductor se encarga de detoxificar el 3-DG a 3-desoxifrutosa, la cual luego es excretada por la orina. La enzima fructosamina 3-quinasa (FN3K) fosforila y desestabiliza los productos de Amadori, lo que lleva a su descomposición espontánea [193, 194]. La vía de detoxificación de DJ-1/Park7, también conocida como la familia de desglucosidas de Maillard DJ-1, tiene la capacidad de reparar intermediarios tempranos de glicación y residuos glicosados de guanina en ácidos nucleicos y nucleótidos. DJ-1 es una proteína multifuncional de respuesta al estrés que, a pesar de no depender de GSH, funciona de manera similar al sistema de glioxalasa y entre sus sustratos se incluyen aminoácidos y proteínas glicosadas [195, 196].

Las vías antiglicación suelen focalizarse únicamente en los intermediarios de la glicación, ya que una vez generados, los AGEs se acumulan y se vuelven insolubles. Aun así, existen mecanismos intracelulares de degradación que contribuyen a eliminar estos aductos tóxicos. Entre ellos se encuentran el sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) y la autofagia, que pueden funcionar de manera independiente o en cooperación. Parece que la autofagia podría tener un papel importante en la degradación de complejos de alto peso molecular que no pueden ser eliminados por el proteasoma. Alternativamente, la eliminación de los

AGEs por autofagia se podría considerar como un mecanismo compensatorio ante la inhibición parcial de la actividad del UPS, la cual está mediada por productos de glicación [197, 198].

La importancia de las vías de detoxificación de AGEs se ilustra claramente en el contexto del envejecimiento normal, incluso en ausencia de hiperglucemia. Por ejemplo, se ha demostrado que las glicotoxinas se acumulan en enfermedades relacionadas con el envejecimiento, como AD, la insuficiencia renal y las enfermedades cardíacas [199]. Esta acumulación de AGEs en estas enfermedades también se encuentra en proteínas patológicamente vinculadas, como la tau asociada a AD o la α -sinucleína asociada a la enfermedad de Parkinson [200, 201]. La acumulación de glicotoxinas dependiente de la edad podría ser parcialmente consecuencia de una disminución gradual de las capacidades proteolíticas durante el envejecimiento normal [197]. Además, la pérdida de actividad de la glioxalasa con la edad podría aumentar la formación de dicarbonilos reactivos, lo que tendría un efecto perjudicial y aditivo en el aclaramiento disminuido de los AGEs relacionado con la edad [202].

3.2.4 Mecanismos fisiopatológicos de los AGEs

El desarrollo y la progresión de enfermedades crónicas degenerativas están estrechamente relacionados con los niveles elevados de AGEs. Estas enfermedades incluyen la diabetes [203], enfermedades cardiovasculares [204-206], obesidad [207], trastornos neurológicos [193, 208, 209], algunos tipos de cáncer [210, 211], así como todas aquellas patologías en las que intervienen los mecanismos de estrés oxidativo y los procesos de senescencia [208].

Los efectos perjudiciales de los AGEs se deben principalmente a dos mecanismos fundamentales: la modificación de la estructura y función de biomoléculas y su unión a sus receptores celulares.

3.2.4.1 Modificación de la estructura y función de biomoléculas:

Un efecto particularmente perjudicial de los AGEs es su capacidad para provocar el entrecruzamiento de proteínas. Este mecanismo de entrecruzamiento covalente, que ocurre tanto de manera intermolecular como intramolecular, afecta la estructura y función de diversas macromoléculas, incluyendo proteínas séricas, lípidos, enzimas, proteínas de la ECM y DNA. Este proceso causa un daño irreversible y altera

ANTECEDENTES

significativamente sus funciones. Los entrecruzamientos producen una pérdida de la función de proteínas y enzimas, haciéndolas resistentes a la digestión proteolítica, creando sitios catalíticos para la formación de ROS, reduciendo su capacidad de degradación, y provocando un reconocimiento y aclaramiento anormal por parte de los receptores.

Además, los AGEs son proinflamatorios, modifican la señalización intracelular y causan diversas alteraciones metabólicas y bioquímicas. Esta inflamación crónica generada por los AGEs no solo contribuye al daño celular, sino que también incrementa la producción de ROS, creando un círculo vicioso que amplifica el estrés oxidativo y el daño tisular. Los niveles elevados de ROS exacerban aún más el daño provocado por los entrecruzamientos, afectando a macromoléculas críticas y potenciando los efectos nocivos de los AGEs.

Un ejemplo de las consecuencias de estos entrecruzamientos es la glicación del DNA, que produce DNA-AGEs inmunogénicos, asociados con diabetes, enfermedades neurodegenerativas y cáncer. La glicación de proteínas de vida media larga de la ECM altera sus propiedades físicas y biomecánicas, especialmente en el envejecimiento y la diabetes. La glicación del colágeno, tipo I afecta a su estructura normal, alterando la disposición molecular del tropocolágeno y evitando el deslizamiento molecular interfibrilar en tendones endurecidos. La glicación de la elastina también tiene efectos negativos, ya que induce un entrecruzamiento postraduccional que reduce la viscoelasticidad, lo que endurece la piel y el sistema vascular. También se ha observado que la glicación de la α -cristalina del cristalino se asocia con la reducción de la transparencia y el aumento de la dispersión de luz en cataratas diabéticas y asociadas a la edad [212-214].

3.2.4.2 Unión a receptores celulares

Los AGEs son reconocidos por receptores celulares que los internalizan y degradan, pero también pueden modular las funciones celulares al unirse a receptores y activar posteriormente diversas vías de señalización que producen estrés oxidativo, inflamación, alteración de la homeostasis metabólica y modificaciones epigenéticas [213].

3.2.5 Receptores de los AGEs

El RAGE es el receptor de AGEs más estudiado. Además, se han identificado otros receptores de AGEs, como el AGE-R1/OST-48, el AGE-

R2/80K-H y el AGE-R3/galectina-3, así como miembros de la familia de receptores de *scavenger* Tipo I y II (SR-AI/II), tipo B clase I (SR-BI), CD36 y receptores tipo *Toll* (TLRs por su nombre en inglés *Toll-like receptors* (*Toll-like receptors*). La expresión de estos receptores varía según el tipo de célula o tejido y se ve afectada por cambios metabólicos, como el envejecimiento, la diabetes y la hiperlipidemia [215].

3.2.5.1 RAGE

El RAGE es una proteína transmembrana perteneciente a la superfamilia de inmunoglobulinas de moléculas de superficie celular. En humanos, es codificada por el gen RAGE localizado en el cromosoma 6, en la región del Complejo Mayor de Histocompatibilidad III (MHC class III), lo que sugiere su participación en los procesos de respuesta del sistema inmunológico. Este gen comprende 11 exones y da lugar a diversas isoformas de la proteína. La forma completa de RAGE (fl-RAGE) presenta una estructura que consta de una región extracelular que incluye una región variable (V), seguida de dos dominios constantes (C1 y C2), los cuales son sitios de unión para sus ligandos. La cola citosólica de fl-RAGE es esencial para la señalización intracelular [216, 217].

El transcrito primario de RAGE experimenta *splicing* alternativo y escisiones proteolíticas para generar isoformas truncadas. La forma truncada N-terminal pierde su capacidad de unión a ligandos, mientras que la eliminación del extremo C-terminal genera RAGE solubles (sRAGE). Estas formas se generan por la acción de metaloproteasas a partir del fl-RAGE.

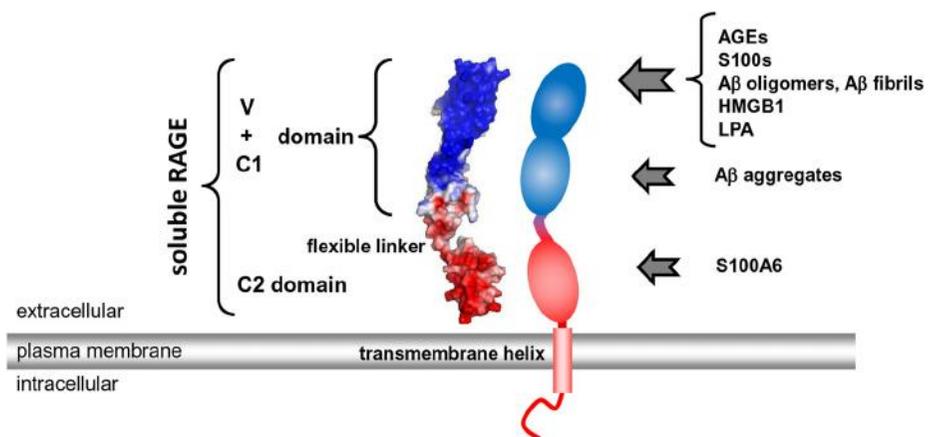


Figura 5. Estructura de RAGE y modelo de sRAGE. Imagen tomada de [217].

ANTECEDENTES

Los sRAGE, al carecer del dominio transmembrana, funcionan como receptores señuelo al ser liberados al espacio extracelular, donde interactúan con los ligandos de RAGE, previniendo la señalización celular. Por otra parte, el RAGE dominante negativo (dnRAGE), que carece de la cola citosólica, bloquea la activación y señalización de RAGE. Ambas isoformas, sRAGE y dnRAGE, interfieren con la transducción de señales tóxicas de fl-RAGE y desempeñan un papel antagonista en la transducción de señales de AGEs/RAGE [218-221].

El RAGE suele estar presente en niveles bajos en la mayoría de los tejidos, aunque se expresa en mayor medida en pulmón, corazón y músculo esquelético. Asimismo, se expresa en células musculares lisas, monocitos, macrófagos, células endoteliales, microglía y astrocitos. Sin embargo, su expresión aumenta en enfermedades como diabetes mellitus, enfermedad cardiovascular, AD, cáncer y durante el envejecimiento. Este aumento se debe a una sobreexpresión de RAGE, resultado de un *feed-back* positivo inducido por sus ligandos [24, 222, 223]. Aunque el RAGE no es esencial en el inicio de la patogénesis, sí juega un papel en su desarrollo y progresión [217].

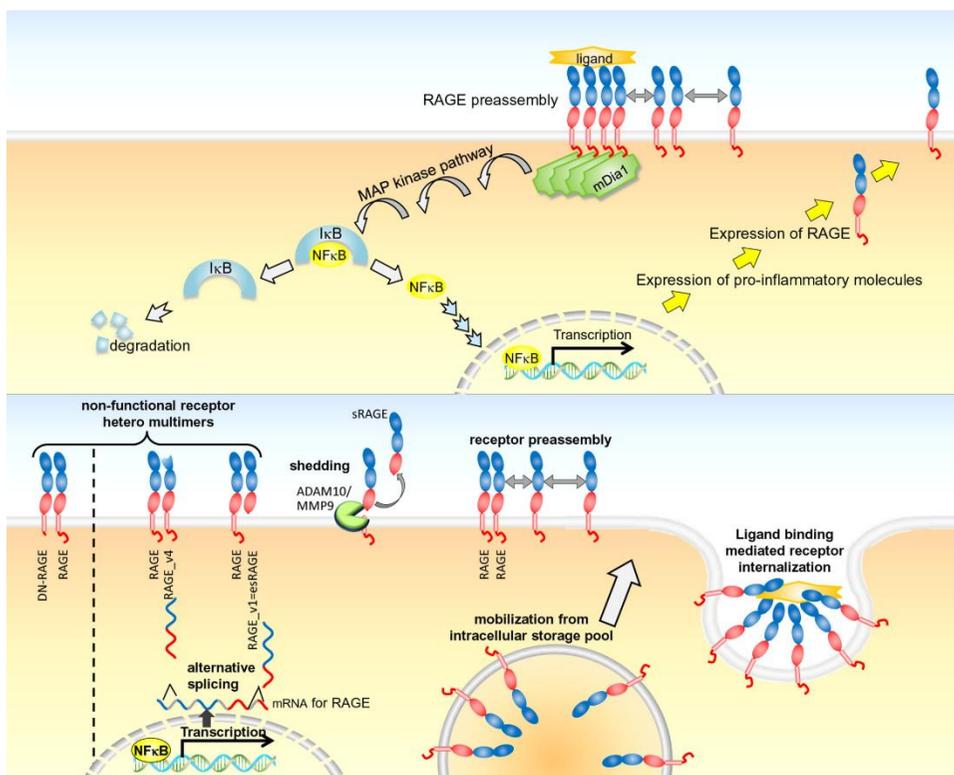


Figura 8. Activación y regulación de RAGE. Imagen tomada de [217]

3.2.5.2 Ligandos

Antes de unirse a sus receptores, los AGEs, son parcialmente eliminados por sistemas enzimáticos, el sistema proteasomal o bien, por las formas solubles de RAGE. Otros complejos de AGE-receptor (AGER), como AGER1/OST-48 y AGE-R3/galectina-3, así como algunos miembros de los receptores scavenger, también contribuyen a la desintoxicación al internalizar los AGEs para su degradación.

Además de los AGEs, el RAGE también regula los efectos de otros ligandos extracelulares, tales como proteínas de alta movilidad del grupo 1 (HMGB1 por su nombre en inglés *high mobility group box 1*), miembros de la familia de las S100/calgranulinas, fibras amiloides, péptido β -amiloide y productos avanzados de oxidación de proteínas (AOPPs) [217].

3.2.6 Vías de señalización de los AGEs

La activación de RAGE desencadena la generación de especies reactivas de oxígeno ROS y la activación de varias cascadas de señalización intracelular, como la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs por su nombre en inglés *mitogen-activated protein kinases*), ERK 1/2, p21ras, p38, Janus quinasa/Transductores de señal y activadores de proteínas de transcripción. (JAK/STAT por su nombre en inglés *transducers, and activators of the Janus kinase signal from transcription*), SAPK/JNK y la fosfoinositol 3 quinasa (PI3K). Esta activación a su vez induce la activación de factores de transcripción como NF- κ B, CREB, AP-1 y STAT3. Estos factores de transcripción promueven la proliferación celular, la inflamación, la angiogénesis y la apoptosis [171].

Los AGEs inducen la producción intracelular de ROS mediante varios mecanismos, como la disfunción mitocondrial y la activación de las NADPH oxidasas, así como la interacción redox entre ambos. Este aumento en la carga de ROS conlleva a la reducción de las enzimas antioxidantes y los niveles de GSH celular, lo que a su vez aumenta la expresión de la NADPH oxidasa, la óxido nítrico sintasa (NOS) y la ciclooxigenasa (COX) [213].

En consecuencia, la actividad de enzimas como la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa, así como otras defensas antioxidantes endógenas como el GSH y el ácido ascórbico disminuyen de manera indirecta. De hecho, el estrés oxidativo está estrechamente relacionado con la glicación, ya que la disminución de GSH también reduce la actividad

ANTECEDENTES

de la GLO-1, lo que aumenta las concentraciones de glicoxal y MGO, formados de manera no enzimática en la glucólisis, y conduce a la formación de los AGEs [224].

Estas alteraciones estimulan la infiltración de macrófagos, aumentan la expresión de citoquinas inflamatorias, moléculas de adhesión y proteínas de la ECM, lo que conduce a una sobreexpresión de TGF- β , fibronectina y colágeno. Este desequilibrio en el estado redox intracelular desencadena un mayor estrés oxidativo en el retículo endoplásmico, lo que provoca disfunción mitocondrial, altera la homeostasis redox y contribuye a la propagación del estrés oxidativo, desencadenando respuestas inflamatorias y activando la oxidación de LDL. Además, la expresión de RAGE se incrementa en respuesta a una retroalimentación positiva inducida por la activación de NF κ B a través del eje AGEs/RAGE. La inflamación sostenida impulsada por AGEs/RAGE/NF κ B y la activación del estrés oxidativo en cascadas de señalización desempeñan un papel importante en la patogénesis de las complicaciones diabéticas [213, 225].

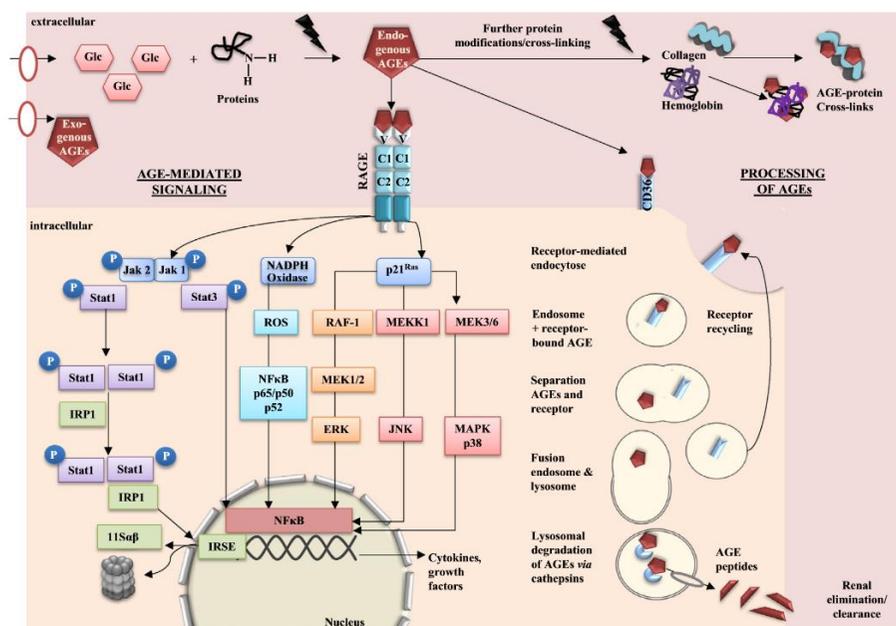


Figura 6. Señalización mediada por AGEs y desintoxicación de AGEs a través del sistema lisosomal. Imagen tomada de [171].

3.2.7 Patologías asociadas a los AGEs

La población mundial está experimentando un envejecimiento progresivo. La diabetes mellitus tipo 2 se ha convertido en uno de los

principales trastornos metabólicos, con una prevalencia creciente en este grupo demográfico. La formación y acumulación de AGEs aumenta con la edad y en condiciones de inflamación, acelerándose aún más en presencia de hiperglicemia prolongada. Los AGEs desempeñan un papel fundamental en la patogénesis de las complicaciones diabéticas, así como en trastornos musculoesqueléticos y neurodegenerativos [24, 189, 226].

3.2.7.1 Implicación de los AGEs en enfermedades neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas, como la AD, PD, la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedad de Huntington y la enfermedad priónica, entre otras, se caracterizan por la pérdida gradual y progresiva de neuronas, el daño en la red de conexiones sinápticas, así como por la acumulación de proteínas mal plegadas y/o agregadas en el cerebro [227].

Las enfermedades neurodegenerativas se consideran multifactoriales, observándose interacciones entre factores genéticos y no genéticos. Entre los factores no genéticos se encuentran el estrés oxidativo, las modificaciones postraduccionales, la pérdida de la proteostasis y disfunción mitocondrial. Todos estos factores pueden conducir a una disminución de la neurogénesis adulta, al mal plegamiento de proteínas y a la formación de inclusiones proteicas patogénicas, elementos clave en el desarrollo de estas enfermedades [228, 229].

Además, estudios recientes han revelado la participación de los AGEs en diversas consecuencias patológicas asociadas con el inicio de la neurodegeneración, tales como la alteración de la BHE, remodelación de la ECM, la neuroinflamación, el aumento del estrés oxidativo, la modificación de proteínas clave para la función neuronal y la activación de la vía RAGE [25].

3.2.7.1.1 Modificación de proteínas

La formación de entrecruzamientos moleculares de proteínas inducida por los AGEs conduce a un plegamiento incorrecto y a la formación de agregados proteicos tóxicos asociados con varias enfermedades neurodegenerativas. Los cuerpos de inclusión proteicos, como los cuerpos de Lewy en PD y las placas seniles en el caso de AD pueden ser modificados por los AGEs. Esta glicación potencia la neurotoxicidad de estas inclusiones. Por ejemplo, las placas seniles de

ANTECEDENTES

pacientes con AD contienen niveles elevados de AGEs y A β glicosados en comparación con los grupos de control [230]. Además, estudios muestran que los cerebros de pacientes con hiperglucemia y complicaciones de AD presentan niveles más altos de células con A β y Tau glicosados, lo que induce neurotoxicidad a través de la activación de RAGE y glucógeno sintasa quinasa-3 β (GSK3 β) [231].

La activación del RAGE regula la fragmentación de la proteína precursora de amiloide- β (APP) para generar A β , que sí puede atravesar la BHE. La interacción de A β con RAGE desencadena la activación de NF- κ B a través de la vía MAPK. En cultivos celulares primarios de neuronas, la activación de RAGE induce la producción de ROS y la activación de la vía de MAPK, seguida por la activación de Ras. En modelos murinos de AD, la inducción de NF- κ B mediada por A β /RAGE provoca alteraciones neuronales y neurotoxicidad, lo que resulta en una pérdida fatal de la función cerebral. En humanos, se ha observado un aumento en la expresión de RAGE en los cerebros de pacientes con AD [217, 232, 233].

El cerebro de los pacientes con PD presenta cuerpos de Lewy, compuestos principalmente por α -sinucleína, cuya glicosación agrava la neurotoxicidad. Esta glicosación genera pequeños oligómeros altamente tóxicos que inducen estrés oxidativo en las células neuronales. Tanto los oligómeros como las formas monoméricas glicosadas pueden generar ROS y causar estrés oxidativo [234-236].

La principal causa de la ELA suele ser mutaciones en la enzima superóxido dismutasa 1 (SOD1), lo que altera la homeostasis redox. Se ha observado un aumento en la glicosación de proteínas en pacientes con ELA que tienen la mutación SOD1 A4V y en ratones transgénicos con la mutación SOD1 G93A. Esta glicosación, específicamente en residuos de lisina 122 y 128, reduce la actividad enzimática y aumenta el estrés oxidativo. Además, la glicosación de SOD1, tanto en su forma normal como mutante, conlleva a la inactivación enzimática y formación de amiloides [237-239].

Los AGEs también modifican otras proteínas clave para mantener la homeostasis de los nichos neurogénicos, como las de la BHE y la ECM. Estas modificaciones impactan la neurogénesis al reducir la proliferación, supervivencia y diferenciación neuronal.

La integridad de la BHE es esencial para regular el acceso de sustancias y moléculas al tejido nervioso, manteniendo así la homeostasis del SNC. Está compuesta por células endoteliales microvasculares

humanas (HBMECs), microglía, astrocitos perivasculares y pericitos. Los capilares cerebrales están unidos de manera íntima, lo que hace que la pared interna sea impermeable debido a las proteínas ocludina y claudina en las HBMECs [240]. Los pericitos, por su parte, se adhieren a la membrana basal mediante la integrina $\alpha 1$. Estudios recientes han revelado que los niveles elevados de AGEs pueden reducir la expresión de ocludina y claudina entre otras (integrina $\alpha 1$, PDGF-R1 β y Conexina 43). Estos hallazgos sugieren que la hiperglucemia impacta negativamente en la función de la BHE, lo que se refleja en cambios macrovasculares y una mayor permeabilidad en pacientes diabéticos. Esto, a su vez, puede aumentar la respuesta inflamatoria y el riesgo de accidente cerebrovascular isquémico [241, 242].

La ECM es una red molecular compleja y dinámica que desempeña crucial en la homeostasis del SNC. Su composición y remodelación están reguladas por diversas enzimas, como las metaloproteinasas de matriz (MMPs por su nombre en inglés *matrix metalloproteinases*), que son fundamentales para regular la morfogénesis y la plasticidad neuronal. Se ha relacionado la alteración de la ECM, especialmente un desequilibrio entre MMPs e inhibidores de MMPs, con enfermedades neurodegenerativas [243]. Los niveles elevados de glucosa y los AGEs pueden aumentar la actividad de MMPs, el estrés oxidativo y la disfunción de la BHE [244, 245]. Los AGEs aumentan la activación de la MMP-9, que degrada el BDNF, y conduce a la inhibición de la vía de señalización del receptor neurotrófico de tirosina quinasa (TrkB), provocando así la apoptosis neuronal [246]. Además, los AGEs pueden afectar a la rigidez de la matriz de la ECM mediante la glicación del colágeno [247]. La deposición de proteínas tóxicas glicadas, como A β , α -sinucleína o TTR, también induce la remodelación de la ECM al afectar la regulación de la expresión de varias MMPs lo que resulta en consecuencias patológicas [248-250].

3.2.7.1.2 Neuroinflamación

Un mecanismo común en las enfermedades neurodegenerativas implica la activación del sistema inmunológico, especialmente de la microglía (los macrófagos residentes del SNC), y la acumulación de proteínas mal plegadas o agregadas en el cerebro. Estas proteínas, resistentes a la degradación proteolítica y mal plegadas debido a su acumulación, resultan citotóxicas en diversas enfermedades neurodegenerativas. Se ha observado que muchas de estas proteínas mal plegadas actúan como ligandos de RAGE [251].

ANTECEDENTES

La activación de RAGE por A β incrementa la expresión del factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) en las células neuronales, que al unirse a su receptor promueve la liberación de citoquinas proinflamatorias [252]. Además, otros ligandos de RAGE que se encuentran desregulados en condiciones de hiperglicemia, como el lipopolisacárido (LPS), S100/calgranulina, HMGB1, fosfatidilserina, *macrophage 1 antigen* (Mac-1/CD11b), componente de complemento proteico, C3a, están implicados la respuesta inflamatoria y afectan la fisiología neuronal normal [253].

La interacción entre RAGE y PECAM-1 facilita la migración de monocitos a través de la BHE, induciendo su disfunción debido a la respuesta inflamatoria. Mac-1 también contribuye a la adhesión de leucocitos en el cerebro [254]. La S100/calgranulina de la ECM también se une a RAGE activando NF- κ B, promoviendo la producción de citoquinas proinflamatorias y la migración de monocitos, neutrófilos y macrófagos (Xia et al., 2018). La unión de HMG1 con RAGE promueve la translocación a la superficie celular de TLR4, a través de la vía de señalización de MAPKs que amplifica la respuesta inmunitaria y conduce al daño neuronal y a la apoptosis [255].

Un estudio en ratones transgénicos con proteína precursora de amiloide mutada (mAPP) reveló un aumento significativo en la producción de citoquinas proinflamatorias, así como un incremento en la infiltración de microglía y astrocitos, y una carga aumentada de placas de A β . Estos hallazgos sugieren que RAGE desempeña un papel crucial al potenciar los efectos inflamatorios de la microglía, lo que resulta en la disfunción neuronal característica de AD. Además, la unión de A β a RAGE en la microglía activa vías de señalización que promueven la producción de citoquinas inflamatorias, contribuyendo a la respuesta inflamatoria exacerbada en esta enfermedad [256].

Las células de la microglía humanas activadas generan y liberan complejos de AGE-albúmina que aumentan la expresión de RAGE en las neuronas. Este incremento de RAGE en regiones como el córtex, hipocampo, cerebelo y sustancia negra promueve la muerte neuronal, contribuyendo así a los trastornos neurodegenerativos. Estudios en cultivos primarios de neuronas humanas han demostrado que la exposición AGE-albúmina activa la vía de señalización de MAPKs, en concreto de p-p38K, SAPK/c-Jun N-terminal protein kinase (JNK) y p-SAPK/JNK, pero no de pERK1/2 disminuyó. Estos resultados sugieren que

la AGE-albúmina induce la muerte neuronal a través de la activación de la vía MAPK [223].

3.2.7.1.3 Estrés oxidativo y apoptosis

La activación sostenida de los astrocitos y la microglía conduce a un estado crónico de estrés oxidativo que favorece la formación de AGEs. Estos activan el RAGE en células microgliales y neuronales, desencadenando un mayor estrés oxidativo, dando lugar a un círculo vicioso. Se ha demostrado que los AGEs pueden inducir apoptosis en diversas células cultivadas, como células microvasculares, neuronales, fibroblastos y células mesangiales renales. La interacción entre AGEs y RAGE desencadena la liberación de IL-8, lo que aumenta el nivel de calcio intracelular y activa la calcineurina, resultando en la defosforilación de NF-AT que se transloca al núcleo celular y activa la expresión de FasL [257, 258]. El aumento de FasL potencia la actividad de las caspasas y provoca la muerte celular. En otra investigación, se ha demostrado que niveles elevados de MGO aumentan la actividad de la proteína proapoptótica Bax y reducen la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 en células de neuroblastoma, y además afectan la integridad de las mitocondrias [259-261].

3.2.7.1.4 Déficit de enzimas redox y glioxalasa

El cerebro es particularmente vulnerable al daño oxidativo debido a su alta tasa de consumo de oxígeno y glucosa, así como a los niveles elevados de hierro redox-activo en ciertas regiones. Además, se postula que el cerebro contiene niveles relativamente bajos de antioxidantes como el GSH y la vitamina E, así como de enzimas antioxidantes como glutatión peroxidasa, catalasa y SOD. Todos estos factores contribuyen a un alto nivel de estrés oxidativo en el cerebro, lo que a su vez podría relacionarse con la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas [150, 262-264].

Un aspecto crucial de la neurodegeneración es la disminución de la eficiencia del sistema antioxidante, lo que reduce la capacidad para neutralizar las ROS. Se ha demostrado que la acumulación de AGEs disminuye la expresión de varios sistemas enzimáticos antioxidantes. Por ejemplo, se ha observado una disminución de la actividad de la catalasa, SOD1 y glutatión peroxidasa (GPx) en el plasma de pacientes con ELA familiar y esporádica [265]. La GPx también se inactiva por gliceraldehído, MGO y 3-DG [266].

ANTECEDENTES

La relación entre los AGEs y el sistema antioxidante total también se ha evidenciado en las enfermedades arteriales periféricas. Específicamente, se ha detectado un aumento en la pentosidina, acompañado de una disminución en los sistemas antioxidantes, incluida la vitamina E [267]. Los niveles de glutatión peroxidasa y SOD también disminuyeron en un modelo de encefalopatía diabética in vitro, utilizando células HT22 [268].

Además, se ha demostrado que la reducción de la actividad de las GLO está vinculada a la neurodegeneración. En etapas intermedias y avanzadas de AD, los pacientes muestran una disminución de los niveles GLO1, lo cual se ha relacionado con un aumento en la proporción GSSG/GSH, lo que podría empeorar la gravedad de la enfermedad. Esta disminución en los niveles de GLO1 conduce a una acumulación de compuestos carbonílicos en pacientes con PD y casos esporádicos y familiares de ELA [269-271].

3.2.7.1.5 Ruta poliol

En el sistema nervioso periférico, la glucosa sanguínea es absorbida por las células a través de transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT3 de manera independiente a la insulina. En condiciones normoglucémicas, la hexoquinasa convierte la glucosa celular en glucosa 6-fosfato y se metaboliza en piruvato por la glucólisis. Sin embargo, en condiciones de hiperglucemia, la saturación de la vía glucolítica aumenta el flujo de glucosa a través de la vía del poliol, que representa la primera y principal ruta adicional del metabolismo de la glucosa [167, 173].

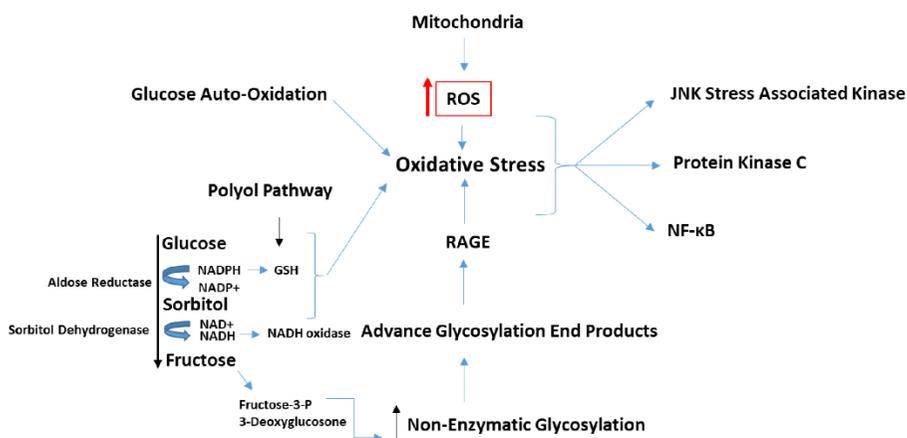


Figura 7. Estrés oxidativo inducido por hiperglucemia y sus implicaciones. Imagen tomada de [272].

En este proceso, inicialmente, la glucosa se convierte en sorbitol mediante una reducción catalizada por la aldosa reductasa, que depende de NADPH. Posteriormente, el sorbitol se oxida por la acción de sorbitol deshidrogenasa, dependiente de NAD, para generar fructosa. La fructosa resultante de la vía del poliol se metaboliza en fructosa-3-P, 3-DG y gliceraldehído, que son potentes agentes de glicación no enzimática. Además, la autooxidación de la glucosa produce H_2O_2 , O^{2-} , y OH^- , lo que contribuye al estrés oxidativo en las células. La acumulación AGEs, la diabetes y la hiperglucemia activan la vía del poliol, lo que puede tener efectos negativos adicionales en las células y tejidos debido al desequilibrio redox entre NADH y NAD⁺. La acumulación de sorbitol dentro de las células genera estrés osmótico y daño celular, lo que activa los AGEs y ROS. La activación de la proteína quinasa C (PKC) puede contribuir a la inflamación y al daño tisular en varias enfermedades [167, 272].

Se considera que la hiperactividad de la vía poliol es una causa principal de la neuropatía periférica diabética [273].

3.2.7.1.6 Efecto de los AGEs en la neurogénesis

La alteración de la neurogénesis adulta contribuye a diversas enfermedades humanas, incluidos los trastornos cognitivos y las enfermedades neurodegenerativas. [34].

La acumulación de AGEs en el organismo altera el microambiente de los nichos neurogénicos, afectando la regulación de la neurogénesis. En estudios *in vivo* con NSCs, se ha demostrado que los AGEs disminuyen la diferenciación neuronal y promueven la diferenciación hacia astrocitos activando la vía de señalización Notch-Hes1. La activación del receptor Notch mediante la unión de ligandos produce la liberación del dominio intracelular del receptor Notch (NICD), que migra al núcleo activando la transcripción de genes diana efectores de la vía, que inhiben la expresión de factores de diferenciación como *Ascl1* y *Neurog2* [274].

Otras investigaciones han relacionado los AGEs con la inhibición de la diferenciación de las NSCs [275, 276], con la reducción de la expresión de *Bcl-2* que activa la caspasa 3 y disminuye la viabilidad celular de las NSCs, así como con alteraciones en la defensa oxidativa y mitocondrial de las NSCs [277].

3.2.8 Estrategias terapéuticas para modular el eje AGE-RAGE

La modulación del eje AGE-RAGE ofrece oportunidades atractivas en el diseño de estrategias para combatir la progresión de enfermedades crónicas.

3.2.8.1 Cambios en el estilo de vida

La evidencia científica indica que adoptar cambios en el estilo de vida, como modificar la dieta, incrementar la actividad física y dejar de fumar, es una estrategia preventiva eficaz para diversas enfermedades, tanto relacionadas con la edad como no. Estas modificaciones pueden mejorar significativamente múltiples parámetros funcionales y fisiológicos [283, 284].

3.2.8.2 Intervenciones terapéuticas para modular el eje AGE-RAGE

La interacción entre AGEs y RAGE desencadena desequilibrios en la señalización celular, promoviendo el estrés oxidativo y activación de vías inflamatorias. Estas alteraciones influyen en la expresión génica y la producción de citoquinas proinflamatorias, lo que contribuye al desarrollo de enfermedades crónicas. Se han investigado diversas estrategias terapéuticas para modular el eje AGEs/RAGE [171].

La capacidad inhibitoria de la aminoguanidina sobre la formación de AGEs solo se ha demostrado en estudios con animales, pero no en humanos. Inhibidores de AGEs como la quercetina y la L-carnosina reducen los niveles de AGEs séricos y/o sus precursores en ensayos clínicos en humanos [285-288].

Los derivados de tiazolio, como el alagebrium y el bromuro de N-fenaciltiazolio, junto con los derivados de piridinio, como TRC4149 y TRC4186, han demostrado su eficacia rompiendo los entrecruzamientos de AGEs en modelos animales de diabetes, pero aún no se ha confirmado su eficacia en humanos [285].

Los antagonistas de RAGE como los anticuerpos anti-RAGE, sRAGE solo han demostrado efectos en modelos animales [289, 290]. Los inhibidores de RAGE como Azeliragon y FPS-ZM1, poseen potencial

ANTECEDENTES

neuroprotector, sin embargo, actualmente ninguno de los inhibidores o antagonistas de RAGE ha sido aprobado por la FDA [291, 292].

Los fitoquímicos, como la quercetina, el sulforafano, los iridoïdes, la curcumina, el fitato y el salvado de arroz, junto con enfoques moleculares, como los miRNA, los DNA-aptámeros y los RAGE-aptámeros, también destacan por su potencial para modular el eje AGE-RAGE. Sin embargo, solo la quercetina, el hexafosfato de mioinositol y el salvado de arroz han completado ensayos clínicos de fase I [287, 293-295].

Enzimas quimiopreventivas y antioxidantes pueden degradar los AGEs, como por ejemplo la lisozima, que contribuye a la eliminación de AGEs acelerando su excreción renal y suprimiendo la señalización intracelular mediada por AGEs [296].

El sistema de enzimas glicolíticas, que incluye glutatión reducido, GLOI y GLOII, desempeña un papel crucial en la desintoxicación de los AGEs. Estudios en células cultivadas y modelos animales han demostrado que la sobreexpresión de GLO1 está asociada con la inhibición del estrés oxidativo inducido por AGEs, mientras que la disminución de la expresión de GLO1 se relaciona con niveles elevados de acumulación de AGEs [271]

Además de las enzimas glicolíticas, diversos agentes terapéuticos han mostrado prometedores efectos en el aumento de la actividad de GLO1 y la regulación de su expresión. Por ejemplo, el candesartán, un medicamento sintético, y compuestos naturales como el resveratrol, la fisetina, el sulforafano y la cianidina han demostrado efectos beneficiosos en estudios preclínicos y ensayos clínicos iniciales [297-301].

Los ensayos clínicos respaldaron los efectos inhibidores de los AGE y/o antagonistas de RAGE de algunos fármacos antidiabéticos y antihipertensivos. Por ejemplo, la metformina reduce la acumulación de AGEs mejorando así los factores del envejecimiento fundamentales que subyacen a múltiples condiciones relacionados con la edad. La atorvastatina ha demostrado reducir los AGEs y la angiotensina-2, lo que podría tener efectos cardioprotectores [285, 302].

3.3 MEF2

3.3.1 La familia MEF2

El descubrimiento inicial de MEF2 se remonta a 1989, cuando se identificó como un factor nuclear que interactuaba con el potenciador del gen de la creatina quinasa, durante la diferenciación muscular. Sin embargo, su expresión no se limitaba al músculo, sino que se encontraba en una amplia variedad de tejidos, con una mayor expresión en músculo estriado y el cerebro, lo que sugería funciones más allá de la fisiología muscular. La expresión de MEF2 coincide con la activación de programas de diferenciación celular. Además, su alta conservación evolutiva y su papel crucial en procesos vitales, como la supervivencia, la diferenciación y la apoptosis lo convierten en un factor fundamental en la biología celular [303, 304].

Las proteínas MEF2 pertenecen a la familia de factores de transcripción que contienen el dominio MADS tipo II (Minichromosome Maintenance 1, Agamous, Deficiens and Serum Response Factor). En vertebrados, se han identificado cuatro genes MEF2: MEF2A, MEF2B, MEF2C y MEF2D, cada uno con funciones únicas y patrones de expresión distintos, aunque superpuestos durante el desarrollo embrionario y en los tejidos adultos [305, 306].

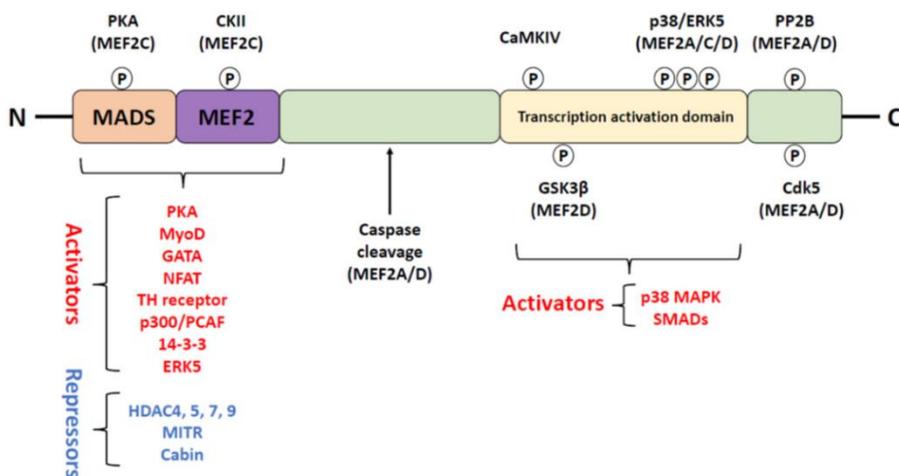


Figura 12. Regulación de MEF2. Imagen tomada de [307].

Las proteínas MEF2 de distintas especies comparten una secuencia muy similar en su extremo N-terminal, la cual incluye un dominio MADS

ANTECEDENTES

altamente conservado y un dominio MEF2 adyacente. Esta región desempeña un papel fundamental en el reconocimiento de las secuencias diana del DNA. El dominio MADS es el responsable de la unión al DNA, especialmente en secuencias ricas en A/T, y facilita la dimerización de MEF2, proporcionando sitios de interacción con el DNA y otros cofactores [9, 306]. Por su parte, la región C-terminal funciona como dominio de activación transcripcional. Esta región contiene zonas conservadas con sitios potenciales de fosforilación reconocidos por quinasas específicas, así como zonas con una alta diversidad entre las diferentes isoformas de MEF2. Esta variabilidad, resultado del *splicing* alternativo, confiere a cada isoforma una capacidad única para interactuar con diversos reguladores transcripcionales, modulando así su capacidad transcripcional.

3.3.2 Regulación

La actividad transcripcional de MEF2, caracterizada por su intrincada complejidad y multidimensionalidad, se encuentra regulada a través de diversos niveles: vías de señalización celular, interacciones con coactivadores y represores, *splicing* alternativo [308], degradación mediada por caspasas [309], modulación de la capacidad de unión al DNA [310], asociación con reguladores transcripcionales [311], translocación desde el núcleo al citoplasma [312] y diversas modificaciones covalentes, como fosforilación y sumoilación [308, 313-317].

3.3.2.1 Vías de señalización

Diferentes señales extracelulares desencadenan la activación de vías de señalización que convergen en MEF2. Éste a su vez, puede ser activado o reprimido o sufrir modificaciones en su estructura para finalmente influir en la expresión génica. Algunas de las vías de señalización que regulan MEF2 son: proteína quinasa A (PKA por su nombre en inglés *protein kinase A*), caseína quinasa II (CKII por su nombre en inglés: *casein kinase II*), la Ca^{2+} /calmodulina proteína quinasa II (CaMKII), proteína quinasa activada por mitógenos p38 (p38), ERK5, proteína fosfatasa 2B (PP2B), GSK3 β y Cdk5 [9, 318, 319].

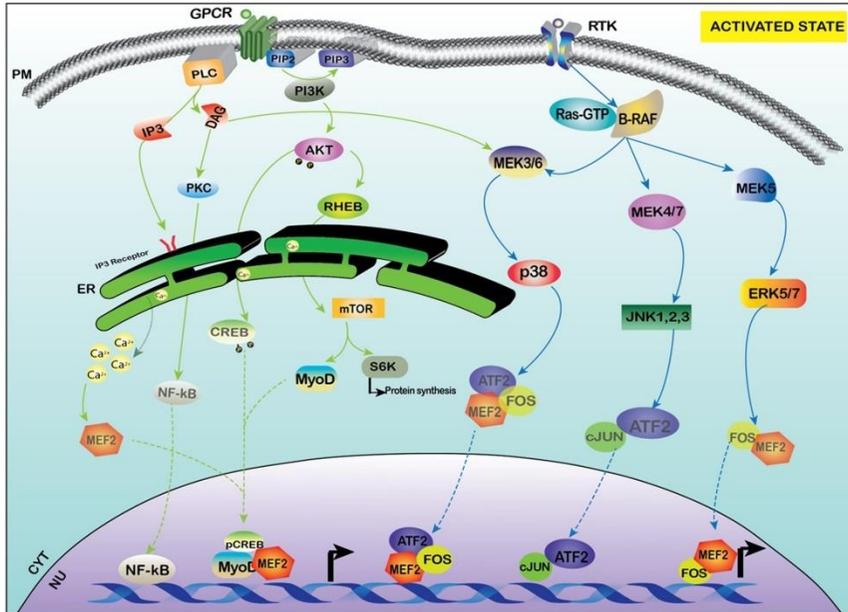


Figura 13. Vías de señalización implicadas en la modulación MEF2. Imagen tomada de [320].

Por ejemplo, la actividad transcripcional de MEF2 puede ser modulada directa o indirectamente por CaMKII. La despolarización desencadena un aumento en el flujo de Ca^{2+} , lo que a su vez activa a CaMKII. Esta última fosforila a HDAC5, promoviendo su unión a la proteína 14-3-3 y la disociación de MEF2. De esta manera MEF2 queda libre en el núcleo para unirse a coactivadores transcripcionales e iniciar la expresión de genes que promueven la supervivencia celular. En neuronas, la transcripción regulada por MEF2 es vital para la supervivencia y la plasticidad sináptica. Además, MEF2 desempeña un papel fundamental en la diferenciación muscular [321-324].

3.3.2.2 Activadores y represores

MEF2 puede interactuar con coactivadores como p300 y la proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc (CBP) y correpresores como las HDACs II y el mediador silenciador de ácido retinoico y receptor de hormona tiroidea (SMRT), entre otros [325-330].

Las HDACs de clase II ejercen su función represora uniéndose al dominio MADS de MEF2, lo que suprime su activación transcripcional. La activación de los receptores acoplados a proteínas G desencadena la fosforilación de las HDACs de clase II por diversas quinasas dependientes

ANTECEDENTES

del calcio. Esta fosforilación induce a la disociación de HDACs de MEF2 y su posterior exportación del núcleo celular. Por otro lado, la histona acetiltransferasa p300/CBP también se une al dominio MADS de MEF2, estableciendo un mecanismo tipo “interruptor binario”, donde los genes diana de MEF2 pueden ser activados o reprimidos según la interacción exclusiva de MEF2 con p300/CBP o las HDACs de clase II, respectivamente [313, 331, 332].

3.3.2.3 Fosforilación desfosforilación y modificaciones covalentes

Otro mecanismo de regulación de MEF2 se basa en la fosforilación y desfosforilación en distintos residuos de aminoácidos, lo que puede influir en su capacidad para unirse al DNA y su interacción con coactivadores y correpresores en la transcripción génica. Se han identificado múltiples sitios de fosforilación en el dominio de transactivación de MEF2, lo que refleja una regulación variada mediada por diversas quinasas y fosfatasa.

En neuronas corticales primarias, la fosforilación de Ser408/Ser444 de MEF2A/D por Cdk5, reduce su actividad transcripcional y promueve la apoptosis neuronal dependiente de Cdk5. El mecanismo subyacente no se comprende completamente, aunque se ha sugerido que la fosforilación de Ser444 favorece la sumoilación en el resto Lys403/439, lo que facilita su degradación mediada por caspasas. Por otro lado, la fosforilación de MEF2 por p38 MAPK o ERK5 en sitios distintos a Ser444 activa MEF2, promoviendo la supervivencia neuronal.

La fosforilación de MEF2D en los residuos Ser121 y Ser190 por PKA promueve la formación del complejo MEF2D-HDAC4, lo que conlleva a la inhibición de la diferenciación muscular. La fosforilación por GSK3 β de los residuos Thr145, Ser149 y Ser153 en el dominio de transactivación de MEF2D inhibe su actividad y promueve la apoptosis de las neuronas granulares en el cerebelo [124, 314, 333-338].

La desfosforilación representa otro punto de control esencial para la actividad transcripcional de MEF2. En la cascada de señalización de la CaMKII, uno de sus principales objetivos es la calcineurina (también conocida como fosfatasa 2B). Esta enzima juega un papel crucial en la regulación de diversas funciones neuronales, como la transmisión sináptica, la expresión génica, así como procesos cognitivos como la memoria y el aprendizaje [339-341]. La desfosforilación de MEF2, mediada

por calcineurina, en las neuronas del hipocampo en respuesta al aumento de la actividad neuronal, suprimió el número de sinapsis excitatorias, lo que podría afectar negativamente a la formación de la memoria [126]. También se ha evidenciado que mantener MEF2 en un estado hipofosforilado, bajo la regulación de calcineurina, potencia su capacidad de transactivación y su afinidad de unión al DNA. Estos aspectos son fundamentales para la supervivencia celular dependiente del calcio en las células granulares cerebelosas [310, 337, 342].

3.3.2.4 Degradación mediada por caspasas

En las neuronas granulares, se puede observar un ejemplo de degradación mediada por caspasas. Las isoformas MEF2A y MEF2D son esenciales para la supervivencia neuronal. Sin embargo, cuando estas neuronas se ven expuestas a una disminución en los niveles de potasio extracelular, entran en un proceso de apoptosis. Esta reducción de potasio induce la fosforilación de MEF2A y MEF2D, lo que a su vez disminuye su capacidad de unión al DNA. La escisión de los dominios N-terminales de estas isoformas por parte de la caspasa-3 es la responsable de esta disminución de la afinidad por el DNA. Como consecuencia, la actividad transcripcional de estas isoformas se ve reducida, lo que finalmente desencadena el proceso de apoptosis [309].

3.3.2.5 Localización celular

La localización celular también es un mecanismo que regula la actividad transcripcional de MEF2. En condiciones normales, MEF2D se localiza principalmente en el núcleo, donde regula la expresión de diversos genes. La actividad de MEF2D está modulada por la autofagia mediada por chaperonas, un proceso celular que degrada proteínas dañadas o innecesarias. En este proceso, la chaperona Hsc70 interactúa con MEF2D y lo transporta del núcleo al citoplasma para su degradación. El estrés celular puede alterar la localización subcelular y la actividad de MEF2D. Por ejemplo, la rotenona, una neurotoxina que induce la disfunción mitocondrial, provoca una sobreexpresión de MEF2D en el núcleo. Esta acumulación nuclear de MEF2D podría proteger a las células progenitoras dopaminérgicas del estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial.

En PD, los niveles de MEF2D en el citoplasma y el núcleo de las neuronas nigrales son menores en comparación con el grupo control. Esta disminución de MEF2D se asocia con la acumulación de agregados de α -

ANTECEDENTES

sinucleína, una proteína que se cree que es la principal causa de la muerte neuronal en esta enfermedad [343-345].

Las interacciones entre modificaciones postraduccionales y la participación de proteínas reguladoras generan un código único para la compleja regulación de la función de MEF2.

3.3.3 MEF2 en el SNC

Los cuatro genes de MEF2 se expresan en regiones cerebrales clave, tanto en etapas neonatales como adultas, donde desempeñan un papel crucial en procesos neuronales esenciales como el procesamiento de información, la formación de memoria y la coordinación motora [346].

Si bien las isoformas de MEF2 presentan patrones de expresión distintos en diferentes regiones del cerebro, siendo más abundantes en el cerebelo, la corteza cerebral y el hipocampo, también presentan una regulación única según la región cerebral o el tipo celular específico. Esta regulación diferencial sugiere que cada isoforma de MEF2 contribuye de manera específica a las funciones de la región cerebral en la que se expresa. La correlación entre la expresión de MEF2 y el desarrollo cerebral es particularmente evidente en el cerebelo. La expresión dinámica de MEF2 en esta región durante el desarrollo prenatal y postnatal está estrechamente ligada a la formación de las células de Purkinje, la migración neuronal y la arborización dendrítica, procesos cruciales para el correcto funcionamiento del cerebelo [304, 347-349].

MEF2 es fundamental para el desarrollo y funcionamiento óptimo del SNC, ya que regula la expresión de genes involucrados en la diferenciación, supervivencia y migración neuronal, así como en la orientación y poda de axones, y la formación y remodelación de neuritas [122, 125, 309, 334, 343, 350-355]. Además, los análisis de expresión génica identifican una amplia gama de genes regulados por MEF2 vinculados al desarrollo y la función de las sinapsis, así como a la excitabilidad neuronal [351, 356]. La disfunción de MEF2 se ha vinculado con varias enfermedades neurodegenerativas como AD, PD y ELA [307, 345, 357, 358].

3.3.3.1 Funciones de MEF2

Los factores de transcripción MEF2 desempeñan un papel crucial en la plasticidad cerebral, la capacidad del cerebro para adaptarse y

cambiar en respuesta a la experiencia. En estudios sobre la plasticidad de la corteza visual, se observó un aumento en la expresión de MEF2A, MEF2C y MEF2D tras eliminar la entrada retiniana. Esto sugiere que MEF2 participa en la respuesta adaptativa a la privación sensorial, un proceso esencial para la recuperación de la visión tras una lesión ocular. MEF2 también está involucrado en la metaplasticidad, la capacidad del cerebro para modular su propia plasticidad. Estudios en neuronas del tectum de *Xenopus laevis* demostraron que la estimulación visual induce cambios en las respuestas neuronales y la formación de dendritas, procesos que dependen de MEF2. Estos cambios en la plasticidad cerebral son esenciales para el aprendizaje y la memoria. MEF2A/2D se han identificado como reguladores clave de la respuesta neuronal a estímulos inductores de plasticidad, permitiendo cambios estructurales y funcionales en el cerebro. Los estímulos sensoriales pueden modificar los umbrales de plasticidad, lo que lleva a una rápida degradación de MEF2A/2D. Esta regulación temporal de MEF2 es fundamental para asegurar una plasticidad cerebral adecuada y evitar una adaptación excesiva o insuficiente a los estímulos externos.

Estos hallazgos subrayan la importancia de MEF2A/2D en la regulación de la plasticidad neuronal y sugieren que este factor de transcripción podría ser un objetivo terapéutico potencial para el tratamiento de enfermedades neurológicas relacionadas con alteraciones en la plasticidad neuronal, como AD, PD y las epilepsias. La modulación de la actividad de MEF2A/2D podría abrir nuevas vías para el desarrollo de tratamientos que mejoren la función cognitiva y la calidad de vida en pacientes con estas enfermedades [359-361].

La investigación en cultivos neuronales primarios ha consolidado la hipótesis de que los factores de transcripción MEF2 desempeñan un papel fundamental en la regulación de la supervivencia y diferenciación neuronal. Se ha demostrado que MEF2 actúa como una proteína antiapoptótica esencial para la supervivencia de las neuronas recién generadas, así como en la inducción de la diferenciación neuronal [124, 131, 309, 310, 321, 362].

La exposición a neurotoxinas, el estrés oxidativo o el glutamato en las neuronas granulares cerebelosas induce un aumento en la actividad nuclear de la quinasa Cdk5. Esta quinasa fosforila MEF2, inhibiendo así su función como factor de transcripción antiapoptótico. La muerte celular de las células PC12 puede ser inducida por la 6-hidroxidopamina y es mediada

ANTECEDENTES

por la reducción de los niveles de MEF2D, regulada por Cdk5 [334, 363, 364].

En modelos de PD, la pérdida de dopamina inducida por 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) está controlada por la inactivación de MEF2 mediada por calpaina-p35-p25/Cdk5. La activación de Cdk5 a través de la conversión de p35 a p25, resulta en la fosforilación de MEF2 en Ser 444, inactivando su función antiapoptótica. Esta inactivación de MEF2 contribuye a la muerte de las neuronas dopaminérgicas característica de PD [365].

La exposición de neuronas corticales primarias a concentraciones tóxicas de NMDA provoca la escisión de MEF2A y MEF2D mediada por caspasas. Esto produce formas truncadas de MEF2 que pueden bloquear la función de la forma completa de MEF2, conduciendo a la apoptosis. Esta escisión de MEF2A y MEF2D también contribuye a la muerte de las neuronas granulares cuando se encuentran privadas de soporte trófico [309, 335].

Los factores de transcripción MEF2 son activados por la p38 MAPK, y la vía MEF2-p38 MAPK desempeña un papel dual en la regulación de la apoptosis neuronal. Durante el desarrollo, esta vía es antiapoptótica, protegiendo a las neuronas recién generadas. Sin embargo, en las neuronas maduras bajo condiciones de estrés, la vía MEF2-p38 MAPK se vuelve proapoptótica, contribuyendo a la muerte celular [124, 366].

Si bien se sabe que la fosforilación de MEF2 por la p38 MAPK está involucrada en la regulación de la actividad de MEF2 dependiente de Ca^{2+} , aún no se han identificado completamente las dianas aguas abajo que median su papel en la supervivencia neuronal. Es de gran interés comprender cómo la actividad eléctrica, esencial para la supervivencia de neuronas jóvenes, afecta a la homeostasis de Ca^{2+} y la activación de las cascadas de señalización de Ca^{2+} , incluyendo la vía MEF2 [367].

En las células precursoras neuronales P19, la expresión de MEF2C desencadena un fenotipo mixto neuronal/miogénico. Durante la neurogénesis inducida por ácido retinoico en estas células, una forma dominante negativa de MEF2C aumenta la apoptosis, pero no afecta la división celular. Por otro lado, las células P19 que están programadas para experimentar apoptosis pueden ser rescatadas de la muerte celular mediante la expresión de MEF2C constitutivamente activo. Además, la sobreexpresión de MEF2C en células P19 induce la expresión de proteína

de neurofilamento, el antígeno nuclear NeuN y MASH-1, un factor de transcripción bHLH específico para neuronas que se sabe que interactúa con MEF2s. Estos hallazgos sugieren que las proteínas MEF2 no solo regulan el desarrollo neuronal al promover la supervivencia celular, sino también al inducir la diferenciación neuronal [124, 368].

Estudios in vitro con NSCs han demostrado que MEF2A/D juega un papel crucial en el desarrollo neuronal, desde la diferenciación de las NSCs hasta la supervivencia de las neuronas recién formadas. La importancia de los factores de transcripción MEF2 también se ha demostrado in vivo en estudios con animales [125, 369].

Estudios en ratones han demostrado que la eliminación específica en el cerebro de MEF2A/C/D conduce a una letalidad postnatal temprana y un aumento de la apoptosis neuronal. En un modelo de isquemia/reperfusión cerebral, el silenciamiento de MEF2D exacerbó la respuesta neuroinflamatoria y la lesión cerebral. Por el contrario, la sobreexpresión de MEF2D inhibió la activación de la microglía, redujo los niveles de citoquinas y protegió a las neuronas de la muerte por privación de oxígeno y glucosa al potenciar la activación de Nrf2. Estas observaciones sugieren que MEF2D juega un papel fundamental en la modulación de la respuesta inflamatoria y la neuroprotección en el contexto de la lesión cerebral isquémica [11, 370, 371].

Además, diferentes estudios sugieren que MEF2D juega un papel fundamental en la modulación de la respuesta inflamatoria y la neuroprotección en el contexto de la lesión cerebral isquémica. Este hecho abriría nuevas perspectivas para el desarrollo de estrategias neuroprotectoras en enfermedades neurológicas como el accidente cerebrovascular y otras afecciones caracterizadas por la muerte neuronal y la neuroinflamación [372, 373].

3.3.3.2 MEF2 en enfermedades neurodegenerativas

3.3.3.2.1 Parkinson

PD, el segundo trastorno neurodegenerativo más frecuente, se caracteriza por la pérdida progresiva y selectiva de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra, una región del cerebro fundamental para el control del movimiento. Esta pérdida neuronal conduce a una serie de síntomas motores que incluyen temblor, rigidez, bradicinesia (lentitud de movimientos) y alteración del equilibrio y la postura. A nivel celular, PD

ANTECEDENTES

se distingue por la presencia de inclusiones citoplasmáticas denominadas cuerpos de Lewy, compuestos principalmente por la proteína α -sinucleína. La acumulación y agregación de α -sinucleína en los cuerpos de Lewy se considera clave en el desarrollo de PD, aunque los mecanismos moleculares exactos que la desencadenan aún no se comprenden completamente. Más allá de la pérdida neuronal y los cuerpos de Lewy, PD también se caracteriza por una serie de alteraciones patológicas en el cerebro. Estas incluyen inflamación neurodegenerativa, disfunción mitocondrial, estrés oxidativo y alteraciones en el metabolismo de la dopamina. La interacción compleja de estos factores contribuye a la progresión de la enfermedad y a la aparición de síntomas no motores, como depresión, trastornos del sueño y problemas cognitivos [374, 375].

Diversos estudios han demostrado que el factor de transcripción MEF2 desempeña un papel crucial en PD, y su disfunción contribuye a la progresión de la enfermedad.

Una de las principales alteraciones observadas en PD es la reducción de la expresión mitocondrial de MEF2. Esta disminución se correlaciona con la regulación negativa de la proteína ND6, un componente crítico de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Además, se ha constatado un aumento de MEF2D en el citoplasma neuronal de pacientes con PD, asociado con niveles elevados de α -sinucleína y una forma oxidada de MEF2D [343, 376].

La disfunción de MEF2 en PD tiene diversas consecuencias negativas para la supervivencia neuronal y la función cerebral. La disminución de la actividad transcripcional de MEF2D, mediada por la quinasa Cdk5, disminuye la supervivencia neuronal, especialmente en el caso de neuronas dopaminérgicas. Esta disfunción también altera la respuesta inflamatoria de la microglía, lo que conduce a una neuroinflamación crónica que agrava el daño neuronal. La inhibición de MEF2D aumenta la toxicidad de la neurotoxina MPTP, un agente inductor de la degeneración neuronal en PD. Por el contrario, la mutación de MEF2D para evitar la fosforilación por Cdk5 protegió a las neuronas dopaminérgicas de la toxicidad inducida por MPTP en ratones. Estas observaciones sugieren que MEF2D podría constituir un objetivo terapéutico prometedor para PD [365, 377-381].

Varios compuestos como la crisina, T-006, salidroside, SU4312, TFP5 y danshensu, protegen las neuronas al modular la actividad de MEF2D. La polidatina aumenta la expresión de MEF2D mediante la

inhibición de GSK3 β . De manera similar, inhibe la neurotoxicidad inducida por MPTP al estimular MEF2D a través de la vía de señalización de la PI3-K/Akt/GSK3 β [372, 373, 382-386].

Además, se ha establecido una conexión entre la autofagia mediada por chaperonas (CMA, por su nombre en inglés: *chaperone-mediated autophagy*) y MEF2D, donde la interacción entre MEF2D y Hsc70, un regulador de la CMA dirige a MEF2D a los lisosomas para su degradación. La presencia de α -sinucleína interrumpe este proceso, lo que lleva a una acumulación de MEF2D en el citoplasma e inhibe su actividad. Estos hallazgos sugieren que la α -sinucleína interfiere con el proceso normal de recambio celular dependiente de la CMA, y que MEF2D puede ser responsable de su toxicidad y la patogénesis de PD. Los dímeros como el B3C (bis (3)-Cognitin), protegen a las neuronas dopaminérgicas de la citotoxicidad inducida por la α -sinucleína al mejorar la actividad de MEF2D (pero no de MEF2A) en condiciones basales, lo que sugiere que B3C podría también restaurar la actividad de MEF2 después de la citotoxicidad. Se ha descrito que B3C mejora los déficits conductuales en un modelo de ratón de PD, lo que indica una corrección de las disfunciones asociadas a MEF2D [343, 387-389].

3.3.3.2 Alzheimer

La AD es la enfermedad neurodegenerativa más prevalente, caracterizada por un deterioro cognitivo asociado con la pérdida neuronal y la formación de placas seniles y ovillos neurofibrilares en regiones cerebrales cruciales para el aprendizaje y la memoria. La acumulación de A β , y proteína tau hiperfosforilada son las principales características neuropatológicas de la AD [390, 391].

El factor de transcripción MEF2 desempeña un papel crucial en diversos aspectos de la AD, incluyendo la supervivencia neuronal, la neuroinflamación, la autofagia y la función cognitiva. A continuación, se presenta un análisis detallado del papel de MEF2 en cada uno de estos aspectos:

Supervivencia neuronal

El A β se genera a partir de la APP. Investigaciones recientes sugieren que la APP podría participar en la transducción de señales, y su disfunción podría tener efectos proapoptóticos. Varios estudios respaldan esta idea, como los que muestran que la sobreexpresión de la APP durante el estrés tiene un efecto protector contra la apoptosis en células

ANTECEDENTES

neuronales. Uno de los posibles mecanismos involucrados es que la APP puede fosforilar a MEF2 mediante la activación de la vía de señalización p38 MAPK, produciendo un aumento en la supervivencia neuronal [392].

Desde el punto de vista genético, AD es una enfermedad compleja y heterogénea. Ciertas mutaciones en la APP, presenilina-1 y presenilina-2, provocan una forma de la enfermedad de rápida progresión que suele manifestarse antes de los 65 años. No obstante, la mayoría de los casos corresponden a AD de inicio tardío, donde los síntomas aparecen después de los 65 años. El análisis genético de MEF2A ha revelado una asociación entre la mutación Pro279Leu en el exón 8 y AD de inicio tardío, sugiriendo así la implicación de MEF2 en el riesgo de desarrollar esta forma de la enfermedad [393].

Neuroinflamación

Recientemente, se ha identificado a MEF2A como el factor de transcripción de la proteína rica en cisteína e histidina (PINCH por su nombre en inglés *cysteine-histidine-rich protein*) en la neuroinflamación. PINCH es apenas detectable en neuronas sanas, su expresión se incrementa en enfermedades relacionadas con tauopatías, como AD. Durante la neuroinflamación, MEF2A regula la expresión de PINCH a nivel transcripcional a través de la cascada de señalización dependiente de Ca^{+2} , lo que afecta eventos relacionados con la maquinaria mitocondrial dependiente de la quinesina y el metabolismo neuronal [394].

La microglía tiene un papel crucial en el desarrollo cerebral, el mantenimiento del entorno neural durante el envejecimiento y los procesos de neurodegeneración. Una alta neuroinflamación inducida por activación excesiva o crónica de la microglía, es una característica destacada en la mayoría de las enfermedades neurológicas, como PD y AD. Las proteínas MEF2 también se expresan en células del sistema inmunológico, como células T, células B y microglía. En mamíferos, MEF2C es fosforilado por p38 MAPK en células de la línea mieloide, lo que resulta en una mayor transcripción de c-jun. MEF2D desempeña un papel protector en las neuronas al regular la neuroinflamación, aumentando la síntesis de interleucina 10 (IL-10) en la microglía y reduciendo el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), lo que contribuye a proteger contra la inflamación y la citotoxicidad. Además, MEF2D, regula la homeostasis inflamatoria en el SNC principalmente al controlar la vía de señalización del interferón tipo I [395, 396].

La microglía, al secretar agentes neurotóxicos, contribuye a la patología de AD. La deficiencia de MEF2C en la microglía puede aumentar la respuesta inflamatoria y afectar negativamente la función cognitiva en modelos de la enfermedad. La inhibición de la translocación nuclear de MEF2C en presencia de amiloide- β 42 oligomérico sugiere un papel clave en la activación microglial. Además, MEF2C regula el procesamiento de la APP y participa en la neuroprotección dependiente de la APP [392, 397-400].

Autofagia

El aumento en la metilación de la región potenciadora de MEF2A conduce a una reducción en su expresión lo que resulta en la disminución de genes relacionados con la autofagia y estrechamente ligados con AD [401]. Un estudio demostró que el ácido protocatecuico atenúa la autofagia inducida por el ácido okadaico a través de la vía de señalización Akt/GSK3 β /MEF2D [402]. En modelos de ratones transgénicos dobles APP/PS1, la galangina aumenta la expresión de MEF2D y Akt, y mejora los cambios patológicos observados en el hipocampo. Estos hallazgos sugieren que la lesión neuronal en esta área cerebral podría estar relacionada con la activación de la vía de señalización AKT/MEF2D/Beclin-1 [403].

Función cognitiva

La sobreexpresión MEF2C en áreas cerebrales típicamente relacionadas con el aprendizaje y la memoria sugiere otra posible contribución a los déficits cognitivos en AD [404].

3.3.3.3 MEF2 como diana terapéutica en enfermedades neurodegenerativas

La comprensión más profunda de las funciones de MEF2 en AD y PD podría conducir al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para estas enfermedades devastadoras. Las investigaciones futuras podrían centrarse en la modulación de la actividad de MEF2 para mejorar la supervivencia neuronal, reducir la neuroinflamación, promover la autofagia y restaurar la función cognitiva y motora

3.3.4 MEF2 en el músculo esquelético

El desarrollo y la regeneración del músculo esquelético dependen de procesos miogénicos complejos, en los que las células satélite quiescentes se activan y atraviesan una serie de etapas bien definidas.

ANTECEDENTES

Estas etapas incluyen la proliferación, la diferenciación, la fusión y la maduración, culminando en la formación de nuevas fibras musculares funcionales. MEF2 ejerce una función esencial en la regulación de la miogénesis, actuando como un regulador maestro que orquesta la expresión de genes cruciales para el desarrollo muscular.

En el tejido muscular, MEF2 se expresa ampliamente, a excepción de la isoforma MEF2B, que no está presente. Las otras tres isoformas de MEF2 se expresan con patrones temporales y tisulares específicos y coordinados durante el desarrollo del músculo esquelético, lo que sugiere un papel conjunto en la regulación de la diferenciación y regeneración muscular. MEF2 es un componente fundamental en una red de factores de transcripción que regula tanto genes estructurales musculares como factores de transcripción miogénicos [306, 313, 405-407].

3.3.4.1 Diferenciación muscular

La diferenciación celular muscular comienza con la expresión de los factores reguladores miogénicos (MRFs por su nombre en inglés *myogenic regulatory factors*) (*myogenic regulatory factors*): factor miogénico 5 (Myf-5 por su nombre en inglés *myogenic factor 5*), proteína de determinación de los mioblastos (MyoD por su nombre en inglés *myoblast determination protein*), factor específico regulador del músculo 4 (Mrf-4 por su nombre en inglés *muscle-specific regulatory factor 4*) y miogenina [408].

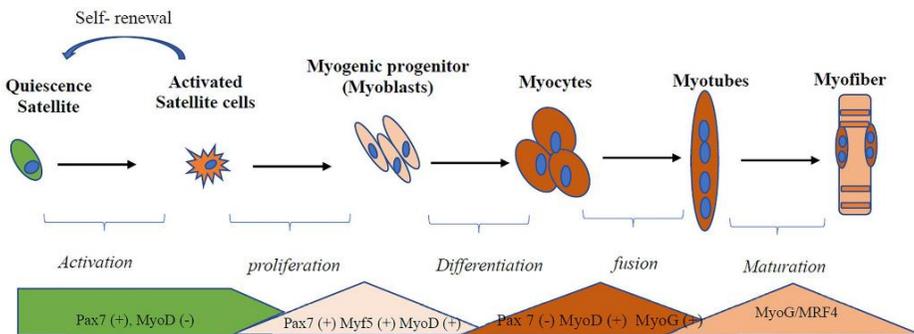


Figura 9. Activación y diferenciación de las células satélite del músculo esquelético. Imagen tomada de [409].

Los factores MEF2, aunque no poseen actividad miogénica por sí solos, en combinación con los MRF regulan directamente la expresión de una amplia gama de genes estructurales musculares, así como otros factores de transcripción que propagan y amplifican las señales iniciadas por los MRF [410, 411].

Muchos genes específicos del músculo esquelético, como la creatina quinasa muscular, la miogenina y la desmina, contienen sitios MEF2 en sus promotores, esenciales para su expresión y regulación durante la miogénesis [412-414].

MEF2 también interactúa con otros factores de transcripción para regular el desarrollo muscular adecuado. Por ejemplo, la proteína similar a *Mastermind 1*, (MAML1) interactúa con MEF2C y mediatiza la comunicación entre la señalización Notch y MEF2 en la regulación de la diferenciación miogénica. Además, MEF2 se ha implicado en la regulación de la supervivencia de los miocitos esqueléticos a través de una vía dependiente de CREB [415, 416].

MEF2 regula la expresión de genes miogénicos, como la miogenina, junto con otros genes que codifican factores de transcripción, creando un ciclo de retroalimentación positiva que perpetúa y amplifica la diferenciación celular. Durante la embriogénesis de ratón, MEF2C regula positivamente su propia expresión, lo que concuerda con la autorregulación de MEF2 en *Drosophila*. Además, MEF2C induce la expresión de HDAC9, creando un bucle de retroalimentación negativa que modula su propia actividad. Este mecanismo permite que los programas génicos regulados por MEF2 respondan a señales externas mediante la fosforilación regulada de las HDAC de clase IIa [331, 411, 413, 414, 417-419].

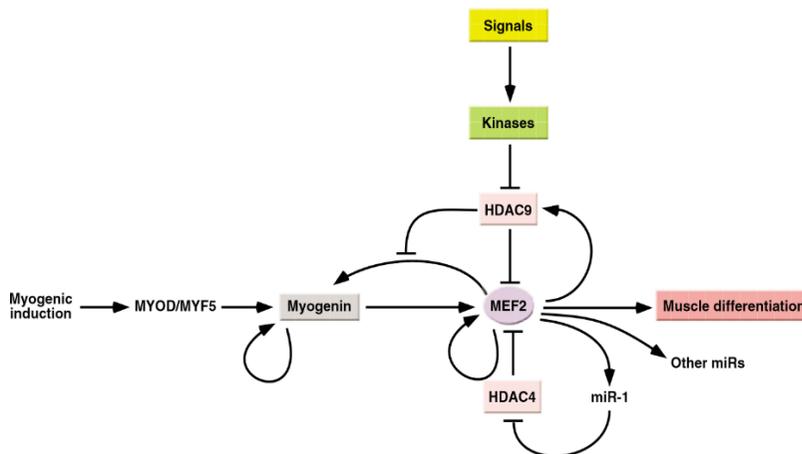


Figura 10. MEF2 en la miogénesis. Imagen tomada de [420].

ANTECEDENTES

MEF2 amplía la regulación miogénica al modular la expresión de miRNAs como miR-1 y miR-133. Recientemente, se han identificado varios miRs que impactan en la diferenciación y proliferación del músculo esquelético. miR-1 dirige HDACs de clase II (como HDAC4) para establecer un mecanismo de retroalimentación positiva que activa a MEF2 y promueve la diferenciación del músculo esquelético. Esta regulación, al potenciar la actividad de MEF2, contrarresta la represión HDAC9 sobre MEF2, demostrando así los mecanismos multifacéticos que existen para su modulación. Estos bucles regulatorios están sujetos a un control diferencial durante varias etapas del desarrollo del músculo esquelético y la remodelación muscular postnatal [421-426].

A pesar de la extensa investigación realizada sobre MEF2 en el músculo esquelético *in vitro*, se conoce relativamente poco sobre sus roles en el músculo esquelético de vertebrados *in vivo*. Durante la embriogénesis del ratón, el desarrollo del músculo esquelético se inicia en el miotomo, donde MEF2C es el primer gen que se expresa, seguido por MEF2A y MEF2D aproximadamente un día después [405].

La eliminación de MEF2A o MEF2D en ratones apenas influye en el desarrollo del músculo esquelético. Sin embargo, la eliminación selectiva de MEF2C en este tejido provoca anomalías estructurales en las miofibrillas desde la etapa perinatal, y algunos de estos ratones sobreviven hasta la edad adulta con alteraciones en el tipo de miofibrillas esqueléticas y la formación de sarcómeros. Además, ratones *knock-out* MEF2D también muestran cambios en la distribución del tipo de miofibrillas esqueléticas. En cultivos celulares, la formación de miotubos no se ve afectada por la delección de MEF2B, C o D, ya sea de forma individual o combinada, pero si se altera al eliminar MEF2A. Sin embargo, la sobreexpresión de MEF2 no induce una diferenciación prematura del músculo esquelético, lo que sugiere que MEF2 no es suficiente para inducir la diferenciación muscular. Estos hallazgos destacan el papel fundamental de MEF2 en la preservación de la integridad del sarcómero y en la maduración postnatal del músculo esquelético [327, 420, 427, 428].

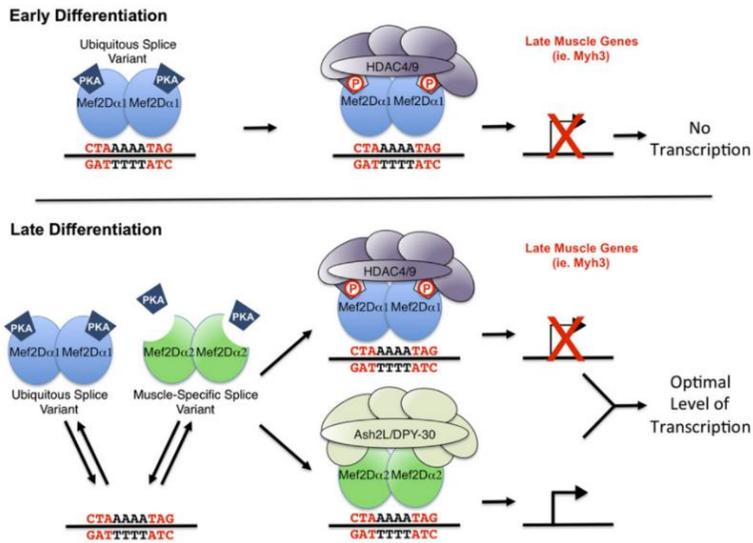


Figura 11. Regulación de la miogénesis mediante el splicing alternativo de MEF2D. Imagen tomada de [429].

En el músculo esquelético existen dos isoformas de MEF2D, Mef2Dα1 y Mef2Dα2. Durante las primeras etapas de diferenciación, la isoforma ubicua de Mef2D (Mef2Dα1) se expresa casi exclusivamente. Mef2Dα1 es fosforilado por PKA, lo que conduce al reclutamiento de HDAC4/9 de clase II a los promotores musculares para mantener un estado de represión transcripcional. En etapas posteriores de la diferenciación, el splicing alternativo de los transcritos de Mef2D da origen a una segunda isoforma de Mef2D (Mef2Dα2). La isoforma Mef2Dα2, que no puede ser fosforilada por PKA porque carece de un residuo S121, compite con Mef2Dα1 por la unión a los genes objetivo. Mientras que la unión de Mef2Dα1 fosforilada por PKA conduce al reclutamiento de HDACs de clase II para reprimir el promotor, Mef2Dα2 conduce al reclutamiento de complejos Ash2L a los promotores musculares para activar la expresión génica. Esta competencia resultaría en un intercambio dinámico continuo de factores de transcripción Mef2D represores y activadores, que se propone actúe como un reóstato para asegurar un nivel óptimo de transcripción que medie la formación de miotubos funcionales [429].

3.3.4.2 Fusión miogénica

La estructura y dinámica del citoesqueleto en células musculares son fundamentales para una fusión celular adecuada. MEF2 regula la transcripción de genes que codifican proteínas esenciales para la remodelación del citoesqueleto durante la miogénesis [430-432].

ANTECEDENTES

La supresión de MEF2A en cultivos de mioblastos provoca defectos en la diferenciación muscular y reduce los niveles de MyoD, mioferlina (Myof), palladinina (Palld) y proteína de unión a formina (Fnbp1l). La mioferlina es vital para la reparación de la membrana sarcolemal en el sitio de fusión de los mioblastos, y su deficiencia impide esta fusión. Palladina (Palld) y la proteína de unión a formina (Fnbp1l) son moléculas de remodelación asociadas a la actina que desempeñan funciones esenciales en la señalización mediada por actina, necesaria para la diferenciación miogénica y la fusión de los miotubos. La pérdida de cualquiera de estas proteínas conduce a un fenotipo deficiente en fusión en la diferenciación. Aunque la expresión de estos genes no se anula por completo anulada con la eliminación de MEF2A, la disminución colectiva de estos genes puede contribuir a una diferenciación defectuosa [431].

Otro estudio demostró que un cofactor de MEF2, CF2 (factor coriónico 2 de *Drosophila*), está implicado en el control del tamaño muscular y del número de núcleos en las miofibras [433].

La regulación de la fusión de miocitos en miotubos está regulada por el eje complejo HDACs de clase IIa/MEF2. La actividad transcripcional de MEF2 está regulada por la fosforilación reversible de HDAC4, controlada por la interacción entre las quinasas miogénicas y la fosfatasa PP2A-B δ . En los mioblastos en proliferación, la baja actividad de las quinasas miogénicas resulta en una mínima fosforilación de HDAC4, permitiendo su unión a MEF2 y a la supresión de la transcripción. Al inicio de la miogénesis, la fosforilación elevada de HDAC4 ocurre debido a la activación de las quinasas de HDAC4 por señales miogénicas extracelulares y a la baja actividad de PP2A B δ debido a la presencia de I1/I2-PP2A. La hiperfosforilación de HDAC4 promueve su disociación de MEF2 y la activación de genes regulados por MEF2, incluidos los efectores de los programas de diferenciación y reguladores del citoesqueleto (por ejemplo, ArgBP2). A medida que la diferenciación progresa, la actividad de las quinasas miogénicas disminuye y los niveles de I1/I2-PP2A disminuyen, permitiendo que PP2A-B δ se active y desfosforile a HDAC4 disminuye, restableciendo así la represión de MEF2 y terminando así la diferenciación. Este proceso garantiza un equilibrio adecuado entre los factores de transcripción que regulan la diferenciación y la fusión de los mioblastos [434].

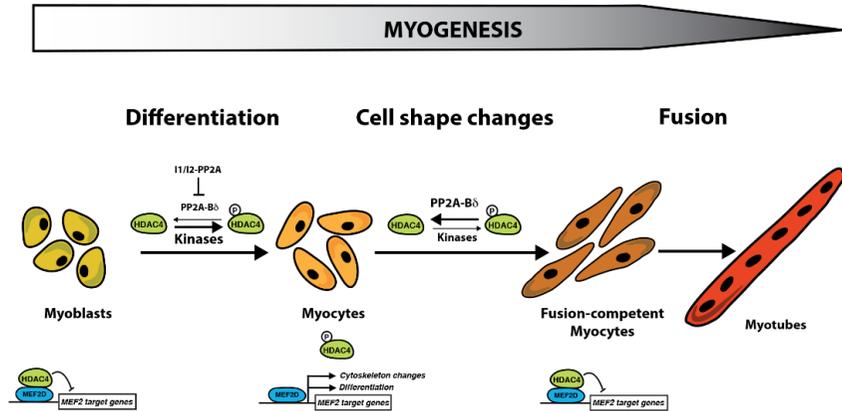


Figura 17. Regulación de la fusión de miocitos por la vía de señalización PP2A Bδ/HDAC4/MEF2. Tomada de [434].

3.3.4.3 Regeneración muscular

Tras una lesión muscular, la actividad MEF2 se incrementa significativamente. La eliminación simultánea las tres isoformas de MEF2 compromete la capacidad de regeneración muscular, impidiendo el completo proceso de diferenciación. Este hallazgo evidencia la existencia de redundancia funcional entre las isoformas de MEF2[406, 431, 435, 436].

3.3.4.4 Tipo de fibra muscular

MEF2 desempeña un papel clave en la determinación del tipo de fibra muscular, como se evidencia por su capacidad para activar específicamente al elemento regulador ascendente *slow* (SURE, por su nombre en inglés *slow upstream regulatory element*). La coactivación por PGC-1α potencia la actividad de MEF2, favoreciendo la transición hacia fibras tipo I. El ejercicio físico aumenta la actividad de MEF2, sugiriendo una mayor conversión hacia fibras oxidativas de Tipo I. Además, la ausencia de MEF2C o MEF2D reduce significativamente la formación de fibras de Tipo I, lo que resalta la importancia de estos factores en el mantenimiento del fenotipo muscular oxidativo [420, 437-439].

3.3.4.5 MEF2 en enfermedades musculoesqueléticas

El músculo esquelético, que constituye aproximadamente el 40 % de la masa corporal y actúa como principal reservorio de proteínas, desempeña un papel fundamental en el metabolismo energético y la

ANTECEDENTES

movilidad. La masa muscular se mantiene mediante un equilibrio entre la síntesis y degradación de proteínas, procesos sensibles a factores como el estado nutricional, el equilibrio hormonal, la actividad física, así como lesiones o enfermedades entre otros.

Más allá de su función contráctil, el músculo esquelético, participa en la captación, utilización y almacenamiento de sustratos metabólicos, como glucosa, lípidos y aminoácidos. La contracción muscular es esencial para no solo para la movilidad, sino también para mantener la homeostasis metabólica a nivel orgánico y sistémico. Comprender cómo el músculo regula las vías metabólicas es esencial para prevenir y tratar enfermedades musculares. La diabetes y la atrofia muscular, que pueden surgir debido al envejecimiento, el cáncer, el SIDA o la inactividad física son particularmente relevantes en este contexto [440].

Diversas condiciones fisiopatológicas pueden afectar la estructura y morfología del músculo esquelético. La pérdida de masa y fuerza muscular se conoce como atrofia muscular, la cual puede originarse por diversos factores hereditarios o adquiridos. Entre las causas hereditarias se encuentran las miopatías mitocondriales y congénitas y las distrofias musculares como Duchenne, Becker y miotónicas. La atrofia muscular adquirida es causada por el envejecimiento, la desnutrición, medicamentos, inmovilización, inactividad física o una amplia gama de enfermedades como cáncer, SIDA, diabetes, obesidad, insuficiencia cardíaca, trastornos neurodegenerativos, sepsis, quemaduras y traumatismos [440, 441].

La atrofia muscular puede tener consecuencias negativas en la salud y la calidad de vida, reduciendo la capacidad para realizar actividades cotidianas y prolongando el tiempo de recuperación de enfermedades. Además, está relacionada con una mayor prevalencia de enfermedades crónicas como la diabetes mellitus tipo 2, enfermedades cardiovasculares y depresión e incluso una mayor mortalidad. Por lo tanto, comprender y prevenir la atrofia muscular tiene un papel crítico en la salud humana [442].

Dada la importante carga financiera y social que la atrofia muscular esquelética puede representar, es crucial contar con un sistema efectivo de tratamiento y prevención. Actualmente, las estrategias terapéuticas para la atrofia muscular incluyen ejercicio físico, suplementos nutricionales, medicamentos y otros métodos. Sin embargo, hasta la fecha, no se han desarrollado estrategias terapéuticas para el tratamiento

de esta afección. Por lo tanto, es fundamental profundizar en la comprensión de los mecanismos subyacentes y descubrir nuevos objetivos y medicamentos para combatir la atrofia muscular [441-443].

Sarcopenia

Durante el proceso de envejecimiento, se observa una disminución en la actividad de las células satélite, lo que se traduce en una reducción en su capacidad de proliferación y diferenciación. Esto puede contribuir a una capacidad regenerativa muscular disminuida y a la aparición de atrofia muscular [444, 445].

Las fibras musculares liberan una serie de miocinas/pequeñas vesículas extracelulares para regular el metabolismo en el músculo y en los tejidos extramusculares, actuando de manera autocrina, paracrina y endocrina durante la atrofia muscular [446-448].

Durante el envejecimiento y la sarcopenia se produce una sobreexpresión de miR-690, que se encuentra encapsulado en pequeñas vesículas extracelulares y es liberado por las miofibrillas. El miR-690 inhibe la capacidad miogénica de las células satélite e induce la atrofia muscular, probablemente debido a la reducción en la expresión de MEF2C, un objetivo directo de miR-690. MEF2C es un modulador bien establecido de la homeostasis y la hipertrofia de las miofibras, desempeñando un papel vital en la integridad y el mantenimiento muscular. Estudios adicionales han demostrado que la atrofia por denervación puede ser inhibida por MEF2 activado y que MEF2 puede restaurar el tamaño de las fibras en músculos atroficos [449].

Las chaperonas, como HSPB7, desempeñan un papel crucial en la protección celular frente a diversas situaciones de estrés. En el músculo esquelético, HSPB7 desempeña un papel crucial en la regeneración muscular, la diferenciación de mioblastos, la distrofia muscular y durante el envejecimiento. Su expresión aumenta durante estos procesos, destacando su importancia en la salud muscular. HSPB7 está bajo el control de MEF2A [432, 450, 451].

La deficiencia de HSPB7 causa miopatía progresiva, asociado con la desorganización miofibrilar y defectos en el sarcolema. La función protectora de HSPB7 se basa en su interacción con filamina C dimerizada (FLNC), una proteína crucial para el desarrollo y la función muscular. La disminución de HSPB7 provoca la agregación anormal y mala localización de FLNC, lo que a su vez conduce a defectos en la miogénesis. Esta

ANTECEDENTES

alteración se debe a la desestabilización de la membrana celular y el debilitamiento de la estructura del sarcómero. Estas interrupciones, en conjunto, contribuyen al desarrollo de sarcopenia. Además de su papel estructural, la agregación anormal de FLNC inducida por la deficiencia de HSPB7 podría activar la autofagia mediada por chaperonas, un proceso celular de degradación de componentes dañados [450].

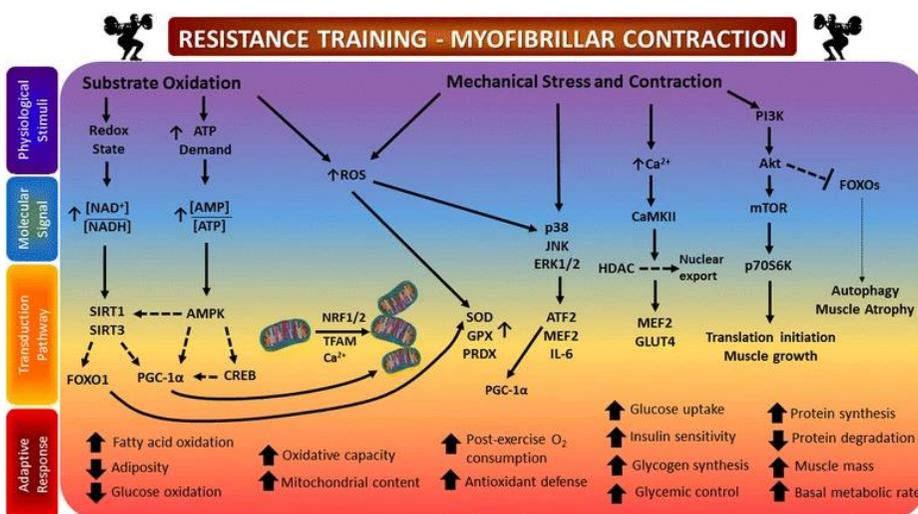


Figura 12. Estimulación fisiológica y vías de señalización molecular inducidas por el entrenamiento de resistencia, y sus respuestas adaptativas a nivel molecular. Imagen tomada de [452].

El músculo esquelético desempeña un papel fundamental en la sensibilidad a la insulina, la alteración de su señalización puede desencadenar atrofia muscular, lo que se asocia con una disminución de la capacidad funcional y debilidad muscular. Dado que el transporte de glucosa es un componente crítico de la respuesta a la insulina, se ve afectado por la expresión y translocación de GLUT4. Modular estos mecanismos podría ser una estrategia viable para combatir la resistencia a la insulina.

La investigación sobre los eventos moleculares que regulan la expresión de GLUT4 ha revelado que esta depende de la actividad transcripcional de MEF2. Estudios iniciales del promotor de GLUT4 identificaron un sitio de unión de MEF2 entre las posiciones -463 y -473, necesario para la expresión normal de GLUT4. Se ha determinado que las isoformas de MEF2 responsables de la correcta expresión de GLUT4 son el heterodímero MEF2A/MEF2D. Además, la expresión de GLUT4 también depende de la cooperación entre MEF2, MyoD, la hormona tiroidea y el

factor potenciador de GLUT4 (GEF), que se une 300 pares de bases aguas arriba del sitio de MEF2 [453-457]

El músculo esquelético, además de influir en el transporte de glucosa, también ejerce su efecto sobre la captación y oxidación de lípidos y la plasticidad del músculo esquelético. La contracción muscular impulsada por el ejercicio físico, desencadena una cascada de eventos moleculares que involucran la liberación de Ca^{2+} y la activación de CAMKII, cuyos objetivos son CREB, MEF2 y HDACs, implicados en la regulación de la expresión génica del músculo esquelético [458].

La activación de CAMKII provoca la fosforilación de HDAC4 y HDAC5 por PKD y su exportación desde el núcleo, lo que resulta en una mayor actividad de MEF2 y un aumento en la expresión de GLUT4 [459-461].

Además, la contracción muscular aumenta el crecimiento y la diferenciación muscular mediante de la activación de la vía Akt-mTOR. Además, mTOR modula negativamente a los miembros de la familia FOXO, reduciendo así la autofagia y la atrofia muscular [458].

La señalización de calcio inducida por la contracción muscular activa a los factores de transcripción MEF2 y NFATc, que regulan la expresión de genes involucrados en el mantenimiento de la masa muscular y el tipo de fibra oxidativa, entre ellos PGC-1 α [462].

La generación de energía en el músculo esquelético se realiza principalmente a través de dos vías: la fosforilación oxidativa (fibras tipo I y IIa) y la glucólisis (fibras tipo IIb y IIx). PGC-1 α juega un papel crucial en la regulación de la fosforilación oxidativa en las fibras tipo I, impulsando la biogénesis mitocondrial y la expresión de genes clave para este proceso. PGC-1 α también desempeña un papel importante en la prevención de enfermedades metabólicas como la atrofia muscular y la diabetes tipo II. En la diabetes, la expresión de PGC-1 α se ve reducida en el músculo esquelético, lo que contribuye a la disfunción mitocondrial y la disminución de la capacidad de captación de glucosa [463].

El factor de transcripción MEF2 actúa en conjunto con PGC-1 α para regular la expresión de genes relacionados con la producción de energía y el metabolismo. MEF2 regula directamente la expresión de PGC-1 α y también puede cooperar con él para aumentar la expresión de genes clave como GLUT4, responsable de la captación de glucosa [464]. El mantenimiento de la homeostasis de la glucosa es crucial durante la

ANTECEDENTES

regeneración del músculo esquelético, debido a que la activación de las células satélite involucra un cambio metabólico hacia la glucólisis [465].

Estudios en músculo diabético humano han demostrado que la disminución de la expresión de genes regulados por PGC-1 α está asociada a la progresión de la enfermedad. Además, se ha observado que PGC-1 α puede potenciar la actividad transcripcional de MEF2, lo que sugiere un papel indirecto de MEF2 en la diabetes tipo II [466, 467].

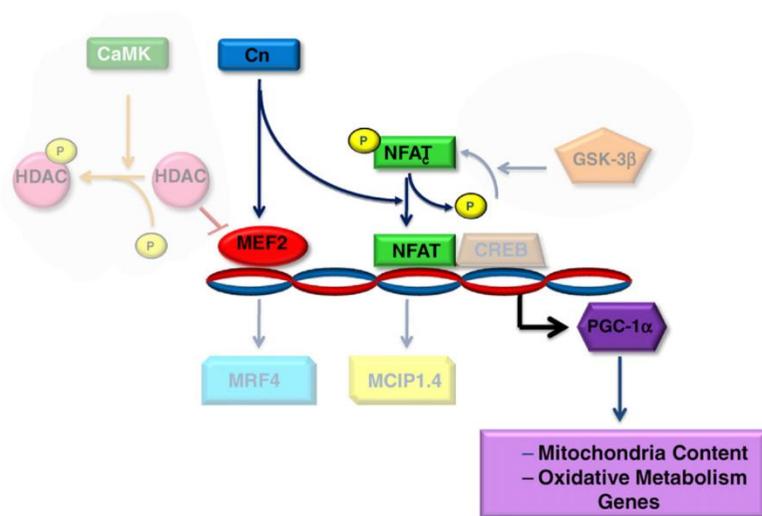


Figura 13. MEF2 actúa en conjunto con PGC-1 α para regular la expresión de genes relacionados con la producción de energía y el metabolismo [466].

En los pacientes con diabetes tipo 2, la sobreproducción de AGEs, tanto en el hígado como en el músculo esquelético, desencadena una serie de eventos moleculares que impactan negativamente en la miogénesis. Uno de los mecanismos clave implica la activación de la proteína de unión al elemento de respuesta a los esteroides 1-c (SREBP-1c, por su nombre en inglés *sterol regulatory element-binding protein-1c*) [468, 469].

SREBP-1c regula la transcripción de los MRFs responsables de la miogénesis y la composición de las fibras musculares. La sobreexpresión de SREBP-1c inhibe la diferenciación de miotubos e induce atrofia muscular. Se ha observado que la expresión de MRFs y de proteínas estructurales musculares, como la cadena pesada de miosina (MHC), está estrictamente regulada por la modulación de la actividad de SREBP-1c en ratones. Los AGEs derivados de la fructosa disminuyen la expresión de MyoD y MEF2C, mientras que aumentan la expresión de miogenina. Estas alteraciones en la expresión de MRFs se asocian con un cambio en la

composición de las fibras musculares, favoreciendo la formación de fibras glucolíticas menos eficientes y resistentes a la fatiga [470-472].

Además, RAGE que se sobreexpresa transitoriamente en el músculo lesionado, regula positivamente la diferenciación de mioblastos al aumentar directamente la expresión de miogenina. Sin embargo, esta exposición crónica a AGEs puede conducir a una desregulación de RAGE exacerbando el daño celular [473].

Los AGEs podrían estar involucrados en la reprogramación de proteínas musculares a través de la activación de SREBP-1c y la inducción de RAGE [474].

Niveles elevados de Activina A (ActA), han sido asociados con caquexia inducida por cáncer. ActA induce la atrofia en células musculares humanas, lo que resulta en una disminución del contenido de MyHC- β /lenta, la principal isoforma de miosina en estas células. Se ha observado que ActA inhibe tanto la expresión como la actividad de MEF2C, uno de los principales reguladores de la expresión de MYH7, el gen que codifica MyHC- β /lenta. Esta reducción en la actividad de MEF2C y sus objetivos principales como MYH7, MB, MYOM-1, PPARGC1A (que codifican para MyHC- β /lenta, mioglobina, miosina-1 y PGC1- α), compromete tanto las capacidades estructurales como metabólicas de miotubos diferenciados. Además, la vía de señalización Smad, estimulada por ActA, puede inhibir directamente la actividad de MEF2C. La Smad3, en particular, puede suprimir la función de MEF2 al interferir con la sinergia entre MyoD y MEF2, o facilitar la exportación de MEF2 fuera del núcleo, lo que impide su actividad transcripcional. Estos hallazgos sugieren que ActA no solo reduce la expresión de MEF2C, sino que también puede reprimir su actividad a través de la vía de señalización Smad2/3 [475].

3.3.4.6 MEF2 como diana terapéutica en enfermedades musculares

MEF2 es un modulador ampliamente reconocido de la homeostasis y la hipertrofia de las fibras musculares [476]. La inactivación de los factores MEF2 o la sobreexpresión de sus represores se asocia con atrofia muscular en diversas condiciones, como la denervación, diabetes tipo 2, el cáncer y la enfermedad de Huntington. Por el contrario, la activación de MEF2 puede promover la hipertrofia muscular. Se necesitan más estudios para dilucidar el papel específico de los factores MEF2 en la regulación de

ANTECEDENTES

la masa muscular adulta y para desarrollar terapias dirigidas a MEF2 para el tratamiento de la atrofia muscular [477, 478].

3.3.5 MEF2 perspectivas futuras

La investigación en torno a MEF2 continúa expandiéndose, revelando nuevas dimensiones de su función en la biología humana. Las terapias dirigidas a MEF2, mediante la utilización de moduladores específicos o terapias génicas, tienen el potencial de revolucionar el tratamiento de diversas enfermedades. Comprender en detalle sus mecanismos de acción permitirá diseñar intervenciones más precisas y efectivas, minimizando efectos secundarios y maximizando los beneficios terapéuticos. La investigación continua en tratamientos clínicamente efectivos que mejoren la calidad de vida durante el envejecimiento, diabetes tipo 2, enfermedades musculares, cardíacas y neurológicas.

OBJETIVOS

4 OBJETIVOS

Una estrategia prometedora para combatir la neurodegeneración es estimular la plasticidad neuronal, esencial durante el desarrollo y para construir redes neuronales eficientes [479]. La formación de neuritas es un paso clave en el proceso de la regeneración neuronal [480]. Este proceso está regulado principalmente por dos vías de señalización: las vías PI3K/Akt y MAPK/ERK [7, 8], que activan factores de transcripción como la familia de MEF2. La sobreexpresión de MEF2D regula la supervivencia, diferenciación, morfogénesis y apoptosis celular [9], inhibe la activación de la microglía, reduce los niveles de citoquinas y protege a las neuronas contra la privación de oxígeno y glucosa [11, 371]. Estas funciones sugieren que MEF2D es crucial en la modulación de las respuestas inflamatorias y en la neuroprotección tras un daño cerebral. Por tanto, modular la señalización mediada por PI3K/Akt y MAPK/ERK y MEF2D utilizando compuestos bioactivos permeables a la BHE, como el Na_2WO_4 , es una hipótesis atractiva para esta Tesis Doctoral.

Tomando como punto de partida estos antecedentes, nos planteamos como objetivo general de esta Tesis Doctoral conocer los efectos del Na_2WO_4 en la diferenciación y la neuroprotección neuronal.

Para ello, nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

1. Analizar el efecto del Na_2WO_4 sobre la diferenciación celular:

Cultivaremos dos líneas celulares neuronales, Neuro2a y SH-SY5Y y estudiaremos los cambios en el proceso de diferenciación al suplementar los medios de cultivo con Na_2WO_4 .

2. Estudiar el efecto del Na_2WO_4 en las vías de señalización implicadas en la diferenciación celular:

Examinaremos la activación de las vías de señalización ERK1/2 y PI3K/Akt, que estimulan la diferenciación neuronal y el crecimiento de neuritas.

Evaluaremos la influencia de Na_2WO_4 en estas vías de señalización, considerando su papel en el metabolismo celular.

OBJETIVOS

3. Investigar el efecto del Na_2WO_4 sobre el factor de transcripción MEF2D:

Estudiar la acción de Na_2WO_4 en la expresión y regulación de MEF2D, clave en la diferenciación y plasticidad neuronal.

4. Evaluar el efecto del Na_2WO_4 en la neuroprotección:

Analizar el impacto del Na_2WO_4 en la reversión de procesos neurodegenerativos mediados por productos finales de los AGEs, los cuales juegan un papel crucial en la neurodegeneración.

MATERIALES Y MÉTODOS

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales

5.1.1 Instrumentación

Se emplearon los siguientes equipos para el cultivo y manipulación de bacterias:

- Campana de flujo laminar horizontal *Micro-V* de Telstar.
- Estufa Memmert 500.
- Incubador con refrigeración y agitación orbital MaxQ™ de ThermoFisher Scientific.
- Mechero Bunsen.
- Electroporador ECM 830 de onda cuadrática.

Además, se utilizaron los siguientes equipos para el cultivo y la observación de células eucariotas:

- Campana de flujo laminar *Microflow* de MDH.
- Incubador de CO₂ Memmert INC 153.
- Microscopio óptico invertido Olympus CK2.
- Microscopio óptico invertido para fluorescencia Olympus CKX41.
- Unidad de alimentación Olympus U-RFLT 50 para lámpara de mercurio de 100 W.
- Cámara digital refrigerada CCD Olympus XC30.

Para el aislamiento, la purificación y el análisis de ácidos nucleicos se usaron:

- Cubetas *Mini-Sub* para electroforesis horizontal de Bio-Rad.
- Campana PCR con radiación ultravioleta de Boeco.

MATERIALES Y MÉTODOS

- Termociclador T100 Thermal Cycler de Bio-Rad.
- Sistema de detección *CFX Connect Real-Time PCR* de Bio-Rad.
- Capturador de imágenes de geles de ácidos nucleicos teñidos con diferentes fluoróforos MP Imaging System de Bio-Rad.

El análisis de proteínas obtenidas de cultivos celulares se llevó a cabo mediante el uso de los siguientes equipos:

- Equipo para transferencia Trans-Blot Turbo Transfer System de Bio-Rad.
- Cubeta para electroforesis vertical Mini-PROTEAN Tetra Cell de Bio-Rad.
- Sistema de detección de quimioluminiscencia y fluorescencia ChemiDoc MP Imaging System de Bio-Rad.

Otros equipos utilizados para la obtención de datos a partir de los experimentos realizados fueron:

- Citómetro de flujo *BD FACS Canto II* de BD Biosciences (Servicios Técnicos Centrales de la Universidad de Granada).
- Fluorímetro Shimadzu RF-5301 PC.
- Luminómetro *Sirius L Tube Luminometer* de Berthold Detection Systems.
- Contador multicanal de centelleo líquido LS 6000 de Beckman.

A continuación, se enumeran otros instrumentos de uso general en el laboratorio que se emplearon durante la realización de los experimentos descritos en esta tesis:

- Estufa con termostato Memmert 500.
- Autoclave Selecta.
- Baño de agua con termostato Memmert.
- Termobloque *Multiplaces* de Selecta.

MATERIALES Y MÉTODOS

- Espectrofotómetro Beckman DU 640.
- Lector de placas *Infinite® M Nano* de Tecan.
- Medidor de pH XS Instruments modelo pH 510.
- Centrífuga de sobremesa Eppendorf modelo 5418.
- Centrífuga de sobremesa refrigerada Eppendorf modelo 5415 R.
- Centrífuga de placas *Centry™ 101* de Gilson.
- Microcentrífuga *MiniStar silverline* de VWR.
- Centrífuga de sobremesa *Heraeus Megafuge 16 R*.
- Rotador de tubos VWR.
- Homogeneizador ultrasónico UP 100H de Hielscher Ultrasound Technology.
- Balanzas Precisa.
- Fuente de alimentación *PowerPac 300* de Bio-Rad.
- Agitador magnético con calefactor Benchmark Scientific H4000-HSE.
- Agitador tipo *vortex Reax Top* de Heidolph.
- Mesa agitadora Stuart SSM1.
- Micropipetas Gilson y Eppendorf.
- Contador de células automatizado LUNA-II™.
- Cámara fría a 4 °C y congeladores a -20 °C y a -80 °C.

5.1.2 Líneas celulares

5.1.2.1 Procariotas

Se utilizó la cepa **XL1-Blue** de *Escherichia coli* (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proABlaclqZΔM15 Tn10 (Tetr)]*).

Se trata de una cepa comúnmente utilizada en la clonación de plásmidos recombinantes. Presenta mutaciones en los genes *endA1*, *hsdR* y *recA*. Los dos primeros genes codifican para endonucleasas, mientras que el tercero participa en el fenómeno de recombinación del DNA. En conjunto, estos genes garantizan la integridad del plásmido que se va a transformar.

Además, la cepa incluye los genes *laclq* y *ZΔM15* en el episoma F'. El gen *ZΔM15* es una variante del gen *LacZ* que provoca la expresión de la enzima β-galactosidasa sin la subunidad α. Esta enzima es esencial para la utilización del sistema de selección mediante α-complementación y para el seguimiento del color azul-blanco de los clones.

5.1.2.2 Eucariotas

- **CHO-K1 (ATCC-CCL61)**: se trata de una línea celular que deriva de células de Ovario de Hámster Chino. Esta línea celular es especialmente útil para los estudios de expresión de proteínas recombinantes por transfección [481].

- **Neuro2a (ATCC CCL-131)**: es una línea celular de neuroblastoma derivada de un tumor espontáneo de ratones albinos [482]. La exposición de determinados efectores, como la proteína morfogenética ósea (BMP) o el factor de crecimiento neuronal (NGF), induce la diferenciación de estos neuroblastomas en neuronas. Las neuronas diferenciadas presentan características típicas neuronales, como la aparición de neuritas, la expresión de marcadores neuronales y la aparición de actividad eléctrica [483]. Esta línea celular se utiliza ampliamente en investigación, ya que es un modelo eficaz para estudiar la diferenciación neuronal, la neurobiología y el desarrollo de fármacos.

- **SH-SY5Y (ATCC CRL-2266)**: es una línea celular de neuroblastoma humana que deriva de la línea celular parental SK-N-SH (ATCC HTB-11). Esta línea celular parental fue generada en 1970 a partir de un tumor óseo metastásico en una niña de cuatro años. Las células SH-SY5Y son capaces

de diferenciarse en neuronas humanas funcionales. En su forma diferenciada, presentan una apariencia morfológicamente similar a las neuronas humanas, adquieren una forma polarizada, generan neuritas y sinapsis funcionales. Además, poseen muchas propiedades bioquímicas y funcionales de las neuronas, como la expresión de varios marcadores neuronales y la capacidad de sintetizar diversos neurotransmisores. Estudios previos han demostrado que es posible diferenciar las células SH-SY5Y hacia subtipos de neuronas específicas, como las adrenérgicas, colinérgicas, dopaminérgicas y glutaminérgicas [484]. Esta particularidad convierte a las células SH-SY5Y en un modelo celular neuronal ampliamente utilizado en la investigación neurocientífica.

5.1.3 Material para el cultivo de células

5.1.3.1 Medios de cultivo para bacterias

El medio de cultivo que se usó para el crecimiento de la cepa *XL1-blue* de *E. coli* fue el medio Luria-Bertani (LB) [485], que se compone de: 5 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de triptona y 5 g/L de cloruro sódico. En el caso de utilizar medio LB sólido, se añade a la mezcla anterior agar bacteriológico hasta alcanzar una concentración final de 1.5 % (p/v). Los reactivos fueron suministrados por Panreac y Scharlau. Los medios de cultivo fueron esterilizados antes de su utilización por calor húmedo a 120 °C y 1 bar de presión durante 30 minutos.

Para seleccionar bacterias resistentes a ciertos antibióticos, se prepararon soluciones stock de ampicilina (50 mg/mL en agua destilada, Sigma-Aldrich), kanamicina (25 mg/mL en agua destilada, Sigma-Aldrich), tetraciclina (15 mg/mL en metanol, Amresco) y cloranfenicol (30 mg/mL en etanol, Sigma-Aldrich), las cuales se añadieron al medio de cultivo en una proporción de 1:1000. Las soluciones de ampicilina y kanamicina fueron esterilizadas previamente por filtración. Todas las soluciones se almacenaron a -20 °C.

MATERIALES Y MÉTODOS

Finalmente, para la preparación de células competentes fueron necesarias las siguientes soluciones:

“Medio A”:

- Medio LB..... 49 mL
- 20 % (p/v) glucosa..... 500 µL
- 1 M MgSO₄ 500 µL

- “**Solución B**”: Los siguientes componentes se disuelven en medio LB, siguiendo las proporciones indicadas: 36 % (v/v) glicerol, 12 % (p/v) de polietilenglicol 7500, 12 mM MgSO₄.

5.1.3.2 Medios de cultivo para líneas celulares eucariotas

Para el cultivo de las células eucariotas usó el medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), suplementado con 100 U/mL penicilina, 0,1 mg/mL estreptomina, 2 mM L-glutamina y 10 % (v/v) de suero bovino fetal (FBS) (todos estos medios y suplementos fueron suministrados por Sigma-Aldrich).

En el caso de la línea celular SH-SY5Y la cantidad de FBS se aumentó al 15 % (v/v) y se inactivó previamente por tratamiento térmico durante 30 minutos a 56 °C.

Para inducir la diferenciación neuronal, se redujo la concentración de FBS al 3 % (v/v) en el caso de las células SH-SY5Y y del 0.5 % (v/v) en las células Neuro2a.

Para la transfección de las células eucariotas se utilizó el medio DMEM suplementado con 2 mM L-glutamina y el reactivo de transfección *Lipofectamine 2000* (ThermoFisher Scientific).

En el lavado de las células se utilizó tampón fosfato salino (PBS, por su nombre en inglés *phosphate buffered-saline*) pH 7,4 (Sigma-Aldrich). El material fungible empleado (placas de cultivo y pipetas estériles) fue proporcionado por Cultek S.L. y Dicsa.

5.1.4 Material utilizado para la manipulación de ácidos nucleicos

5.1.4.1 Plásmidos comerciales

pJet 1.2/blunt (ThermoFisher Scientific)

Se trata de un vector de clonación linealizado con los extremos romos que permite la inserción de fragmentos que van desde 6 bp hasta 10 Kb. Los productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por su nombre en inglés *polymerase chain reaction*) con extremos romos, obtenidos mediante polimerasas de alta fidelidad como la *Pfu* polimerasa, pueden ser ligados directamente al vector. Sin embargo, los fragmentos de DNA generados con *Taq* polimerasa, que contienen un nucleótido de adenina extra en el extremo 3', requieren un tratamiento previo para la eliminación de dicho nucleótido.

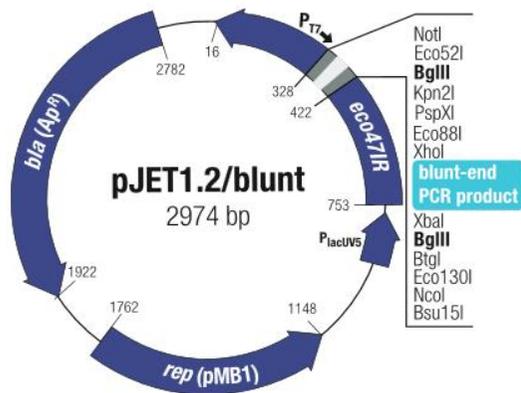


Figura 14. Plásmido pJET1.2/blunt.

El vector contiene la secuencia de un gen letal para las bacterias, la cual es interrumpida por la inserción del fragmento de DNA en el sitio de clonación. Esto permite que solo las bacterias que contienen el plásmido recombinante puedan multiplicarse.

Además, el vector contiene la secuencia del gen *bla* (Ap^R), que codifica para la β -lactamasa y confiere resistencia a ampicilina. Un

MATERIALES Y MÉTODOS

esquema de la estructura del vector y del sitio múltiple de clonaje se muestra en la **Error! Reference source not found.**

pEGFP-N3 (Clontech)

Se trata de una de las tres variantes del vector pEGFP-N, diseñadas según la pauta de lectura del inserto a clonar. Estos vectores permiten la expresión de fragmentos de DNA en células de mamífero, fusionados en el extremo amino de la proteína fluorescente verde (GFP por su nombre en inglés *green fluorescent protein*). La expresión de la proteína está regulada por un promotor de citomegalovirus, lo que permite una expresión constitutiva en células eucariotas de mamíferos. Además, en el extremo 3' se incorporan secuencias de poliadenilación de SV-40, las cuales facilitan el procesamiento del RNA mensajero (mRNA). Por último, cabe destacar que el vector contiene genes de resistencia a kanamicina y neomicina (ver Figura 21).

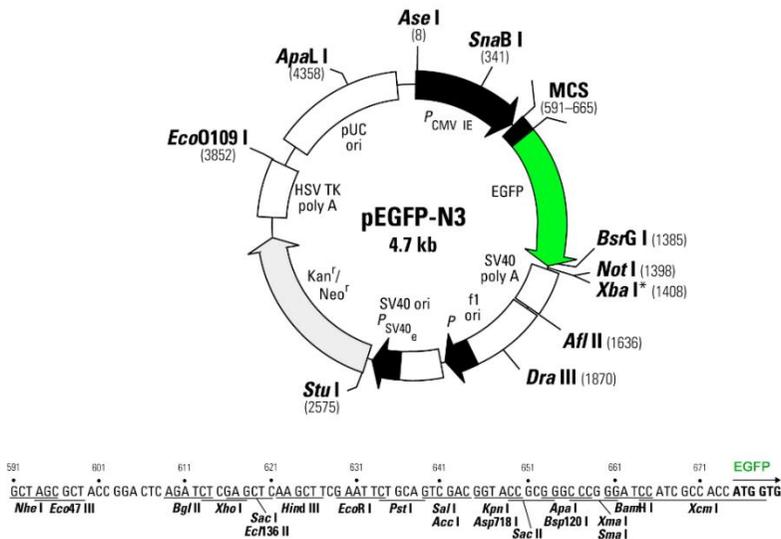


Figura 15. Plásmido pEGFP-N3.

pGL3-Basic, pGL3-Control y pRL-TK (Promega)

El vector reportero pGL3-Basic permite el análisis cuantitativo de regiones de DNA que potencialmente regulan la expresión génica. Este vector alberga el sitio de clonación múltiple ubicado aguas arriba del gen de la luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*), lo que implica que la expresión de la luciferasa estará regulada por la región promotora clonada

en ese sitio. La serie de vectores pGL3 incluye secuencias potenciadoras de SV-40 en el extremo 3' para favorecer la transcripción de la luciferasa, mientras que el vector pGL3-Basic no las contiene.

El vector pGL3-Control se utilizó como control positivo en las transfecciones realizadas. Este vector posee el gen de la luciferasa de luciérnaga precedido del promotor de SV40, lo que proporciona un nivel de expresión elevado.

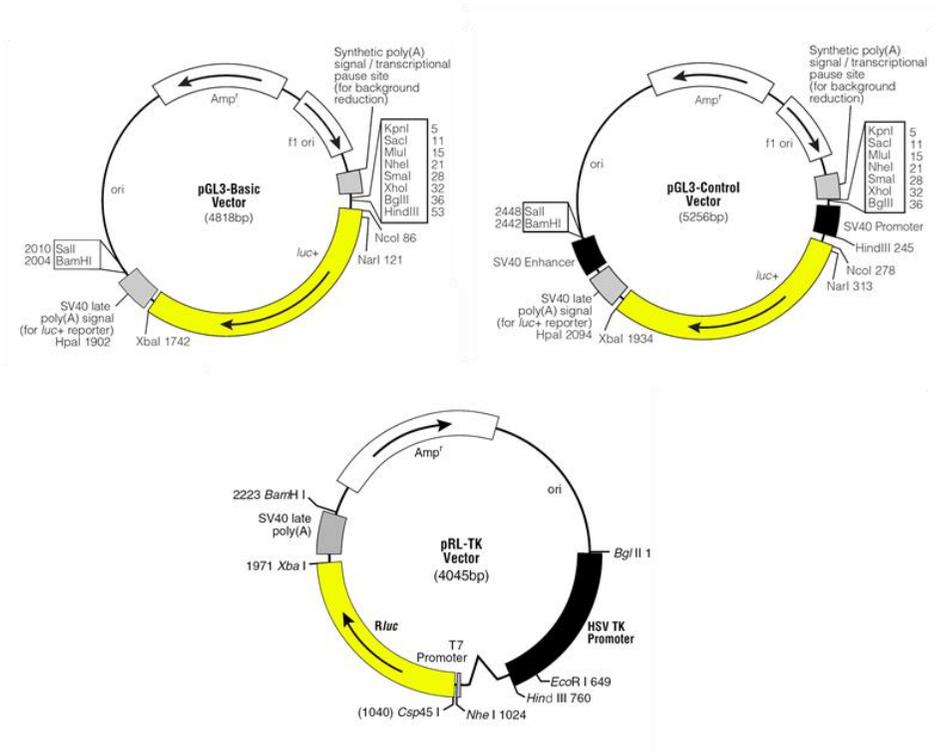


Figura 16. Plásmidos pGL3-Basic, pGL3-Control y pRL-TK.

Para normalizar la eficiencia de transfección de los derivados de pGL3-basic empleó el vector pRL-TK. Este vector codifica para una luciferasa de *Renilla* (*Renilla reniformis*) regulada por el promotor de la timidina quinasa del virus *Herpes simplex* (HSV-TK). Dicho promotor genera un alto nivel de expresión de la luciferasa de *Renilla*, lo que permite ser medida de forma independiente a la luciferasa de luciérnaga. Por tanto, este método permite la utilización de un sistema dual de ensayo en el que se determinan secuencialmente las actividades de ambas luciferasas en el

MATERIALES Y MÉTODOS

mismo cultivo celular, facilitando la normalización de los resultados (**Error! Reference source not found.**).

pCMV-BD y pFR-Luc

Diseñados inicialmente para analizar la interacción de proteínas mediante el sistema de doble híbrido, en nuestro laboratorio se usaron para el estudio de la actividad transcripcional mediada por MEF2D sin interferencia del factor de transcripción silvestre de las células transfectadas.

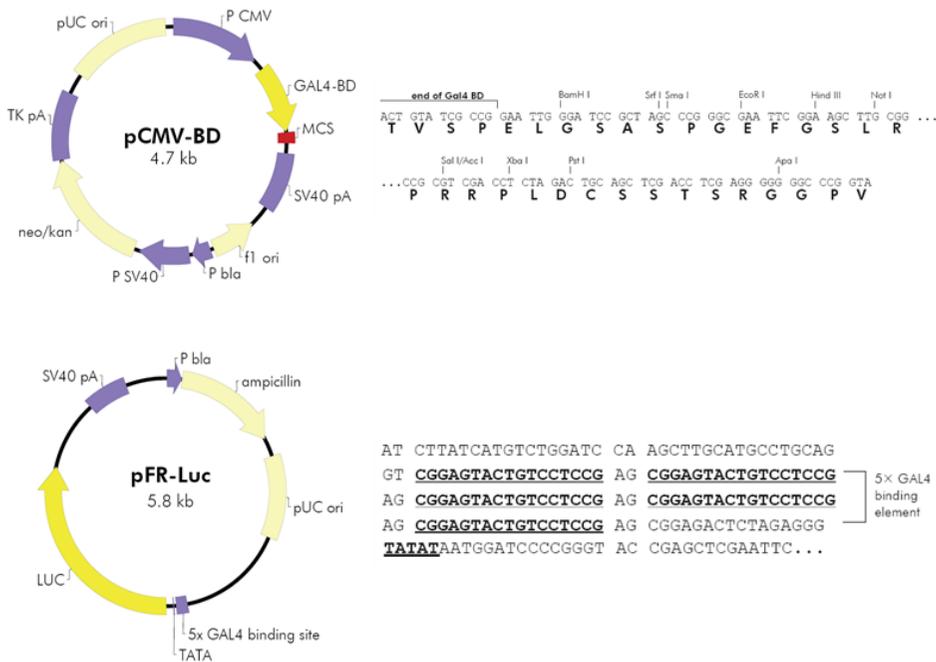


Figura 17. Plásmidos pCMV-BD y pFR-Luc.

El plásmido pCMV-BD contiene la secuencia codificante para el dominio de unión a DNA del factor de transcripción GAL4 de levaduras. En este plásmido, se debe clonar la secuencia codificante de la proteína que se desea estudiar.

Por otro lado, el plásmido pFR-Luc contiene un promotor sintético con cinco repeticiones en tándem del sitio de unión a GAL4 de levaduras, que controla la expresión de un gen reportero (luciferasa de *Photinus pyralis*). La expresión de este gen reportero depende exclusivamente de

los niveles de expresión de la proteína quimérica generada a partir de la secuencia clonada en pCMV-BD (**Error! Reference source not found.**23).

5.1.4.2 Construcciones realizadas en plásmidos de DNA

A continuación, se detallan las distintas construcciones que se han utilizado en la transfección de células eucariotas llevadas a cabo en esta Tesis Doctoral, incluyendo el nombre, descripción y referencia (Tabla 2).

Nombre	Descripción	Referencia
pCMV-GAL MEF2D	Forma silvestre de MEF2D ligado al dominio de unión a DNA del factor de transcripción GAL4 de levaduras. Permite estudiar la actividad transcripcional mediada por MEF2D.	Este laboratorio
pCMV-GAL MEF2D K439R pCMV-GAL MEF2D S444A	Formas mutadas de MEF2D y fusionadas al dominio de unión a DNA del factor de transcripción GAL4 de levaduras. Permiten estudiar el efecto de la sumoilación sobre la actividad transcripcional mediada por MEF2D.	Este laboratorio
pMEF2x4 Eb1 Luc	Presenta cuatro copias en tándem del sitio de unión a MEF2. Permite estudiar la actividad transcripcional mediada por los factores de transcripción MEF2.	[486]
pMEF2D	Expresa la forma silvestre de MEF2D	Este laboratorio

MATERIALES Y MÉTODOS

pEGFP-N3	Permite la expresión de GFP en células eucariotas, lo que facilita su visualización y el estudio de diversos procesos biológicos.	Este laboratorio
pEGFP-MEF2D	Forma silvestre de MEF2D fusionada con GFP. Permite estudiar expresión y la localización subcelular de MEF2D.	Este laboratorio
pEGFP-MEF2D K439R pEGFP-MEF2D S444A	Formas mutadas de MEF2D y fusionadas con GFP. Permiten estudiar el efecto de la sumoilación y la fosforilación sobre la expresión y localización de MEF2D.	Este laboratorio

Tabla 2. Construcciones realizadas en plásmidos de DNA

5.1.4.3 Oligonucleótidos

5.1.4.3.1 Ensayos de PCR a tiempo real

La siguiente tabla presenta las secuencias de los oligonucleótidos utilizados en los ensayos de PCR a tiempo real (RTqPCR).

Gen	Especie	Nombre	Secuencia
Actina	Humano	FH1_ACTB	5'-GACGACATGGAGAAAATCTG-3'
		RH1_ACTB	5'-ATGATCTGGGTCATCTTCTC-3'
	Ratón	FM1_ACTB	5'-GATGTATGAAGGCTTTGGTC-3'

		RM1_ACTB	5'-TGTGCACTTTTATTGGTCTC-3'
Colina O-acetiltransferasa	Humano	FH1_ChAT	5'-TCAGTTCTTTGTCTTGGATC-3'
		BH1_ChAT	5'-TGGAAGCCATTTTGACTATC-3'
	Ratón	FM1_ChAT	5'-TCCTCTTAAAAGACTCCACC-3'
		RM1_ChAT	5'-GACTTGTCCATACCAACGATTC-3'
MEF2D	Ratón	FM1_MEF2D	5'-ATGAACTGATCACTAGTCC-3'
		RM1_MEF2D	5'-CCTTCTTCATCAGTCCAAAC-3'
NR4A	Humano	FH1_NR4A2	5'-GACTATCAAATGAGTGGAGATG-3'
		BH1_NR4A2	5'-GACCTGTATGCTAATCGAAG-3'
	Ratón	FM1_NR4A	5'-CTATGGTCACAGAGAGACAC-3'
		RM1_NR4A	5'-CAACAGTTTAGACAGGTAGTTG-3'
Tirosina hidroxilasa	Humano	FH1_Th	5'-CAAAATCCACCATCTAGAGAC-3'
		BH1_Th	5'-CTGACACTTTTCTTGGGAAC-3'
	Ratón	FM1_Th	5'-ATGGAAATGCTGTTCTCAAC-3'
		RM1_Th	5'-GTCTCTAAGTGGTGGATTTG-3'

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en los ensayos de qPCR.

MATERIALES Y MÉTODOS

5.1.4.3.2 Ensayos de clonación y mutagénesis

La tabla 4, que se presenta a continuación, describe la secuencia de los oligonucleótidos utilizados en los ensayos de clonación y mutagénesis. Los oligonucleótidos subrayados corresponden a mutaciones introducidas o nuevos sitios de restricción.

Nombre	Secuencia	Sitio
MEF2Df	5'- <u>AGATCT</u> ATGGGGAGGAAAAAGATTTCAG-3'	BglII
MEF2Dr	5'- <u>GTCGACTCACTTTAATGTCCAAGTATCC</u> -3'	Sall
MEF2D K439Rf	5'CCCCACATAAGCATCAG <u>ATCT</u> GAACCAGTGTCCCC AAGTCG-3'	BglII
MEF2D K439Rr	5'- CGACTTGGGGACTGGTTCAG <u>ATCT</u> GATGCTTATGT GGGGG-3'	BglII
Mef2D S444Af	5'- GCATCAAGTCAGAACCAGTG <u>CCCC</u> AGTCGTGAACG CAGCCCTGCACC-3'	Aval
MEF2D S44Ar	5'- GGTGCAGGGCTGCGTTCACGACT <u>GGGG</u> CCACTGGTT CTG ACTTGATGC-3'	Aval

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en los ensayos de clonación y mutagénesis

5.1.4.4 Reactivos

Los siguientes reactivos fueron proporcionados por la casa comercial ThermoFisher Scientific: *Pfu* polimerasa, Kit de clonación *CloneJET PCR Cloning kit*, marcadores de peso molecular *100 bp DNA Ladder*, endonucleasas de restricción, kit para la extracción de DNA plasmídico *GeneJET Plasmid Miniprep Kit*, RNasa I, kit para la extracción de RNA *GeneJET RNA Purification Kit*. El kit de retrotranscripción para la obtención de DNA complementario (cDNA) a partir de mRNA (*iScript™ cDNA Synthesis*) fue suministrado por Bio-Rad.

Para la cuantificación en el PCR a tiempo real se utilizó el kit *SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix* procedente de Bio-Rad.

Además, se emplearon los siguientes reactivos en los experimentos con ácidos nucleicos: bromuro de etidio, ácido clorhídrico, hidróxido sódico, acetato potásico, ácido acético, agarosa, alcohol isoamílico, cloroformo, cloruro de litio, cloruro sódico, ácido etildiaminotetraacético (EDTA), etanol, fenol, Hoechst 33258, isopropanol, 2-mercaptoetanol, polietilenglicol 8000, dodecil sulfato sódico (SDS) y Tris. Todos ellos proporcionados por las siguientes casas comerciales: Amresco, Bio-Rad, Lonza, Merck, Panreac, ThermoFisher Scientific, Scharlau y Sigma-Aldrich.

5.1.5 Material para la manipulación de proteínas

Para la electroforesis de proteínas en geles desnaturizantes de acrilamida se utilizaron los siguientes reactivos: acrilamida, tetrametiletilendiamina (TEMED), persulfato amónico (APS), SDS, Tris (Sigma-Aldrich), ácido clorhídrico (VWR), glicerol (Panreac), β -mercaptoetanol (Merk), azul de bromofenol (Beckman), ácido acético (Scharlau), metanol (VWR) y marcadores de peso molecular (*Bio-Rad*).

En la realización de los *Western blots* se usaron membranas de nitrocelulosa y fluoruro de polivinilideno (PVDF) (GE Healthcare), albúmina sérica bovina (BSA), luminol, ácido p-cumárico, dimetilsulfóxido (DMSO), Tris, glicina, metanol, NaCl, Tween-20, H₂O₂ (Sigma-Aldrich), ácido clorhídrico (VWR), anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón, conejo y cabra conjugados a peroxidasa y anticuerpos secundarios fluorescentes StarBright Blue 700/520 (Bio-Rad), leche desnatada en polvo y los anticuerpos primarios descritos en la Tabla 5.

Nombre	Casa comercial y referencia
Acetilcolinesterasa	Santa Cruz Biotechnology sc-373901
Actina	Developmental Studies Hybridoma Bank JLA20
Akt	Santa Cruz Biotechnology sc-81434
pAkt	Sigma-Aldrich SAB4504331
Caspasa-3	Cell Signaling 9662S
ERK1/2	Cell Signaling 9102S

MATERIALES Y MÉTODOS

p-ERK1/2	Cell Signaling 9106S
GAPDH	Santa Cruz Biotechnology sc-32233
GLUT3	Abcam ab191071
MEF2D	BD Transduction Laboratories 610775
mTOR	Santa Cruz Biotechnology sc-517464
p-mTOR	Invitrogen 44-1125G
S6K1	Cell Signaling 9202
p-S6K1	Invitrogen 44-920G

Tabla 5. Anticuerpos utilizados en el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

En los experimentos de síntesis y degradación de proteínas se usó L-(ring-3,5-³H)-Tyr (Perkin Elmer), hidróxido sódico (Panreac), desoxicolato sódico, ácido tricloroacético (TCA), L-tirosina, BSA, dexametasona (Sigma-Aldrich), ácido clorhídrico (VWR) y líquido de centelleo *Eco-Lite* (VWR).

Para la determinación de la actividad promotora dependiente de la expresión de luciferasa se empleó el kit *Dual Luciferase Assay System* (Promega).

Para la extracción y análisis de proteínas también se utilizaron los siguientes reactivos: Tris, ácido clorhídrico, cloruro sódico, Nonidet-P40, SDS, desoxicolato sódico, EDTA, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), fluoruro sódico, pirofosfato sódico, ortovanadato sódico, ácido tetraacético de etilenglicol (EGTA), ácido okadaico, aprotinina, leupeptina, pepstatina, cloruro potásico, cóctel inhibidor de proteasas (P8340, Sigma-Aldrich, Madrid, España), ácido 4-(2-Hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico (HEPES) y ditiotreitól (DTT). Estos productos procedieron de las siguientes casas comerciales: Amresco, Bio-Rad, Fluka, Merck, Panreac, Scharlau y Sigma-Aldrich.

5.1.6 Aplicaciones informáticas

Para la realización de este trabajo y el análisis de los resultados se han utilizado los siguientes programas informáticos:

MATERIALES Y MÉTODOS

- *CFX Manager* 3.1 (Bio-Rad) para la gestión de los datos obtenidos por qPCR.
- *Serial cloner* 2.6.1 (Serial Basics) para el análisis de secuencias de ácidos nucleicos y proteínas.
- *analySIS getIT* 5.1. (Olympus Soft Imaging Solutions) para la captura y tratamiento de imágenes de células fluorescentes.
- *ImageJ* 1.54 (National Institutes of Health, USA) para la captura y el recuento de neuritas en células diferenciadas y el análisis de imágenes de células fluorescentes.
- GraphPad Prism 8 (*GraphPad Software*) para la generación de las gráficas presentadas en este trabajo y el análisis estadístico de los resultados.
- EndNote X9 para la administración de las referencias bibliográficas.
- ImageLab 6.1 Software de Bio-Rad para la cuantificación de la intensidad de las bandas de las imágenes de *Western blot* y el procesamiento de las imágenes de electroforesis de ácidos nucleicos obtenidos con ChemiDoc MP Imaging System.
- ModFIT LT™ v3.2 (Verity Software House) para el procesamiento de los datos obtenidos en citometría de flujo.

5.2 Métodos

5.2.1. Métodos de cultivo y manipulación de bacterias

5.2.1.1 Preparación de células competentes

Para la preparación de células competentes, se siguió el protocolo descrito por [487]. Inicialmente se inoculó un cultivo bacteriano saturado de *E. coli* XL1-Blue en 50 mL de “Medio A” (sección 5.1.3.1) en una proporción de 1:100 (v/v). Las bacterias se incubaron a 37 °C con agitación (200 rpm) hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento, aproximadamente con una densidad óptica de 0,6 medida a una longitud de onda de 600 nm. Posteriormente, la suspensión bacteriana se mantuvo en hielo durante 10 minutos y luego se centrifugó a 1500 RCF durante 10 minutos. El precipitado obtenido se homogeneizó en 0,25 mL de “Medio A”. A continuación, se añadieron 1,25 mL de medio B y se mezcló adecuadamente. Se prepararon alícuotas de 100 µL de células competentes en tubos, los cuales se conservaron a una temperatura de -80 °C durante al menos 4 horas antes de su utilización. Todos los pasos mencionados se llevaron a cabo a una temperatura de 4 °C.

5.2.1.2 Transformación por choque térmico

Para la transformación de células competentes con DNA plasmídico, se siguió el protocolo descrito por [488]. Se añadieron 50-100 ng del DNA de interés a 0,1 mL de bacterias competentes parcialmente descongeladas, y se incubaron en hielo durante 1 hora. Después de este período, se llevó a cabo un choque térmico a 42 °C durante 1,5 minutos, seguido de una incubación en hielo durante 10 minutos. Posteriormente, se añadieron 900 µL medio LB líquido y se incubó durante 1 hora a 37 °C.

Por otra parte, se prepararon las placas de cultivo de bacterias utilizando medio LB-agar y los antibióticos de selección apropiados, según los genes de resistencia a antibióticos presentes en el plásmido y en las bacterias transformadas. Se sembraron alícuotas de 250 µL del producto de la transformación en las placas, las cuales fueron incubadas durante toda la noche a 37 °C.

5.2.2 Métodos de cultivo, manipulación y observación de células eucariotas

5.2.2.1 Generalidades

Todos los procedimientos descritos a continuación se realizaron en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar, utilizando medios de cultivo, soluciones y material fungible estéril.

Las células se cultivaron adheridas en placas de poliestireno estériles con el medio de cultivo correspondiente para cada línea de celular, a una temperatura de 37 °C en un incubador con una atmósfera de 5 % de CO₂.

5.2.2.2 Tripsinización

La tripsinización es la técnica por la cual se consigue separar las células adheridas a las placas de cultivo para su posterior recuento, subcultivo o almacenamiento.

Cuando las células adheridas a la placa de cultivo se encuentran entre el 70-90 % de confluencia se retira el medio de cultivo y se lavan dos veces con PBS. Así se eliminan los posibles restos de FBS que pueden inhibir la acción de la tripsina.

A continuación, se añade una cantidad adecuada de la solución de 0.25 % tripsina-EDTA para cubrir completamente la superficie de la placa y se incuba a 37 °C el tiempo necesario para que la enzima ejerza su acción. Es posible observar visualmente cómo las células se desprenden de la placa. Por último, se neutraliza la tripsina añadiendo 5-10 mL de medio de cultivo suplementado con FBS a la concentración que necesite nuestra línea celular para su crecimiento.

5.2.2.3 Recuento de células

Tras llevar a cabo el procedimiento de tripsinización mencionado previamente (consultar 5.2.2.2), es posible determinar la densidad celular por unidad de volumen utilizando el contador automático de células Luna II™. A continuación, se procede a diluir el producto de la tripsinización en medio de cultivo en una proporción de 1:10; con el fin de prevenir la formación de aglomerados, se puede agitar o pipetear suavemente hasta obtener una suspensión homogénea. El siguiente paso consiste en extraer

MATERIALES Y MÉTODOS

10 μL de esta suspensión y mezclarla con 10 μL de una solución al 0.4 % de azul tripán. Posteriormente se cargan 10-12 μL en la cámara de recuento, se inserta en el contador, se elige el protocolo *count cell* y se presiona *count* en el menú. Pasados unos segundos el contador nos proporcionará el número de células vivas por mL.

5.2.2.4 Congelación y almacenamiento de líneas celulares

Tras la separación de las células mediante tripsinización, se añaden 5 mL de medio DMEM suplementado con FBS a las células. Luego, se centrifugan a 800 rpm durante 5 minutos y se elimina el sobrenadante. El precipitado de células se resuspende en 1 mL de una solución de congelación compuesta por un 5 % (v/v) de DMSO y un 95 % (v/v) de FBS y se introduce en un vial de congelación. Para garantizar una congelación adecuada de las células eucariotas, se utilizó un contenedor especial llamado *CoolCell* (Biocision), que permite reducir la temperatura gradualmente a una velocidad de 1 °C por minuto cuando se coloca en el congelador a -80 °C.

Transcurridas 48 horas, los viales congelados se pueden trasladar a un contenedor, donde se almacenan en una atmósfera de nitrógeno líquido (-195 °C). Este método de almacenamiento permite conservar las células durante períodos mucho más prolongados en comparación con el almacenamiento en un congelador a -80 °C, lo que garantiza su viabilidad en el futuro.

5.2.2.5 Transfección eucariota

Esta técnica implica la introducción de DNA plasmídico en células cultivadas, lo que desencadena cambios en su fenotipo mediante la expresión de los genes transfectados.

Existen varios métodos para llevar a cabo la transfección. En nuestro estudio, utilizamos el reactivo *Lipofectamine 2000* (ThermoFisher Scientific), que consiste en liposomas con carga positiva en su superficie. Estos liposomas son atraídos de manera electrostática hacia los grupos fosfato expuestos en el exterior de la doble hélice del DNA, así como hacia las membranas celulares que presentan una carga negativa.

Para realizar una transfección convencional de células eucariotas en placas de 48 pocillos, se sigue el siguiente procedimiento:

1. Preparación de las células:

El día anterior a la transfección, se separan las células de una placa P100 que tengan una alta confluencia (superior al 80 %). Se realiza un recuento celular según el método descrito en la sección 5.2.2.3, y se siembran en los pocillos de una nueva placa la cantidad adecuada de células (entre $1,7 \cdot 10^4$ y $2,2 \cdot 10^4$, dependiendo del tipo celular). Después de 24 horas, el porcentaje de confluencia de las células debe estar entre el 60-80 %.

2. Preparación de los reactivos:

- Se prepara una suspensión de 0,3 μg /pocillo de DNA plasmídico de interés.
- Se prepara otra suspensión con 0,7 μL de lípido catiónico en 30 μL de medio de transfección (DMEM suplementado con 2 mM de L-glutamina). Es importante destacar que estos medios no contienen antibióticos ni FBS, ya que su presencia puede tener un efecto negativo en el proceso de transfección.
- Después de 5 minutos, se mezclan ambos medios y se dejan incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos para formar el complejo DNA plasmídico-lípido catiónico.

3. Transfección de las células:

- Se elimina el medio de cultivo en el que las células han estado creciendo desde el día anterior, luego se lavan dos veces con PBS y se disponen 0,3 mL de medio de transfección en cada uno de los pocillos.
- Una vez transcurridos los 20 minutos de incubación de la mezcla preparada anteriormente, se añade la mezcla a cada pocillo.
- Las células se incuban en esta condición a una temperatura de 37 °C y una atmósfera con un 5 % de CO_2 durante un período de 4-6 horas.

4. Finalización de la transfección:

MATERIALES Y MÉTODOS

- Al finalizar este tiempo, se retira el medio y se reemplaza por medio DMEM suplementado con 10 % (v/v) de FBS, 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL penicilina y 0,1 mg/mL estreptomycinina.

Es importante ajustar las cantidades de DNA, reactivo de transfección y medio de cultivo de manera adecuada según el tamaño del pocillo o placa que se utilice.

5.2.2.6 Microscopía de fluorescencia

Después de un período de al menos 24 horas desde la introducción de vectores que codifican para la GFP, se procedió a examinar las células utilizando un microscopio de fluorescencia Olympus CKX41 y se capturaron imágenes utilizando una cámara digital Olympus XC-30. Durante cada sesión, se establecieron valores fijos para el tiempo de exposición y la sensibilidad con el fin de poder comparar posteriormente los niveles de fluorescencia. Se capturaron imágenes y se midió la intensidad de fluorescencia utilizando el software ImageJ (National Institutes of Health, USA).

5.2.2.7 Ensayos de viabilidad y proliferación celular basados en MTT

El método de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) es ampliamente utilizado en el estudio de la proliferación y/o viabilidad celular.

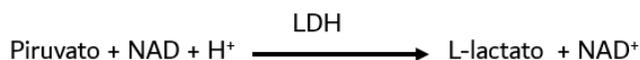
Las células vivas con metabolismo activo tienen la capacidad de convertir el MTT en un compuesto de color morado (formazán), el cual muestra una absorbancia máxima a 570 nm. Por el contrario, las células muertas no participan en esta reacción, lo que convierte a la formación de color en un indicador adecuado para detectar células viables.

Para llevar a cabo este método, las células se lavan con PBS y se incuban en medio de cultivo DMEM sin FBS, al que se le ha añadido 0,5 mg/mL de MTT, a 37 °C durante 1-4 horas, dependiendo del tipo celular. Tras este periodo, se retira el medio de cultivo, se realiza un lavado con PBS y se le añade una solución de 40 mM HCl en isopropanol para disolver el formazán formado. Finalmente, se mide la densidad óptica de la solución coloreada a una longitud de onda de 570 nm en un lector de microplacas.

La intensidad de la señal generada en el ensayo depende de varios factores, como la concentración de MTT, el tiempo de incubación, el número de células viables y su actividad metabólica. Todos estos parámetros deben ser considerados para optimizar el ensayo.

5.2.2.8 Ensayo de citotoxicidad basado en la actividad LDH

La LDH es una enzima citosólica presente en una amplia variedad de células. Su actividad se utiliza como un indicador sensible y confiable de la integridad de la membrana plasmática celular. La liberación de LDH al medio de cultivo circundante indica daño celular. El ensayo de LDH se basa en una reacción enzimática acoplada. La LDH cataliza la reducción de piruvato a lactato, utilizando NADH como cofactor. La cantidad de NADH consumida es proporcional a la actividad de LDH presente en la muestra. La disminución de la absorbancia de NADH a 340 nm se mide espectrofotométricamente, lo que permite cuantificar la actividad de LDH y, por lo tanto, la citotoxicidad.



El ensayo se realizó siguiendo las instrucciones del kit “Determinación cuantitativa de lactato deshidrogenasa” de Spinreact (1001260, Barcelona, España). En primer lugar, se preparó el reactivo de trabajo (RT) disolviendo 1 comprimido de R2 (NADH) en un vial de R1 (Imidazol y Piruvato). Después, en una placa de 96 pocillos se añadieron 180 μL de RT y 10 μL del sobrenadante de las células incubadas con los efectores a ensayar y 10 μL del sobrenadante de células tratadas con 0.1 % Triton X-100 como control positivo durante 1 minuto. Se mide la absorbancia inicial a 340 nm y posteriormente cada minuto durante 3 minutos a 37 °C.

Un aumento en la actividad de LDH en el sobrenadante celular indica daño en la membrana plasmática y, por lo tanto, citotoxicidad. La comparación de la actividad de LDH con un control positivo (Triton X-100) permite determinar el porcentaje de actividad LDH absoluta.

5.2.2.9 Recuento de formación y longitud de neuritas

La presencia de neuritas en líneas celulares neuronales es un indicador de la diferenciación de los neuroblastos en neuronas. Para realizar el recuento, se utilizó un microscopio óptico invertido Olympus CKX41. Se capturaron imágenes y se contó el número de células no diferenciadas y de neuritas utilizando el software ImageJ (National Institutes of Health, USA). Se consideraron neuritas a las extensiones celulares que tenían una longitud igual o mayor al diámetro del cuerpo celular. El porcentaje de células diferenciadas se calculó dividiendo el número de células con neuritas entre el número total de células. Asimismo, se determinó la longitud de las neuritas trazando las neuritas que emergían del soma utilizando el *plugin* NeuronJ.

5.2.2.10 Tinción β -galactosidasa asociada a senescencia

La beta galactosidasa es una enzima lisosomal que muestra su máxima actividad en un rango de pH de 4,0-4,5 en células normales. Sin embargo, en células senescentes, esta actividad se extiende hasta un pH 6,0 debido al aumento en el número de lisosomas [489]. Este incremento en la actividad enzimática se utiliza como biomarcador de senescencia celular.

La detección de células senescentes mediante un ensayo colorimétrico se fundamenta en la adición del sustrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-Gal). Cuando la β -galactosidasa degrada el X-Gal, se forma un compuesto azul insoluble que es observable al microscopio [490].

En este método, las células se cultivan en una placa de 48 pocillos y se incuban con los correspondientes efectores durante el tiempo que sea necesario según el diseño experimental. Posteriormente, se elimina el medio de cultivo y las células se lavan tres veces con PBS para eliminar cualquier resto de células muertas o no viables.

Las células se fijan con paraformaldehído para estabilizarlas y facilitar la penetración de la solución de tinción, seguido de cinco lavados con PBS para eliminar el exceso de paraformaldehído.

Se añade la solución de tinción SA- β gal a las células, las cuales se incuban a 37 °C durante 24 horas. Durante este periodo, la enzima β -galactosidasa hidroliza el X-gal, generando el producto azul.

Una vez concluida la incubación, se retira la solución de tinción y se lavan las células cinco veces con PBS. A continuación, se capturan las imágenes de las células con el microscopio óptico invertido.

El número de células teñidas de azul y no coloreadas puede contabilizarse utilizando el programa ImageJ. El porcentaje de células teñidas con β -galactosidasa se calcula dividiendo el número de células teñidas entre el número total de células.

5.2.2.11 Análisis del ciclo celular

La evaluación de la progresión del ciclo celular a través de sus diversas fases, así como de la tasa de proliferación celular, son aspectos críticos en la investigación de diferenciación, senescencia y apoptosis. Además, la detección de cambios en la progresión del ciclo celular es esencial en la evaluación de compuestos farmacológicos, ya que proporciona información valiosa sobre los mecanismos de acción de dichas sustancias [491].

El yoduro de propidio es un colorante fluorescente que se une de manera estequiométrica a los ácidos nucleicos generando una emisión fluorescente proporcional al contenido de DNA de la célula. Esta propiedad permite diferenciar y cuantificar la distribución de las células a lo largo de las diferentes fases del ciclo celular mediante un citómetro de flujo.

Las células en estado quiescente o en fase G₀/G₁ presentan dos copias de cada cromosoma; las células mitóticas o en fase G₂/M contienen el doble de la cantidad de DNA que las células G₀/G₁ y emiten el doble de fluorescencia. Mientras tanto, las células en fase de síntesis de DNA (fase S) muestran valores de fluorescencia intermedios.

Para llevar a cabo el análisis, las células se recogen después de la tripsinización y se centrifugan a 400 RCF durante 5 minutos. Posteriormente, se elimina el sobrenadante, se resuspende el precipitado en PBS y se centrifuga de nuevo a 400 RCF durante 5 minutos. Tras descartar el sobrenadante, el precipitado de células se resuspende en 200 μ L de PBS para obtener una suspensión de células aisladas, y luego se mezcla con 2 mL de etanol frío 70 % (v/v) y se incuba a -20 °C durante 30 minutos.

A continuación, se centrifuga a 2500 RCF durante 5 minutos y se elimina el sobrenadante. El sedimento se resuspende en 800 μ L de PBS

MATERIALES Y MÉTODOS

suplementado con 100 μL de yoduro de propidio y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de RNasa, y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente [492]. Las células están listas para ser procesadas por citometría de flujo en el canal FL-2, con la precaución de hacer la medida en escala lineal.

5.2.2.12 Determinación de la captación de glucosa

Las células Neuro2a se cultivaron en placas de 48 pocillos y se incubaron durante 24 horas en presencia y ausencia de 1 mM Na_2WO_4 .

Después del período indicado de incubación, las células se lavaron con KRPH (HEPES-*buffered Krebs-Ringer phosphate*) y se incubaron con 1 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ de 2-deoxi-[3H]glucosa (2-DG) durante 15 minutos a 37 °C.

La captación de 2-DG se detuvo aspirando rápidamente el medio de incubación radioactivo y lavando las células tres veces con PBS frío. La radioactividad asociada con las células se determinó mediante lisis celular añadiendo 0,1 mM NaOH/0.1 % (p/v) desoxicolato sódico.

Se destinó una alícuota de 5 μL para la cuantificación de proteínas y el resto se neutralizó con 0.1 M HCl y se mezcló con 4 mL de líquido de centelleo *Ready Safe* (Beckman Coulter).

5.2.2.13 Estudio de promotores mediante el uso de genes reporteros codificantes de luciferasas

Las células fueron transfectadas con construcciones del vector pGL3-Basic, que incluían la secuencia de un promotor específico, y el vector pRL-TK en una proporción 95:5 (ver 5.1.4.1). Posteriormente, las células se incubaron durante 24 horas en presencia o ausencia de Na_2WO_4 . La actividad de las luciferasas de luciérnaga y *Renilla* se midió utilizando el *Dual Luciferase Assay System* (Promega) siguiendo el protocolo del fabricante y usando un luminómetro *Sirius L* (Berthold Technologies).

Los resultados se expresaron como cambios relativos en la actividad de la luciferasa, normalizados a un valor del 100 % para facilitar la comparación de los niveles de expresión.

5.2.3 Técnicas para el análisis de ácidos nucleicos

5.2.3.1 Aislamiento y purificación de DNA plasmídico

Se han utilizado diferentes técnicas en base a dos criterios: la cantidad de DNA y el nivel de pureza necesario. El método de lisis alcalina es rápido, simple y adecuado para muchas aplicaciones en las que no se requiere una alta pureza. Debido a esta razón, se utilizó de manera generalizada para identificar las colonias que contienen plásmidos con los insertos de interés.

Minipreps de DNA Plasmídico

Para llevar a cabo este método, se empleó el kit comercial GeneJET Plasmid Miniprep Kit de ThermoFisher Scientific, con el propósito de obtener DNA plasmídico de alta pureza y libre de RNA.

Este kit se fundamenta en la realización de una etapa de lisis alcalina utilizando 1.5-3 mL de cultivo bacteriano en presencia de SDS para precipitar el DNA cromosómico y liberar el DNA plasmídico. Después de neutralizar el lisado, se separan las proteínas y los restos celulares por centrifugación. El sobrenadante se transfiere a una columna de sílice donde el DNA plasmídico se une. Tras varios lavados para eliminar sales, metabolitos y otros componentes celulares, el DNA plasmídico se extrae con agua Milli-Q.

El plásmido purificado obtenido mediante este procedimiento puede ser utilizado en otros métodos como la digestión con enzimas de restricción, PCR, transformación y secuenciación automática.

Midipreps de DNA plasmídico

En este caso, el objetivo es obtener cantidades significativas de DNA plasmídico de alta pureza y libre de endotoxinas. Para ello, se inocula 1 mL de cultivo de bacterias transformadas con el plásmido de interés en 500 mL de medio LB líquido suplementado con los antibióticos de selección, y se incuba a 37 °C con agitación a 200 rpm durante toda la noche.

Después de este periodo, el cultivo se centrifuga a 7000 rpm durante 10 minutos a 4 °C para obtener un sedimento de bacterias, el cual se resuspende en solución I (25 mM Tris-HCl, pH 8; 10 mM EDTA). A

MATERIALES Y MÉTODOS

continuación, se lisan las bacterias con la solución de lisis II (0.4 M NaOH, 0.1 % (p/v) SDS) y luego se neutralizan añadiendo solución de neutralización III (acetato potásico 3 M, pH 5) y se centrifugan a 7000 rpm 15 minutos.

El sobrenadante se filtra, se añaden 0.6 volúmenes de isopropanol y se centrifuga nuevamente durante 15 minutos a 10000 rpm. El pellet se resuspende en solución I, se adiciona LiCl 5 M para eliminar las toxinas, luego se centrifuga a 7000 rpm durante 15 minutos. A continuación, se incuba con 20 µg/mL de RNAsa A durante 30 minutos a 37 °C y se añade 13 % polietilenglicol 8000 en NaCl 1,6 M y se centrifuga a 13500 rpm durante 30 minutos a 4 °C.

El precipitado de DNA se resuspende con solución I y se extrae dos veces con solución fenol-cloroformo (1:1) a pH 8 y una vez con cloroformo. A la fase acuosa se le ha adicionado acetato amónico 7,5 M. Finalmente, se añaden dos volúmenes de etanol absoluto, se centrifuga 15 minutos a 13500 rpm a 4 °C, y el DNA plasmídico se lava con etanol al 70 % y se resuspende en agua Milli-Q.

5.2.3.2 Cuantificación de DNA

Método fluorimétrico

Este método se basa en el uso del reactivo comercial Hoechst 33258, que tiene la capacidad de intercalarse en la doble hebra del DNA y producir fluorescencia. La intensidad de esta fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de DNA presente en la muestra.

En una primera etapa, se construye una curva estándar utilizando cantidades crecientes de DNA de esperma de salmón, con valores comprendidos entre 1-5 µg/mL. El DNA se mezcla con reactivo Hoechst y tampón Tris salino EDTA (0.2 M NaCl; 10 mM Tris-HCl; 1mM EDTA, pH 7,4) y se mide la fluorescencia utilizando una longitud de onda de excitación de 365 nm y una emisión de 460 nm. La concentración de DNA en la muestra problema se determina mediante la interpolación de los valores de fluorescencia obtenidos en la curva estándar.

Cuantificación espectrofotométrica

Para realizar medidas directas de la concentración de ácidos nucleicos, se emplea el dispositivo *NanoVue Plus* (GE Healthcare). El

procedimiento comienza con dos mediciones utilizando agua destilada como referencia, con el fin de establecer el punto de calibración en cero. Posteriormente se cargan 2 μL de la muestra en el equipo y se mide su densidad óptica a 260 nm.

5.2.3.3 Digestión con endonucleasas de restricción

Las endonucleasas de restricción son enzimas que tienen la capacidad de identificar y cortar secuencias específicas de DNA, generando una serie de fragmentos más pequeños. Estas enzimas se encuentran en una amplia variedad de especies bacterianas y su función biológica es reconocer y cortar el DNA que no pertenece a la bacteria en cuestión, como el DNA de un bacteriófago, por ejemplo. Existen numerosas endonucleasas de restricción, cada una con una secuencia de reconocimiento única. Estas enzimas constituyen una poderosa herramienta empleada en biotecnología para el corte y la manipulación del DNA en estudios de investigación, clonación de genes, análisis genético y otras aplicaciones relacionadas con la manipulación del material genético.

Para llevar a cabo la digestión del DNA utilizando enzimas de restricción, se han seguido las indicaciones proporcionadas por el fabricante (ThermoFisher Scientific). En general, se ha utilizado una cantidad de DNA de 0,1-0,5 μg , 1 μL de tampón de digestión *Fast Digest* 10x y 10 U/ μg de DNA de la enzima de restricción, en un volumen final de 10 μL . Las digestiones se han realizado incubando la mezcla a 37 °C en un termobloque durante 5-15 minutos.

5.2.3.4 Electroforesis de DNA en geles horizontales de agarosa

Con este método, es posible separar y observar moléculas de DNA de diferentes tamaños.

Se elabora un gel de agarosa utilizando un tampón TAE (40 mM Tris; 0,11 % (v/v) ácido acético glacial; 1 mM EDTA- Na_2 pH 8) y 0.3 μL de bromuro de etidio. El porcentaje de agarosa utilizado varía según el tamaño de los fragmentos a separar y la resolución deseada. En este caso, para llevar a cabo este trabajo, se utilizó un rango de agarosa del 0,8-2 % (p/v).

Posteriormente, el gel se sumerge en una solución de tampón TAE y las muestras se preparan mezclando el DNA con el tampón de 6x *Loading*

MATERIALES Y MÉTODOS

Dye (ThermoFisher Scientific) en una proporción 5:1 (v/v). Luego, se aplica un voltaje que oscila entre 70-100 V durante 30 minutos.

El bromuro de etidio es un colorante intercalante comúnmente utilizado para teñir DNA en geles de agarosa y permitir su visualización bajo luz ultravioleta. Una vez que haya transcurrido la electroforesis, el gel se procesa con el sistema Chemidoc MP, el cual nos permite la visualización y obtención de una fotografía del gel.

El tamaño de los fragmentos se determinó utilizando marcadores de peso molecular como *Lambda DNA/ EcoRI+ Hind III Marker* o *100 pb DNA Ladder* (ThermoFisher Scientific).

5.2.3.5 Ligación de DNA

Para la reacción de ligación de los fragmentos de DNA obtenidos por digestión con enzimas de restricción o como producto de una reacción de PCR se utilizó la enzima T4 DNA ligasa (ThermoFisher Scientific), siguiendo las indicaciones del fabricante. Generalmente, se preparó una mezcla del plásmido lineal con extremos compatibles y el inserto en una proporción molar 1:3, 5 unidades de T4 DNA ligasa y 2 μL de *Ligation Buffer 10x* (ThermoFisher Scientific) en un volumen final de 20 μL y se incubó durante toda la noche a 10 °C. La mezcla resultante se empleó directamente para la transformación de células competentes o se almacenó a -20 °C para su posterior uso.

5.2.3.6 Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica que permite replicar y amplificar secuencias específicas de DNA de cadena doble de forma exponencial. En este proceso intervienen una pareja de oligonucleótidos que hibridan de forma específica en el DNA, el cuál actúa como molde, y una polimerasa termorresistente que incorpora desoxirribonucleótidos libres presentes en la mezcla de reacción para generar nuevas hebras de DNA.

En nuestro caso, esta técnica se llevó a cabo utilizando un termociclador GeneAmp PCR system 9700 (Perkin Elmer). Por lo general, las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 50 μL que contenía: 10x Pfu Buffer o *Dream Taq Buffer*, 0,2 mM de desoxirribonucleótidos, 0,1 μM de los oligonucleótidos sentido y

antisentido, 50 pg-1 µg de DNA de interés y 1,25 U de DNA polimerasa Pfu o Taq.

La reacción se llevó a cabo en cinco etapas detalladas de la siguiente manera: primero, se realizó un ciclo inicial de activación de la polimerasa a 94 °C durante 5 minutos. Luego, se llevaron a cabo aproximadamente treinta ciclos, cada uno compuesto por tres fases: I) desnaturalización a 94 °C durante 20 segundos, II) hibridación durante 30 segundos, y III) amplificación a 72 °C. Finalmente, se realizó un último ciclo de extensión a 72 °C para asegurar la síntesis de todos los fragmentos iniciados.

La temperatura de hibridación se ajustó en función de la temperatura media de fusión de los cebadores utilizados, calculada mediante el programa informático Serial Cloner 2.6.1. La duración de la etapa de extensión se determinó según la longitud del fragmento a amplificar, siguiendo la norma general de 1 minuto por cada kilobase.

5.2.3.7 Secuenciación de DNA

La secuenciación de DNA se realizó en el Servicio de Secuenciación Automática del Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra (CSIC Granada) utilizando un secuenciador modelo 373 STRECHT de Applied Biosystems. Para la reacción de extensión, se utilizó la enzima AmpliTaq® FS DNA polimerasa y didesoxinucleótidos marcados con cromóforos fluorescentes de forma diferencial. En cada reacción de secuenciación, se utilizaron 300-500 ng de DNA puro y 6,4 pM de oligonucleótidos, todo ello en un volumen final de 12 µL.

5.2.3.8 Extracción de RNA

Para la extracción de RNA total de cultivos celulares se utilizó el kit comercial *GeneJet RNA Purification Kit* (ThermoFisher Scientific).

En este procedimiento, las muestras se tratan y homogeneizan en un tampón que contiene tiocianato de guanidinio, el cual previene la actividad de las RNAsas endógenas. Posteriormente, el lisado se mezcla con etanol y se introduce en una columna de purificación. La combinación de tiocianato de guanidinio y etanol facilita la unión del RNA a una membrana de sílice presente en la columna durante el paso del lisado a través de esta. A través de varios lavados, se eliminan las impurezas

MATERIALES Y MÉTODOS

restantes, y finalmente, el RNA puro se eluye bajo condiciones de baja fuerza iónica utilizando agua destilada libre de nucleasas.

5.2.3.9 Cuantificación de RNA

Se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito en la sección "*Cuantificación espectrofotométrica de DNA*" del apartado 5.2.3.2.

Para evaluar la pureza de la muestra, se realizaron medidas de densidad óptica a longitudes de onda de 260 y 280 nm. A continuación, se calculó la relación A260/A280. Un valor por debajo de 1,6 indica la presencia de contaminación con proteínas, mientras que valores superiores a 1,8 se consideran indicativos de una muestra pura. En nuestro caso, la relación A260/A280 siempre resultó en valores cercanos a 2,0, lo que sugiere una alta pureza de la muestra.

5.2.3.10 Electroforesis de RNA en geles horizontales de agarosa

Los métodos espectrofotométricos son útiles para evaluar la pureza de la muestra, pero no sobre su integridad. Para evaluar la integridad del RNA, es necesario realizar una electroforesis y analizar la relación entre las bandas 28S y 18S del RNA ribosomal. Se considera que el RNA está intacto cuando la intensidad de la banda de 28S es el doble que la de 18S. Sin embargo, dependiendo de los experimentos que se vayan a realizar, también pueden considerarse válidos valores de dicha relación inferiores a dos [493].

Las electroforesis se llevaron a cabo utilizando el método descrito por [494]. Este método implica agregar pequeñas cantidades de lejía comercial al gel de agarosa durante su preparación. El hipoclorito sódico actúa como un agente desnaturalizante del RNA y elimina cualquier RNasa que pueda estar presente en el gel.

Se preparó un gel de agarosa al 1 % (p/v) en tampón TAE (40 mM Tris; 0.11 % (v/v) ácido acético glacial, 1 mM EDTA-Na pH 8), 2 % (v/v) de lejía comercial (con menos del 5 % de hipoclorito sódico) y 0,25 µg/mL de bromuro de etidio. Las muestras se prepararon mezclando 500 ng de RNA, tampón de 6x *Loading Dye* (ThermoFisher Scientific) en una proporción 5:1 (v/v) y agua destilada libre de RNasas hasta un volumen final de 6 µL.

La electroforesis se llevó a cabo a 100 V durante 30 minutos en tampón TAE, y los resultados se visualizaron con el procesador de imágenes Chemidoc MP.

5.2.3.11 Retrotranscripción de RNA

Este proceso implica la generación de cDNA a partir de una muestra de RNA. Esto se logra mediante el uso de una enzima derivada de la transcriptasa inversa de M-MuLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*) y oligonucleótidos que se unen de manera complementaria a la secuencia del RNA.

En organismos eucariotas, el mRNA presenta colas de poliadenina (poliA) en su extremo 3', las cuales pueden unirse a un oligonucleótido rico en nucleótidos de timina (oligo (dT)). La acción de la transcriptasa inversa genera copias de todas las moléculas de mRNA presentes en la muestra. Otra alternativa es utilizar oligonucleótidos específicos que se hibridan solo con el mRNA producido a partir de un gen particular, permitiendo una transcripción inversa selectiva. También es posible emplear una combinación de oligonucleótidos cortos con secuencias aleatorias (*random primers*), los cuales se unen a múltiples regiones de los mRNA en la muestra.

Esta técnica se realizó siguiendo las instrucciones proporcionadas en el kit *iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR* (Bio-Rad) utilizando 1 µg de RNA total por muestra. La mezcla se incubó a 25 °C durante 5 minutos, 42 °C durante 60 minutos y 95 °C durante 5 minutos en un termociclador.

5.2.3.12 PCR cuantitativa o PCR en tiempo real

El objetivo de la qPCR es detectar y cuantificar la presencia de ciertas secuencias de ácidos nucleicos en una muestra. Para lograrlo, se amplifica una secuencia de interés, similar a lo que se haría en una PCR convencional (ver 5.2.3.7). Sin embargo, en la qPCR se monitorea el progreso de la amplificación utilizando una sonda fluorescente. La velocidad con la que se alcanza un umbral de fluorescencia determinado está relacionada con la cantidad original de la secuencia de interés presente en la muestra.

Además, es posible caracterizar el producto final mediante un aumento gradual de temperatura. Esto permite crear curvas de

MATERIALES Y MÉTODOS

disociación, también conocidas como *melting curves*, que muestran un perfil de desnaturalización específico dependiente de la longitud y secuencia de nucleótidos que conforman el producto [495].

En nuestros experimentos, llevamos a cabo las reacciones utilizando un dispositivo CFX Connect™ de Bio-Rad, que permite la PCR en tiempo real con detección de señal fluorescente (SYBR Green) después de cada ciclo de amplificación. El cDNA obtenido, como se describe en 5.2.3.12, se utilizó como molde en un volumen final de reacción de 10 μ L. Esta reacción incluyó 5 μ L de 2x SsoAdvanced™ Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad) y 500 nM de cada oligonucleótido (consultar **Error! Reference source not found.3**).

La qPCR se llevó a cabo de la siguiente manera: inicialmente, se realizó una etapa de desnaturalización a 95 °C durante 2 minutos, seguida de cuarenta ciclos que constaban de dos fases: una a 95 °C durante 15 segundos y otra que variaba la temperatura entre 53 °C y 57 °C durante 30 segundos. Posteriormente, se completó con una curva de disociación, donde la temperatura aumentó gradualmente a una velocidad de aproximadamente 0,1 °C/s, abarcando desde 65 °C hasta 95 °C, y se midió la fluorescencia en intervalos de 0,5 °C.

Se realizaron triplicados de cada muestra, y se calculó la expresión relativa del gen utilizando el método $2\Delta\text{Ct}$, empleando β -actina como gen de referencia interno.

5.2.3.13 Vectores de expresión de MEF2D y construcciones de genes reporteros

La secuencia codificante de MEF2D de rata se amplificó a partir de cDNA de células musculares de rata utilizando la polimerasa *Pfu* y los oligonucleótidos MEF2Df y MEF2Dr (ver Tabla 4), los cuales incluyen los sitios de restricción *Bgl*II y *Sal*I. El producto de PCR se clonó en el vector pJET 1.2 (Thermo Fisher Scientific) y luego se digirió con enzimas de restricción para su inserción en el vector de expresión eucariota pEGFP-C1 (Clontech Laboratories), generando el plásmido pEGFP-MEF2D. Este plásmido codifica una proteína de fusión GFP-MEF2D que se localiza en el núcleo celular. Para la expresión eucariota exclusiva de MEF2D, el mismo inserto se clonó en el plásmido pEGFP-N3, denominándose pMEF2D. Dado que el oligonucleótido reverso utilizado para la amplificación contiene una señal de STOP, solo se traduce la proteína MEF2D a partir de este plásmido.

Para analizar la transcripción dependiente de MEF2D en células que no expresan la proteína MEF2D (células CHO-k1), el plásmido pMEF2D se cotransfectó con pMEF2x4 Eb1 Luc (gentileza del Prof. Brian Black, UCSF, USA), un plásmido que contiene cuatro copias del dominio de unión de MEF2 en tándem [486]. Para desarrollar un sistema reportero de transcripción independiente del contexto celular (células Neuro2a y SH-SY5Y), se utilizaron los plásmidos pCMV-BD y pFR-Luc (del kit Mammalian Two-Hybrid Assay Kit, Stratagene). El inserto pMEF2D se digirió con *Bgl*II y *Sal*I y se clonó en el plásmido pCMV-BD para crear el plásmido pCMV-BD-MEF2D, que expresa el dominio de unión al DNA de GAL4 fusionado con MEF2D. Para este plásmido, las células se cotransfectaron con un plásmido pFR-Luc que contiene cuatro copias del dominio de unión de GAL4 de levadura en tándem.

La mutagénesis dirigida en los plásmidos pEGFP-MEF2D, pMEF2D o pCMV-BD-MEF2D se realizó según métodos descritos previamente [496] para introducir mutaciones en la secuencia codificante de MEF2D. Los oligonucleótidos utilizados para la mutagénesis dirigida del sitio están listados en la Tabla 4. La secuencia de los plásmidos generados se confirmó mediante secuenciación automática utilizando primers universales.

Un resumen de las diferentes construcciones plasmídicas se presenta en la Tabla 2.

5.2.4. Técnicas para el análisis de proteínas

5.2.4.1 Preparación de extractos proteicos

Las células se cultivaron hasta alcanzar la confluencia. Luego, se retiró el medio de cultivo de la placa y se lavó dos veces con PBS. Para lisar las células, se añadieron 30 μ L de tampón de lisis RIPA suplementado con inhibidores de fosfatasa y proteasas (50 mM Tris-HCl, pH 8; 150 mM NaCl; 1 % (v/v) Nonidet P-40; 0,1 % (p/v) SDS; 1 % (p/v) desoxicolato sódico; 5 mM EDTA; 1 mM PMSF; 10 mM NaF; 10 mM pirofosfato sódico; 1 mM ortovanadato sódico; 1 mM EGTA; 20 nM ácido okadaico; 10 mg/mL aprotinina; 10 mg/mL leupeptina; 10 mg/mL pepstatina y 10 % (v/v) cóctel inhibidor de proteasas (P8340, Sigma-Aldrich, Madrid, España). A continuación, se raspó la placa y se transfirió el contenido a un tubo de 1,5 mL.

Los tubos se incubaron en hielo durante 10 minutos y posteriormente la suspensión de células se sometió a sonicación con 20

MATERIALES Y MÉTODOS

pulsos a 0.5 ciclos y 50 % de amplitud. Finalmente se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo.

5.2.4.2 Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas se determinó mediante el método del ácido bicinónico [497]. Para ello, se utilizó un reactivo A (2 % (p/v) $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,16 % (p/v) tartrato sódico; 0,4 % (p/v) NaOH; 0,95 % (p/v) NaHCO_3) y un reactivo B (4 % (p/v) $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) que se mezclan en proporción 49:1. Con esta mezcla, se preparó una disolución al 1 % (p/v) de la sal disódica hidratada del ácido bicinónico (solución de trabajo).

Por otra parte, se pipetearon alícuotas de las muestras por duplicado en una microplaca de 96 pocillos, junto con volúmenes crecientes de una disolución de BSA de concentración conocida para la elaboración de una curva estándar. Luego, se añadieron 150 μL de la solución de trabajo y se incubó a 37 °C durante 30 minutos.

Finalmente, se midió la densidad óptica a 595 nm en un lector de placas. Los valores obtenidos para las muestras se interpolan en la recta patrón para conocer la concentración de proteínas.

5.2.4.3 Western blot

Es una técnica fundamental para la detección y análisis de proteínas específicas en una muestra compleja. Se basa en la separación de las proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida, su transferencia a una membrana y la posterior detección mediante anticuerpos específicos. El protocolo se divide en varias etapas que se describen a continuación.

Preparación de muestras

Para preparar las muestras, se toma un volumen correspondiente a 30 μg de proteínas y se mezcla con tampón de carga 2x (200 mM Tris-HCl, pH 6,8; 2 % (p/v) SDS; 20 % (v/v) glicerol; 5 % (v/v) β -mercaptoetanol; 0,1 % (p/v) azul de bromofenol). La mezcla se calienta a 95 °C durante 5 minutos y se centrifuga a 16000 RCF durante 1 minuto. El calentamiento y la composición del tampón de carga favorecen la desnaturalización de las proteínas.

Electroforesis vertical en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La electroforesis de proteínas se realiza generalmente en geles de poliacrilamida, los cuales son polímeros entrecruzados que permiten la separación de proteínas según su peso molecular. Estos geles constan de dos partes: el gel de resolución y el gel de compactación, cuya composición de ambos se detalla en la Tabla 6.

	Gel de resolución	Gel de compactación
Acrilamida/bisacrilamida	10-15 % (p/v)	4 % (p/v)
Tris-HCl, pH 8,8	0,375 M	---
Tris-HCl, pH 6,8	---	0,125 M
TCE	0.5 % (v/v)	---
SDS	0,1 % (p/v)	0,1 % (p/v)
APS	0,05 % (p/v)	0,05 % (p/v)
TEMED	0,05 % (v/v)	0,1 % (v/v)

Tabla 6. Composición de geles de poliacrilamida

Uno de sus componentes clave es el SDS, un detergente cuyas moléculas tienen carga negativa. El SDS se une a las proteínas en proporción al peso molecular de la macromolécula. Al unirse, el detergente agrega una carga neta negativa, lo que hace que la carga intrínseca de la proteína sea insignificante. Además, la mayoría de las proteínas se desnaturalizan cuando se fija el SDS adoptando una conformación y razón carga/masa similares. En estas condiciones, las proteínas se separan exclusivamente según su peso molecular.

MATERIALES Y MÉTODOS

El gel se sumerge en tampón Tris glicina SDS pH 8,3 (25 mM Tris; 192 mM glicina; 0,1 % (p/v) SDS), y las muestras y un marcador de peso molecular se cargan en los pocillos del gel de compactación. Se aplica un voltaje de 150 V durante aproximadamente una hora, ajustando el tiempo según la concentración de acrilamida en el gel y del tamaño de las proteínas de interés.

Detección de proteínas en geles de poliacrilamida

El 2,2,2-Tricloroetanol (TCE) es una alternativa a la tinción tradicional con Coomassie Brillante de Coomassie para la detección de proteínas en geles de poliacrilamida. Se incorpora al gel antes de la polimerización y permite visualizar las proteínas de forma fluorescente en menos de 5 minutos, eliminando la necesidad de pasos adicionales de tinción y decoloración.

Los triptófanos presentes en las proteínas reaccionan con el TCE bajo luz ultravioleta, generando una señal fluorescente visible. Esta fluorescencia se puede detectar con un transiluminador de 300 nm. La adición de TCE permite visualizar las proteínas tanto en el gel como después de transferirlas a una membrana durante el *Western Blot*, sin interferir con la electroforesis ni con los pasos posteriores [498].

Este método también permite realizar una normalización por la cantidad total de proteína presente en cada calle. La normalización es un paso crucial en el *Western Blot* para obtener datos cuantitativos [499].

Finalizada la electroforesis, se extrae el gel de la cubeta. Se depositan unos mililitros de agua en el centro de la bandeja de muestras del equipo ChemiDoc MP y se coloca el gel con cuidado. Se activa la función *Stain-free gel* durante 1 minuto. Posteriormente, se retira el gel de la bandeja y se continúa con el paso de transferencia de forma inmediata. Es fundamental mantener el gel hidratado en todo momento y manipularlo con guantes y pinzas limpias para evitar contaminarlo.

Transferencia de proteínas

Las proteínas se transfieren desde el gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa o PVDF. Este proceso se llevó a cabo utilizando el dispositivo *Trans-Blot Turbo Transfer System* de Bio-Rad, siguiendo las instrucciones del fabricante. La transferencia se realiza a 25 V/1 A durante 30 minutos. El tampón de transferencia utilizado tiene una composición 25 mM Tris; 0,2 M glicina; 20 % (v/v) metanol y un pH 8,3.

Eficiencia y calidad de la transferencia de proteínas

Este paso es crucial para verificar la eficiencia de la transferencia de proteínas antes de avanzar con el resto del protocolo.

Finalizada la transferencia, se coloca la membrana en la bandeja de muestras del equipo ChemiDoc MP, repitiendo el procedimiento utilizado con el gel. Se activa la función *Stain free Blot* y se captura la imagen. Si la transferencia se ha realizado correctamente, se continúa con el procedimiento. Se retira la membrana de la bandeja y se procede con el proceso de incubación con anticuerpos.

Incubación con anticuerpos

Para bloquear los sitios de unión inespecíficos, se introduce la membrana en un tubo cónico tipo Falcon de 50 mL y se añaden 5 mL de la solución de bloqueo. Esta solución puede ser leche desnatada en polvo 5 % (p/v) o BSA 5 % (p/v) en un tampón Tris salino (TBS) con Tween (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl; 0.1 % (v/v) Tween 20). Se coloca el tubo en un rotador de tubos durante una hora a temperatura ambiente.

Luego, se retira la solución de bloqueo y se agrega el anticuerpo específico (anticuerpo primario) diluido en la proporción adecuada en solución de bloqueo fresca. Se coloca el tubo con la membrana en el rotador de tubos y se incuba durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente, se lava la membrana con TBS-Tween 4 veces durante 5 minutos con rotación continua a temperatura ambiente.

El siguiente paso consiste en incubar la membrana con el anticuerpo secundario, el cual se une al anticuerpo primario y está conjugado con un fluoróforo para permitir la visualización de la banda específica. Se sumerge la membrana en una disolución adecuada del anticuerpo secundario en solución de bloqueo y se mantiene en rotación durante 1 hora a 4 °C en la oscuridad. Nuevamente se lava la membrana como se hizo tras la incubación con el anticuerpo primario y se realiza un último lavado con TBS, en este caso sin Tween, durante 5 minutos.

Adquisición de imágenes y análisis de datos

La imagen de la membrana se captura con el equipo ChemiDoc MP y se analiza con el software ImageLab. Se realiza la normalización por la cantidad total de proteína o con una proteína de referencia.

5.2.4.4 Ensayo de degradación de proteínas

La cicloheximida, un inhibidor de la biosíntesis de proteínas se ha convertido en una herramienta invaluable para estudiar la estabilidad de proteínas en células eucariotas. Su mecanismo de acción, que consiste en prevenir la elongación translacional, la convierte en un compuesto ideal para determinar la vida media de proteínas específicas [500].

En este estudio, se utilizaron células SH-SY5Y y Neuro2a transfectadas con plásmidos que permiten la expresión de GFP solo o en combinación con MEF2D de tipo salvaje (pEGFP-MEF2D) o mutado (pEGFP-MEF2D-TOP K439R y pEGFP-MEF2D-TOP S121A).

Después de 24 horas de transfección, las células fueron incubadas en DMEM suplementado con FBS al 10 % (v/v) para las células Neuro2a y al 15 % para las células SH-SY5Y. Las incubaciones se realizaron en ausencia o presencia de 0.25 mM o 1 mM de Na_2WO_4 y 100 μM de cicloheximida durante un período de 24 horas.

Las imágenes se tomaron a las 1, 3, 6, 12 y 24 horas de incubación, y la intensidad de fluorescencia de GFP fue cuantificada utilizando el software ImageJ.

5.2.4.5 Determinación de la síntesis de proteínas

Las células Neuro2a se sembraron en placas de 48 pocillos, se incubaron en medio de diferenciación durante 24 horas (ver 5.1.3.2) y luego se mantuvieron en medio sin FBS 16-18 horas. Posteriormente, se reemplazó el medio por el habitual con 10 % (v/v) FBS suplementado con 0,8 mM Tyr y en presencia o ausencia de 1 mM Na_2WO_4 .

Las células se cultivaron en estas condiciones durante 2 horas, tras lo cual se añadió 1 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ de L-(ring-3,5- ^3H)-Tyr (Perkin Elmer). Después de 1 hora, la reacción se detuvo colocando las placas sobre hielo. Inmediatamente, los pocillos se lavaron dos veces con PBS frío suplementado con 2 mM Tyr (PBS-Tyr).

Las células se lisaron con una solución de 0,1 mM NaOH/0,1 % (p/v) desoxicolato sódico y las proteínas se precipitaron añadiendo 20 % (v/v) TCA. La mezcla se transfirió a tubos de 1,5 mL, se incubó a 4 °C durante 15 minutos y se centrifugó a 16000 RCF durante 10 minutos.

MATERIALES Y MÉTODOS

El sedimento se lavó una vez con 10 % (v/v) TCA y las proteínas precipitadas se resuspendieron en 0,1 mL de 1 M NaOH. Se reservó una alícuota de 5 μ L para la cuantificación de proteínas (ver 5.2.4.2) y el resto se neutralizó con 1 M HCl y mezclándose luego con 4 mL de líquido de centelleo Ready Safe (Beckman Coulter).

Las muestras se analizaron en un contador de centelleo LS 6000 (Beckman Coulter) y los datos se expresaron como dpm/ μ g de proteína.

RESULTADOS

6 RESULTADOS

Nuestro equipo de investigación ha demostrado previamente los efectos beneficiosos del Na_2WO_4 en el músculo esquelético, destacando su capacidad para aumentar la captación de glucosa y mejorar el recambio proteico aumentando la síntesis proteica y disminuyendo su degradación [2, 3]. Considerando que el Na_2WO_4 puede atravesar la BHE, hemos explorado su potencial terapéutico en células del sistema nervioso. En este contexto, evaluamos la capacidad del Na_2WO_4 para promover la diferenciación y plasticidad neuronal, así como su potencial neuroprotector. Nuestros resultados contribuyen a comprender mejor el papel de esta molécula en la plasticidad neuronal y abren nuevas vías para el desarrollo de tratamientos para enfermedades neurodegenerativas.

El uso modelos *in vitro* ha mejorado significativamente la neurobiología y la neurociencia. Las células en cultivo permiten la caracterización de las funciones de proteínas y genes, así como los mecanismos moleculares subyacentes a fenómenos específicos, constituyendo una poderosa herramienta para comprender mejor la patología de las enfermedades y realizar evaluaciones preliminares de ensayos farmacológicos. En neurobiología, los modelos de cultivos celulares más comúnmente utilizados incluyen cultivos neuronales primarios derivados de rata y ratón y líneas celulares de neuroblastoma, como las células de rata B35, las células de ratón Neuro2a [501-503], las células de rata PC12 y las células humanas SH-SY5Y [504-506].

Para esta investigación, seleccionamos las líneas celulares Neuro2a y SH-SY5Y, que tienen la capacidad de diferenciarse parcialmente cuando se cultivan en un medio de diferenciación con restricción de FBS. Estas dos líneas celulares se utilizaron como modelos para estudiar los efectos del Na_2WO_4 sobre la proliferación y diferenciación de neuritas, así como las bases moleculares involucradas en estos procesos. Al utilizar dos líneas celulares, evitamos los efectos que podrían deberse a la idiosincrasia específica de una única línea celular. Cabe destacar que los resultados fueron consistentes tanto en las células Neuro2a como en las SH-SY5Y.

RESULTADOS

6.1 Efecto del Na_2WO_4 en la diferenciación de células Neuro2a y SH-SY5Y

6.1.1 Efecto del Na_2WO_4 en el crecimiento de neuritas

La estimulación del crecimiento de neuritas es un parámetro crucial en el desarrollo neuronal y un indicador valioso para evaluar compuestos con actividad neurotrófica [507, 508]. Por ello, en primer lugar, evaluamos el efecto del Na_2WO_4 sobre la diferenciación neuronal en las líneas celulares Neuro2a (Figura 24) y SH-SY5Y (Figura 25). Estas células fueron cultivadas en un medio de diferenciación suplementado con distintas concentraciones de Na_2WO_4 , observándose los cambios morfológicos durante 48 y 72 horas.

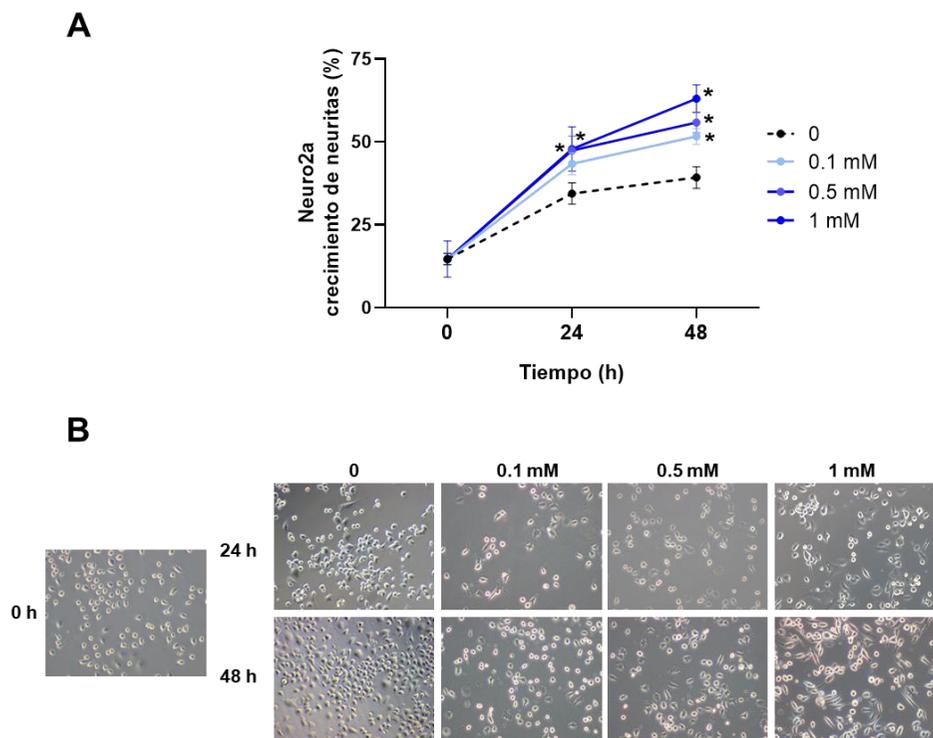


Figura 18. El Na_2WO_4 aumenta el crecimiento de neuritas en las células Neuro2a.

Las células fueron cultivadas en medio de diferenciación con concentraciones crecientes de Na_2WO_4 durante 48 h. (A) Se realizó el recuento de neuritas a las 0, 24 y 48 h. Los datos se expresaron como el porcentaje de células con neuritas respecto al número total de células. (B) Las imágenes muestran ejemplos representativos del estado de los cultivos en los tiempos en que se realizaron los recuentos de neuritas. Los resultados representan la media \pm S.E.M. (n=8). * $p < 0.05$ comparando células incubadas con Na_2WO_4 vs células control.

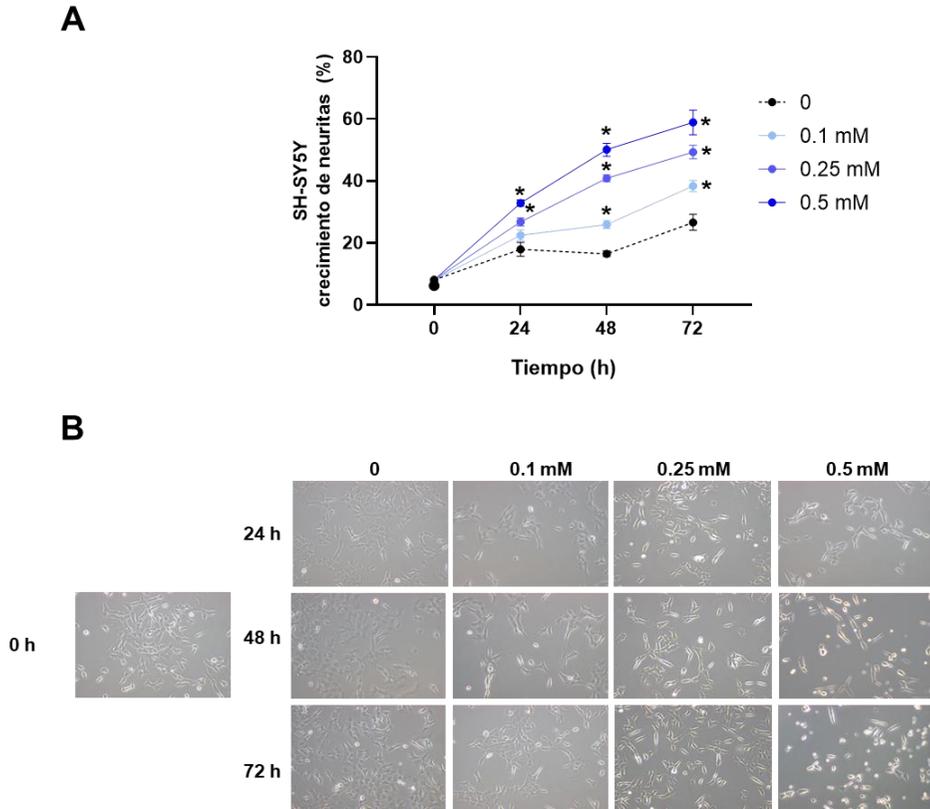


Figura 19. El Na_2WO_4 aumenta el crecimiento de neuritas en las células SH-SY5Y.

Las células fueron cultivadas en medio de diferenciación con concentraciones crecientes de Na_2WO_4 durante 72 h. **(A)** Se realizó el recuento de neuritas a las 0, 24, 48 y 72 h. Los datos se expresaron como el porcentaje de células con neuritas respecto al número total de células. **(B)** Las imágenes muestran ejemplos representativos del estado de los cultivos en los tiempos en que se realizaron los recuentos de neuritas. Los resultados representan la media \pm S.E.M. (n=8). * $p < 0.05$ comparando células incubadas con Na_2WO_4 vs células control.

RESULTADOS

Se observó que, mientras la mayoría de las células no tratadas mostraban una forma redondeada sin extensión de neuritas, las células tratadas con Na_2WO_4 presentaban una formación extensa de neuritas bajo microscopía de contraste de fases (Figura 24 Neuro2a, Figura 25 SH-SY5Y). El crecimiento de neuritas inducido por Na_2WO_4 mostró una dependencia de la concentración en ambos tipos celulares (Figura 24 Neuro2a, Figura 25 SH-SY5Y). La dosis de Na_2WO_4 que mostró una respuesta significativa fue de 1 mM en células Neuro2a y de 0.25 mM en células SH-SY5Y. Además, los tiempos de incubación requeridos para observar estos efectos en el crecimiento de neuritas fueron de 24-48 horas para Neuro2a y de 72 horas para SH-SY5Y. Estas dosis y tiempos de incubación se emplearon en los experimentos posteriores.

6.1.2 Efecto del Na_2WO_4 en el ciclo celular.

La diferenciación neuronal, un proceso esencial para el desarrollo del sistema nervioso, implica la salida del ciclo celular y la formación de neuritas [509, 510].

Para determinar si la diferenciación observada en las células tratadas con Na_2WO_4 está relacionada con cambios en la progresión del ciclo celular, las dos líneas celulares de neuroblastoma fueron incubadas en ausencia o presencia de este efector. La incubación con Na_2WO_4 durante 48 horas (células Neuro2a) o 72 horas (células SH-SY5Y) promovió un aumento en la fase G0/G1 paralelo a una disminución en la fase G2, indicando la entrada en el proceso de diferenciación. Las células progenitoras neurales experimentan un ciclo celular más largo antes de entrar en la diferenciación, lo cual generalmente se atribuye a una fase G1 extendida, ya que los progenitores cambian de un modo de división proliferativa a neurogénesis [511]. Además, en presencia de Na_2WO_4 , la fase de síntesis se mantuvo para permitir un crecimiento activo de neuritas (Figura 26 Neuro2a, Figura 27 SH-SY5Y).

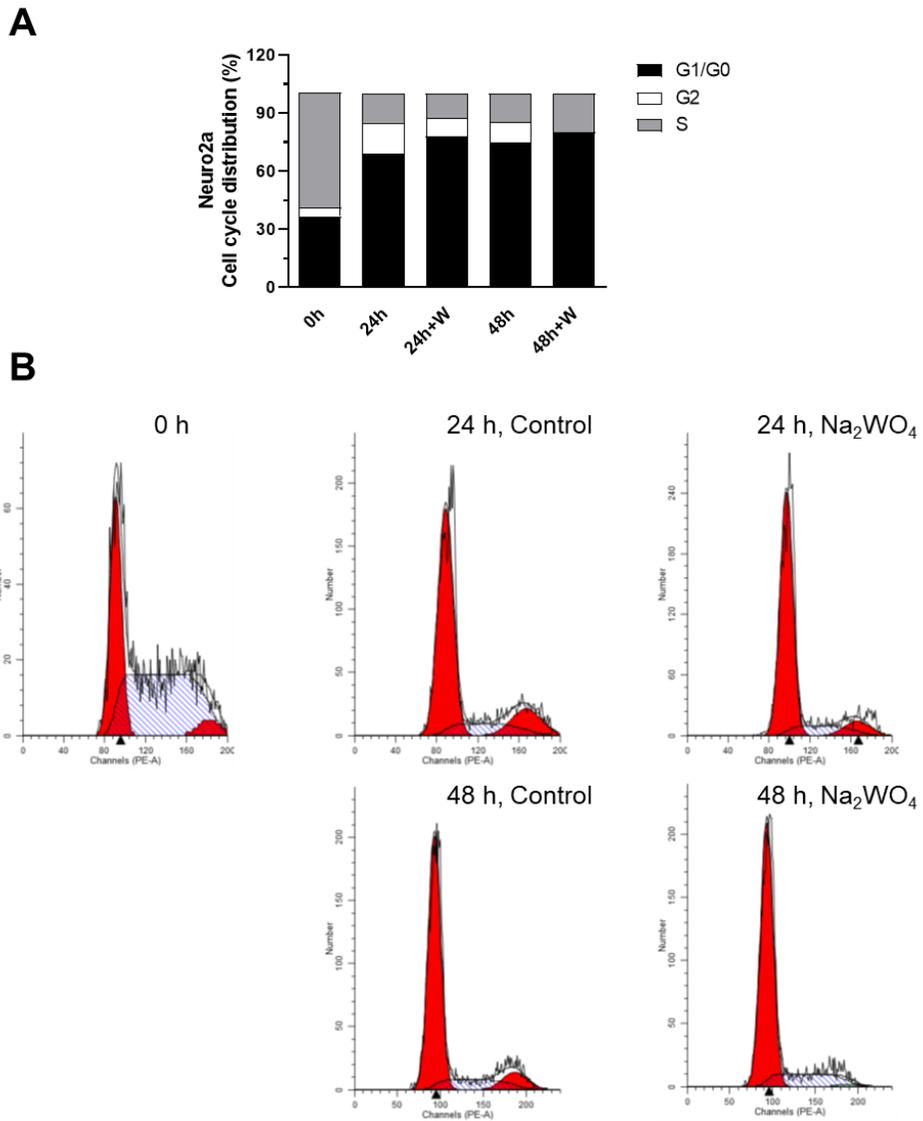


Figura 20. El Na₂WO₄ induce a la diferenciación neuronal al reprogramar el ciclo celular en células Neuro2a. Las células Neuro2a fueron cultivadas en medio de diferenciación y en presencia o ausencia de 1 mM Na₂WO₄ durante 48 h. (A) Representación gráfica del ciclo celular en las distintas condiciones experimentales (B). Análisis del ciclo celular por citometría de flujo. Histogramas de fluorescencia

RESULTADOS

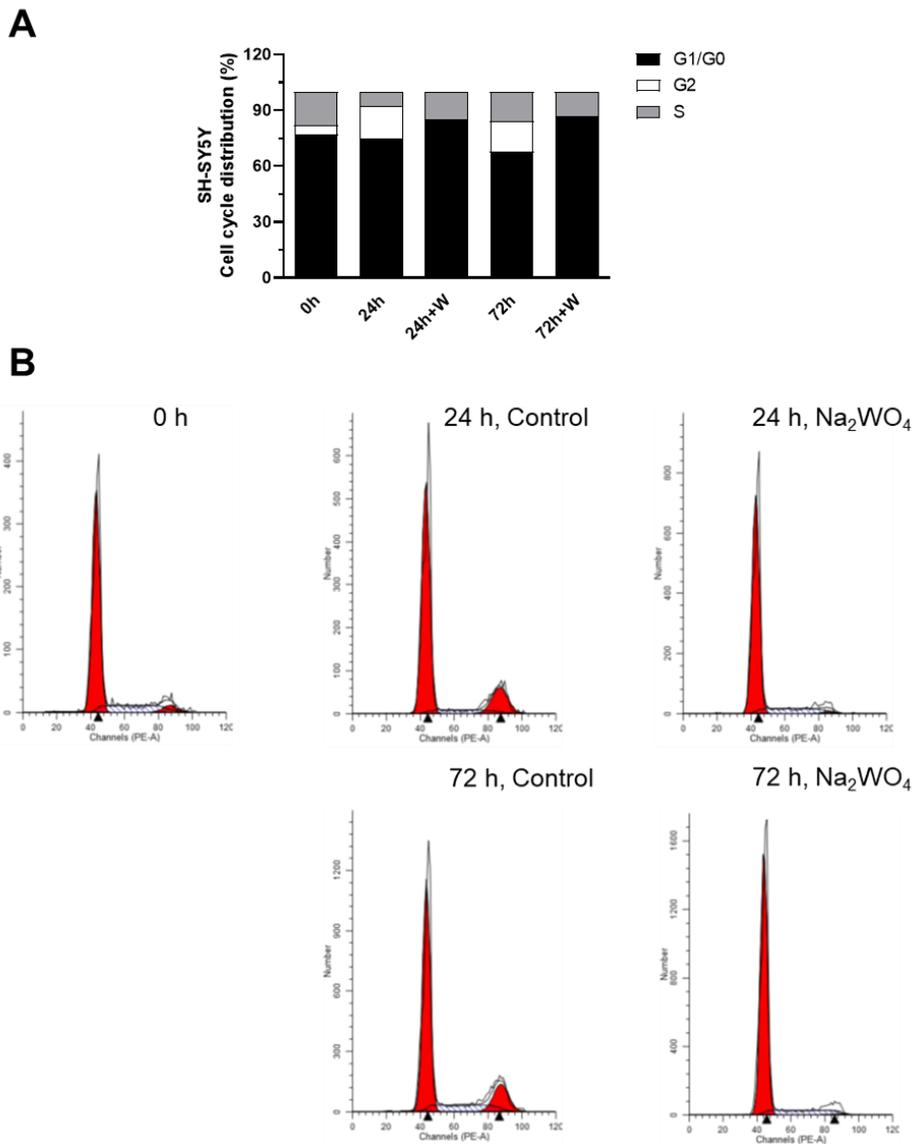


Figura 21. El Na₂WO₄ induce a la diferenciación neuronal al reprogramar el ciclo celular en las células SH-SY5Y.

Las células SH-SY5Y fueron cultivadas en medio de diferenciación y en presencia o ausencia de 0.25 mM Na₂WO₄ durante 72 h. (A) Representación gráfica del ciclo celular en las distintas condiciones experimentales (B). Análisis del ciclo celular por citometría de flujo. Histogramas de fluorescencia.

6.1.3 Efecto del Na_2WO_4 en la proliferación celular.

De forma paralela al aumento en la formación de neuritas, observamos una disminución en la tasa de proliferación celular en las células tratadas con Na_2WO_4 (Figura 28 A). Este efecto no se debió a un incremento en la muerte celular, tal y como lo demuestra la ausencia de cambios significativos en la liberación al medio de la actividad de la láctico deshidrogenasa (Figura 28 B). Es importante destacar que, en estas células de neuroblastoma, el Na_2WO_4 no está implicado en ningún proceso proliferativo no deseado que pudiera resultar en tumorigénesis.

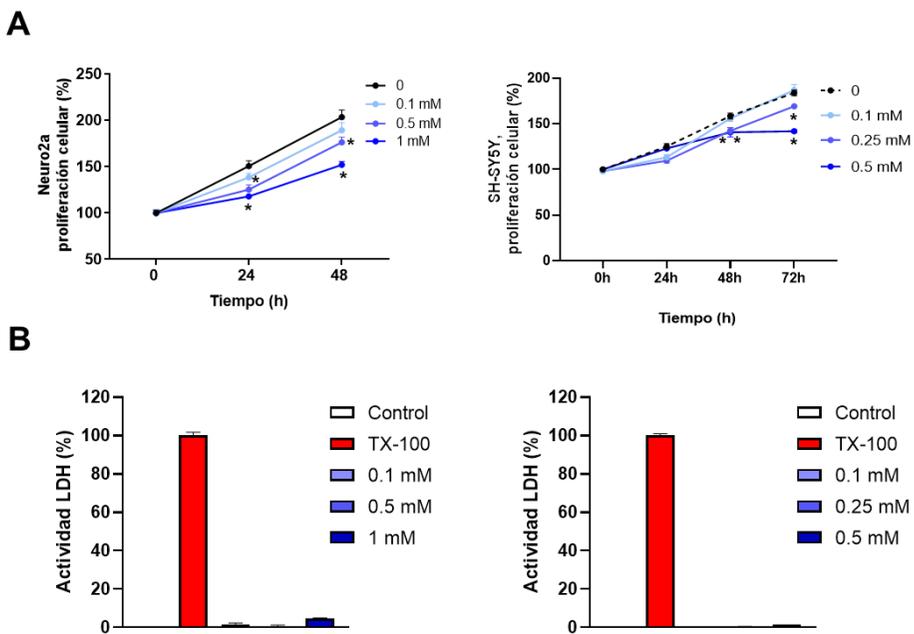


Figura 22. El Na_2WO_4 disminuye la proliferación celular sin producir muerte celular.

Las células fueron cultivadas en medio de diferenciación con concentraciones crecientes de Na_2WO_4 durante 48 h Neuro2a y 72h SH-SY5Y. (A) Ensayo de proliferación celular, izquierda células Neuro2a, derecha SH-SY5Y. Los resultados representan la media \pm S.E.M. (n=8). * $p > 0.05$ comparando células incubadas con Na_2WO_4 versus células control. (B) Ensayo de citotoxicidad basado en LDH, izquierda células Neuro2a, derecha SH-SY5Y.

RESULTADOS

Es relevante considerar que las células diferenciadas no pueden proliferar, lo que explica parcialmente la disminución en la proliferación mediada por Na_2WO_4 . Además, exploramos otros posibles mecanismos responsables del enlentecimiento en la proliferación celular. La senescencia celular se caracteriza por una detención permanente del ciclo celular y resistencia a la apoptosis. Un aumento de la senescencia en células diferenciadas de tejido nervioso está asociado con enfermedades neurodegenerativas [10].

Por lo tanto, investigamos si los cambios inducidos por Na_2WO_4 en el crecimiento de neuritas estaban acompañados por una detención permanente del ciclo celular y senescencia en la población de células no diferenciadas. Para probar esta hipótesis, las células Neuro2a y SH-SY5Y fueron incubadas con o sin Na_2WO_4 , y la senescencia fue analizada utilizando el ensayo de β -galactosidasa como marcador de senescencia. El Na_2WO_4 aumentó la senescencia de las células no diferenciadas, mientras que no afectó los niveles de senescencia de las células diferenciadas en comparación con las células control (Figura 29).

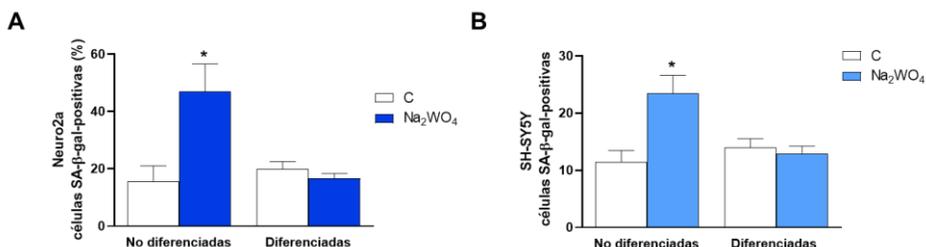


Figura 23. El Na_2WO_4 aumenta el número de células SA- β -gal positivas en las células no diferenciadas.

Las células fueron diferenciadas durante 48 h en presencia o ausencia de 1 mM (Neuro2a) o 0.25 mM (SH-SY5Y) Na_2WO_4 . El porcentaje de células SA- β -gal positivas se analizó según se describe en Materiales y Métodos. Representación gráfica del porcentaje de células Neuro2a (A) y SH-SY5Y (B) SA- β -gal positivas. Los resultados representan la media \pm S.E.M. (n=4). * $p < 0.05$ comparando células incubadas con Na_2WO_4 versus células control.

6.1.4 Efecto del Na_2WO_4 sobre marcadores de diferenciación neuronal

Para investigar más a fondo el tipo específico de neurona resultado de la diferenciación mediada por Na_2WO_4 , se analizaron marcadores específicos de la diferenciación neuronal (Figura 30).

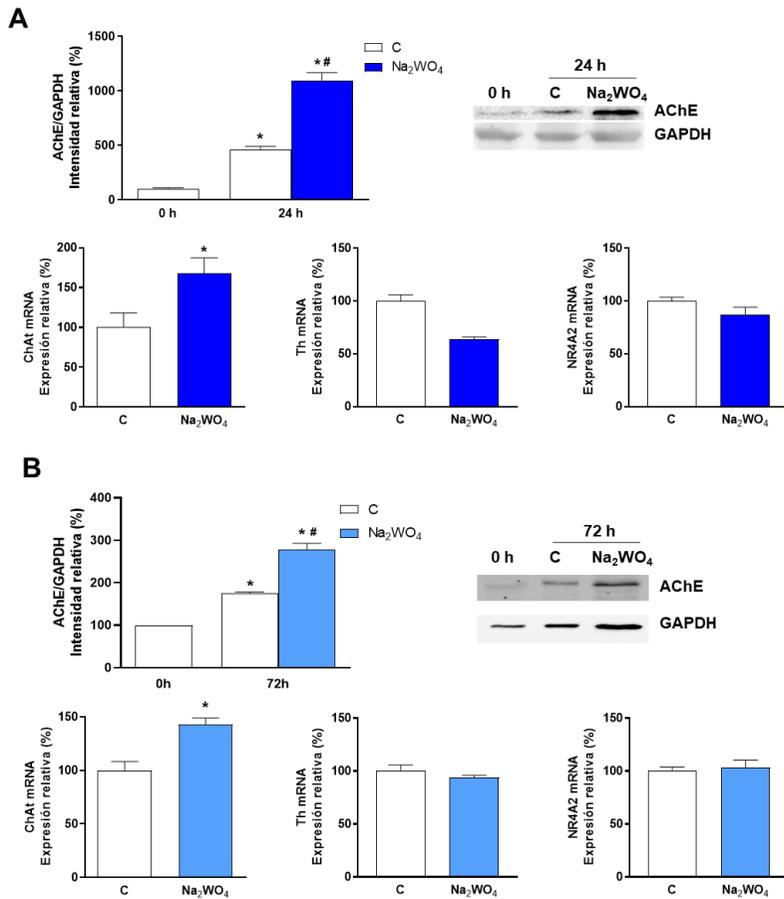


Figura 24. El Na_2WO_4 induce la expresión de marcadores moleculares de diferenciación neuronal hacia un fenotipo colinérgico.

(A) Las células Neuro2a fueron incubadas en un medio de diferenciación en ausencia o presencia de 1 mM de Na_2WO_4 durante 24 h. (B) Las células SH-SY5Y fueron incubadas en un medio de diferenciación en ausencia o presencia de 0.25 mM de Na_2WO_4 durante 72 h. La expresión de la acetilcolinesterasa (AChE) se midió mediante Western blot utilizando un anticuerpo específico contra AChE. Los resultados se normalizaron utilizando GAPDH como control de carga. Los niveles de mRNA de los genes *colina O-acetiltransferasa (ChAt)*, *tirosina hidroxilasa (Th)* y *NR4A2* se midieron mediante qPCR. Los resultados representan la media \pm SEM (n=6). * $p < 0.05$ vs células control a las 0 h. # $p < 0.05$ entre células control y células tratadas con Na_2WO_4 al final del tiempo de incubación.

Los efectos del Na_2WO_4 en la formación de neuritas se reflejaron en la sobreexpresión de marcadores moleculares de diferenciación neuronal hacia el fenotipo colinérgico en ambos tipos celulares. La expresión de la acetilcolinesterasa (AChE) aumentó significativamente en

RESULTADOS

las células Neuro2a y SH-SY5Y incubadas con Na_2WO_4 . Además, al medir la expresión del gen *colina O-acetiltransferasa (ChAt)*, que codifica una enzima que cataliza la biosíntesis del neurotransmisor acetilcolina, se observó un aumento en los niveles de *ChAt* en las células incubadas con Na_2WO_4 (Figura 30).

Para confirmar que el crecimiento de neuritas inducido por Na_2WO_4 estaba dirigido a células colinérgicas en las células Neuro2a y SH-SY5Y, se midió la expresión de los genes *tirosina hidroxilasa (Th)* y *NR4A2*, que son esenciales para el desarrollo de neuronas dopaminérgicas, mediante RT-qPCR. La incubación con Na_2WO_4 no modificó la expresión de estos dos genes en ambas líneas celulares (Figura 30).

6.1.5 Mecanismo molecular del Na_2WO_4 en la diferenciación celular.

La activación de la vía de señalización PI3K/Akt es fundamental para el crecimiento neuronal [7, 8, 512]. En las células Neuro2a, la activación de la señalización ERK1/2 también es relevante para la diferenciación neuronal [512-514]. Además, estudios previos han demostrado que el Na_2WO_4 activa ERK1/2 pero no la señalización de Akt en el hígado [18] y en el músculo esquelético [2, 3].

Con estos antecedentes, nos dispusimos a estudiar el efecto del Na_2WO_4 sobre estas dos quinasas y analizamos los efectos del Na_2WO_4 sobre la señalización dependiente de Akt y ERK1/2 midiendo la expresión de las formas fosforiladas de Akt y ERK1/2 en las células Neuro2a (Figura 31 A) y SH-SY5Y (Figura 31 B) mediante *Western blot* después de incubar las células con o sin Na_2WO_4 durante 24 h. Como se muestra en la Figura 31, el Na_2WO_4 incrementó la fosforilación de ERK1/2 y Akt en ambas líneas celulares. Para confirmar la activación de las quinasas, estudiamos los efectos del Na_2WO_4 en periodos cortos. Nuestros resultados indican que la activación de ambas vías y líneas celulares por parte del Na_2WO_4 se produce en 15-30 minutos y la fosforilación se mantiene después de 1 hora.

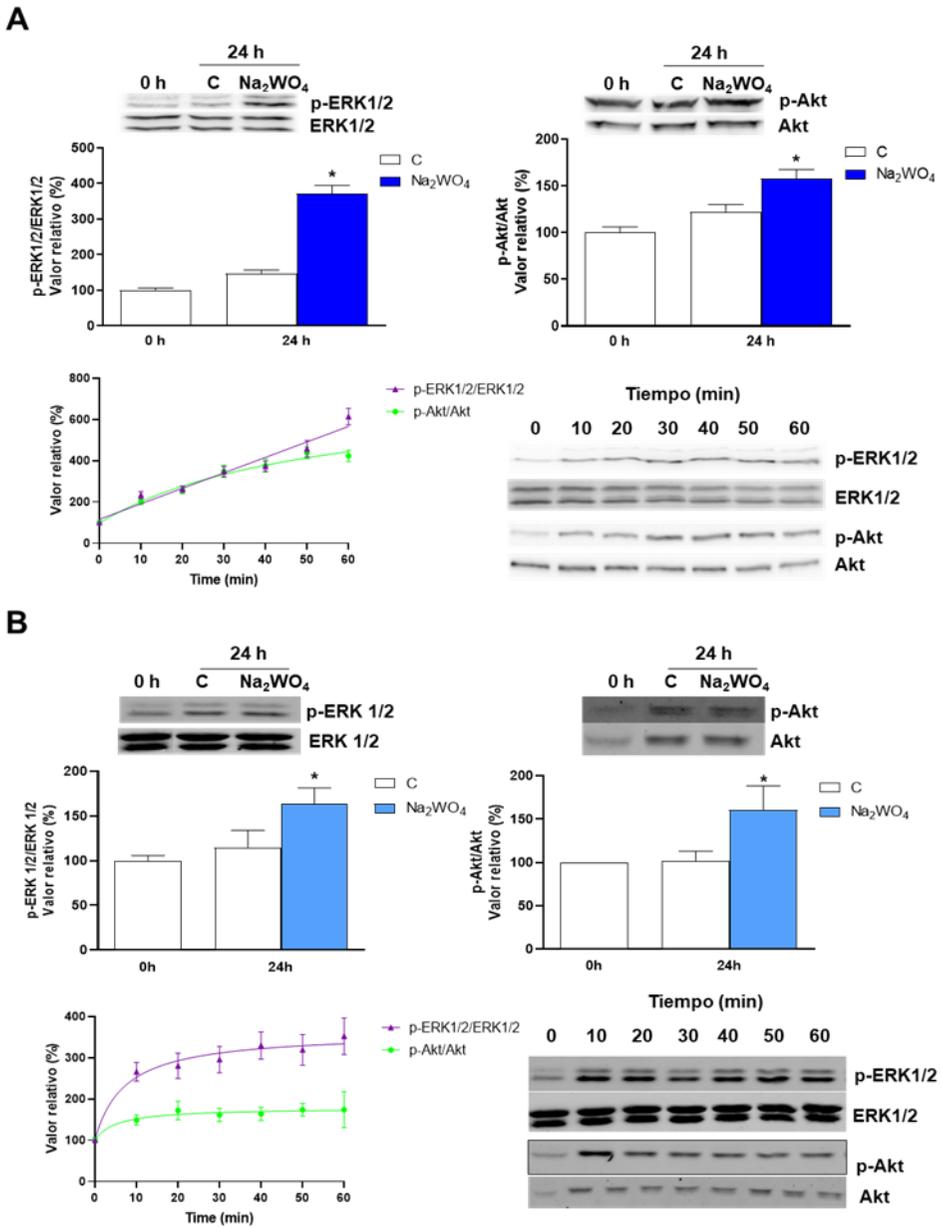


Figura 25. El Na_2WO_4 activa las vías de señalización PI3K/Akt y ERK1/2 en células Neuro2a y SH-SY5Y.

El Na_2WO_4 se añadió a las células Neuro2a (A) o SH-SY5Y (B) durante 24 h o de 0 a 60 min para determinar el curso temporal de la fosforilación. Se realizan Western blots utilizando anticuerpos específicos frente a las formas de Akt y ERK1/2 fosforiladas y totales. Los resultados representan la media \pm SEM (n=6). * $p < 0.05$ vs células no tratadas.

RESULTADOS

Para determinar si la activación de estas quinasas por Na_2WO_4 estaba involucrada en la regulación de la neuritogénesis, se preincubaron células Neuro2a con inhibidores de la activación de Akt (20 μM LY294002) y de ERK1/2 (10 μM PD98059) (Figura 32).

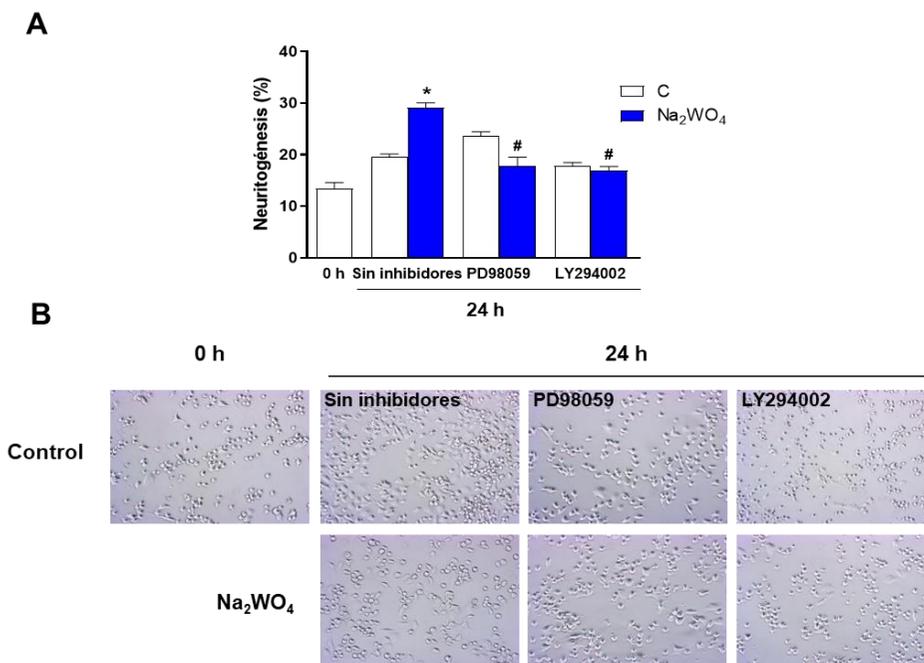


Figura 26. La neuritogénesis inducida por Na_2WO_4 es mediada por las vías de señalización PI3K/Akt y ERK1/2 en células Neuro2a.

Las células Neuro2a fueron pretratadas con PD98059 10 μM o LY294002 20 μM y luego tratadas con 1 mM de Na_2WO_4 durante 24 h. Los inhibidores se mantuvieron durante el experimento. (A) El porcentaje de células diferenciadas se determinó analizando la morfología celular. (B) Las imágenes muestran ejemplos representativos del estado de los cultivos en los tiempos en que se realizaron los recuentos de neuritas. Los resultados representan la media \pm SEM (n = 4). *p<0.05 vs células no tratadas; # p<0.05 vs células tratadas con Na_2WO_4 sin inhibidores.

La inhibición selectiva de la activación de ambas quinasas fue confirmada mediante *Western blot*. Nuestros resultados (Figura 33) indican que, en ausencia de Na_2WO_4 , el crecimiento de neuritas requiere la activación de la vía de señalización Akt independientemente de la señalización ERK1/2. Por el contrario, los efectos positivos del Na_2WO_4 sobre el crecimiento de neuritas requieren que ambas vías de señalización permanezcan activas, proporcionando una fuerte evidencia de la implicación sinérgica de ambas vías de señalización en el crecimiento de neuritas inducido por Na_2WO_4 .

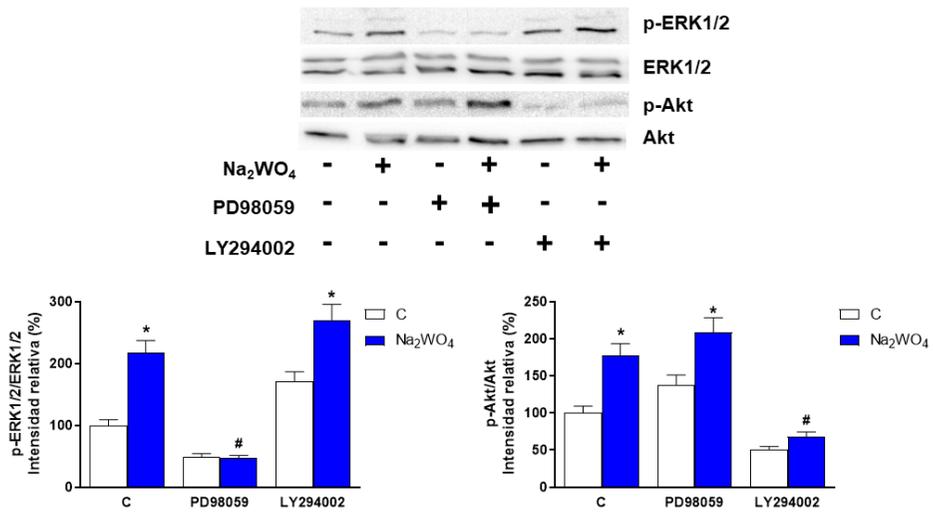


Figura 27. El Na₂WO₄ induce la neuritogénesis en células Neuro2a a través de la activación sinérgica de las vías de señalización PI3K/Akt y ERK1/2.

Las células Neuro2a fueron pretratadas con PD98059 10 μM o LY294002 20 μM y luego tratadas con 1 mM de Na₂WO₄ durante 24 h. Los inhibidores se mantuvieron durante el experimento. La activación de ERK1/2 y Akt se midió mediante *Western blot*. Los resultados representan la media ± SEM (n = 4). *p<0.05 vs células no tratadas; # p<0.05 vs células tratadas con Na₂WO₄ sin inhibidores.

6.1.6 Efecto del Na₂WO₄ en el metabolismo neuronal

Para la formación de neuritas, es necesario que se produzcan una serie de adaptaciones metabólicas que proporcionen a la célula los combustibles metabólicos necesarios y aumenten la síntesis de proteínas [515]. Dado que ya comprobamos que el Na₂WO₄ favorece la diferenciación, decidimos profundizar en su impacto sobre la a síntesis de proteínas.

El Na₂WO₄ tuvo un efecto significativamente positivo sobre la síntesis de proteínas (Figura 34 A). Dado que mTOR es un elemento central en este proceso, evaluamos los efectos del Na₂WO₄ sobre la fosforilación de esta quinasa (Figura 34 A.) Observamos un aumento en la fosforilación de mTOR en las células tratadas con Na₂WO₄. Además, analizamos el estado de activación de la quinasa de la proteína ribosomal S6 (S6K1 por su nombre en inglés *ribosomal protein S6 kinase*) implicada en la regulación del inicio de la traducción del mRNA, y observamos que el Na₂WO₄ también incrementaba su fosforilación (Figura 34 A).

RESULTADOS

Durante la diferenciación neuronal, es necesario un aumento en el metabolismo de la glucosa basado en una mayor captación de glucosa mediada por el transportador GLUT3. En las neuronas, la glucólisis aeróbica es esencial para mantener la elongación axonal y la sinaptogénesis. Esta vía proporciona energía para la síntesis de proteínas e intermediarios, como acetil-CoA, que contribuyen a la síntesis de lípidos y a la expansión de la membrana durante el crecimiento de neuritas. Esta reprogramación metabólica está mediada por la activación del eje PI3K/mTOR [153, 516, 517]. Nuestros resultados (Figura 34 B) indican que el Na_2WO_4 aumenta la captación de glucosa y la expresión del transportador GLUT3 en células Neuro2a para mantener la neuritogénesis y la supervivencia celular.

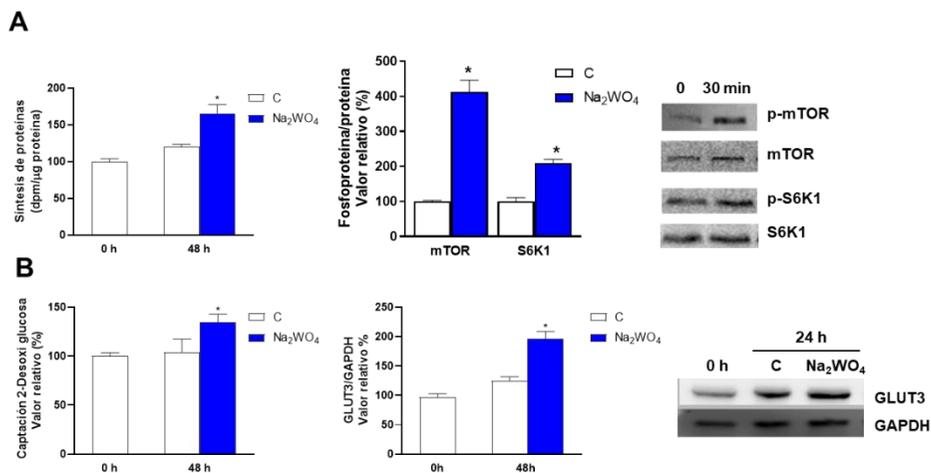


Figura 28. La neuritogénesis inducida por Na_2WO_4 se acompaña de un aumento en la síntesis de proteínas y la captación de glucosa en las células Neuro2a.

Las células Neuro2a se incubaron con 1 mM de Na_2WO_4 durante 24 h. Luego se midió la síntesis de proteínas (A) y la captación de 2-desoxiglucosa (B) así como los niveles de GLUT3. El estado de fosforilación de mTOR y S6K1 se midió después de 30 minutos de incubación con 1 mM de Na_2WO_4 . Los resultados representan la media \pm SEM (n = 4). * $p < 0.05$ vs células no tratadas.

Estos cambios metabólicos se ven reflejados en el aumento de la longitud de las neuritas. Como se muestra en la Figura 35, la incubación con Na_2WO_4 resultó en un aumento significativo en la longitud media de las neuritas en comparación con las células control. Este efecto sugiere una activación coordinada de las vías de señalización clave involucradas en la neuritogénesis, como las vías PI3K/Akt y mTOR, previamente descritas. El aumento progresivo en la extensión de las neuritas bajo la influencia de Na_2WO_4 indica una potenciación del proceso de diferenciación neuronal,

lo que apunta a un papel esencial de este compuesto en la promoción del crecimiento axonal y la reorganización del citoesqueleto.

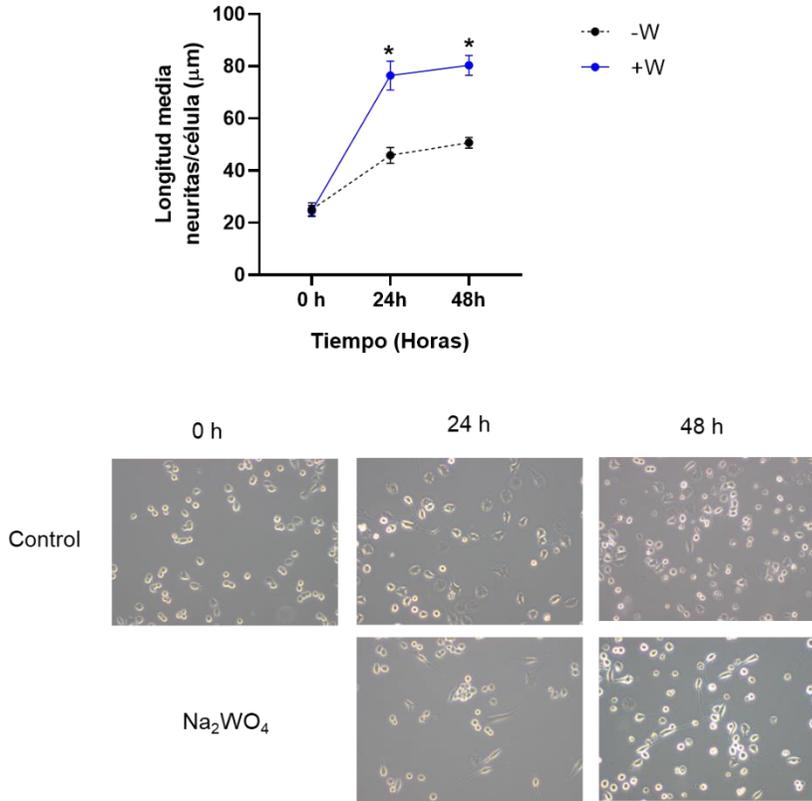


Figura 29 El Na_2WO_4 promueve la elongación de neuritas en las células *Neuro2a*.

Las células *Neuro2a* se incubaron con 1 mM de Na_2WO_4 durante 48 h. Luego, se midió la longitud de las neuritas. (A) Se midió la longitud de las neuritas a las 0, 24 y 48 h. Los datos se expresaron como la longitud media de neuritas. (B) Las imágenes muestran ejemplos representativos del estado de los cultivos en los tiempos en que se midieron la longitud de las neuritas. Los resultados representan la media \pm S.E.M. (n=6). *p<0.05 comparando células incubadas con Na_2WO_4 vs células control.

6.2 Efecto del Na_2WO_4 sobre el factor de transcripción MEF2D

La familia de factores de transcripción MEF2 desempeña un papel crucial en la supervivencia y diferenciación neuronal. Estudios previos han demostrado que MEF2D, en particular, protege a las neuronas del daño y modula la respuesta inflamatoria [11, 370, 371]. Además, la expresión de MEF2 depende de la transducción de señales de Akt y ERK1/2 que son

RESULTADOS

fundamentales para la neuritogénesis [318]. Por tanto, analizamos la participación de MEF2D en los efectos del Na_2WO_4 sobre la neuritogénesis.

Para investigar cómo el Na_2WO_4 influye en la expresión de MEF2D, realizamos estudios en células Neuro2a. Se observó que el tratamiento con Na_2WO_4 produjo un claro incremento en la actividad transcripcional y en la cantidad de proteína (Figura 36).

Para entender los mecanismos subyacentes del aumento de MEF2D inducido por Na_2WO_4 , se evaluaron los niveles de mRNA de MEF2D. A pesar del incremento en la expresión y actividad transcripcional de MEF2D, no se observó un aumento correspondiente en los niveles de mRNA de MEF2D en células Neuro2a (Figura 36). Esto podría sugerir la existencia de mecanismos de regulación postranscripcional, como un aumento en la traducción de la proteína o una disminución en su degradación.

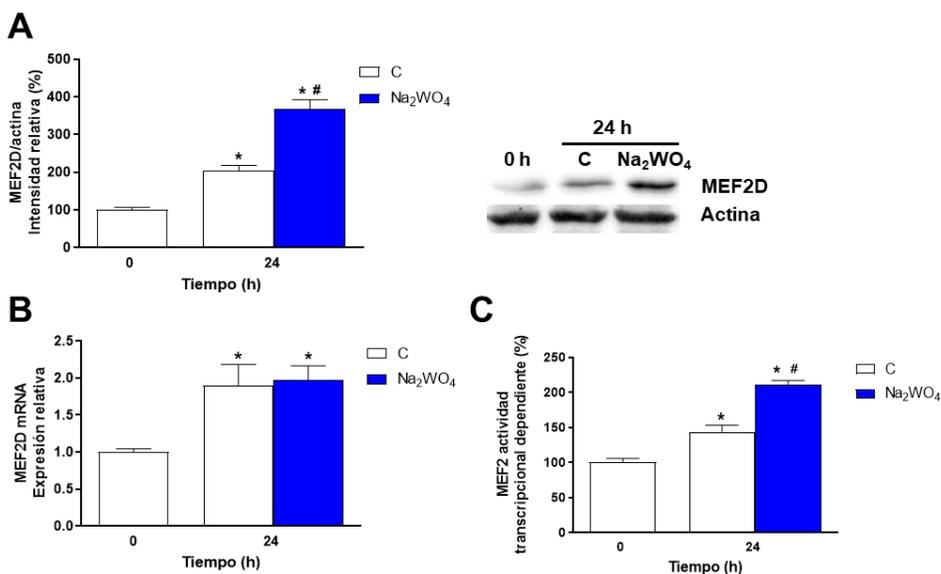


Figura 30 El Na_2WO_4 aumenta la expresión de MEF2D en células Neuro2a.

Las células Neuro2a se incubaron con 1 mM de Na_2WO_4 durante 24 h, y se midieron los niveles de expresión de la proteína (A) y el mRNA de MEF2D (B). La actividad transcripcional dependiente del promotor MEF2 se evaluó utilizando pMEF2x4 Eb1 Luc, un sistema reportero de luciferasa que contiene sitios de unión para MEF2 (C). Los resultados representan como la media \pm SEM (n = 4). *p<0.05 frente a células no tratadas en el tiempo 0 h. #p<0.05 comparado con las células no tratadas en el tiempo 24 h.

Para determinar si el Na_2WO_4 afecta a la estabilidad de MEF2D, se investigó su impacto en la vida media de la proteína. Para ello, utilizamos un plásmido de expresión eucariota que codifica para la proteína MEF2D de rata. Esta proteína es altamente homóloga a las proteínas de ratón y humano y mantiene todas las secuencias reguladoras [307]. Se transfectaron células CHO-k1 (que no expresan MEF2D) y células Neuro2a (que expresan MEF2D) con un plásmido que codifica para la proteína verde fluorescente eucariota (eGFP) o eGFP fusionada con la proteína MEF2D de rata en su forma silvestre, bajo el control de un promotor de citomegalovirus (CMV), por lo que en ambos casos los niveles de transcripción son similares. A continuación, realizamos un ensayo de degradación de proteínas utilizando cicloheximida como inhibidor de la síntesis de proteínas [500, 518], lo que nos permitió medir la estabilidad de la proteína en estado estacionario. Dado que eGFP es una proteína relativamente estable, en las células no tratadas o tratadas con Na_2WO_4 , la fluorescencia asociada con las células no disminuyó después de 24 horas. Por el contrario, la fluorescencia de las células transfectadas con el plásmido que codifica la proteína de fusión eGFP-MEF2D disminuyó significativamente durante las 24 horas en las células no tratadas, mientras que en las células tratadas con Na_2WO_4 , los valores de fluorescencia permanecieron sin cambios durante todo el tratamiento (Figura 37). Estos resultados apoyarían la teoría de que Na_2WO_4 aumenta los niveles de MEF2D al disminuir la degradación de la proteína.

La expresión y la actividad transcripcional de la familia MEF2 están reguladas mediante fosforilación, sumoilación y acetilación en humanos y rata. La proteína MEF2D es sumoilada en la lisina 439, lo que desencadena su degradación. La fosforilación de la serina 444, altamente conservada entre las proteínas MEF2, regula esta sumoilación y posterior degradación proteica [314].

Para explorar el papel de Na_2WO_4 en la regulación de la actividad transcripcional y la sumoilación de la proteína MEF2D, se llevaron a cabo varios experimentos. Primero, analizamos la actividad transcripcional dependiente de MEF2D en células CHO-k1 utilizando el plásmido reportero pMEF2x4 Eb1 Luc, que contiene sitios de unión para MEF2. Estas células se cotransfectaron con plásmidos que expresan diferentes mutantes de MEF2D: MEF2D K439R, que impide la sumoilación, y MEF2D S444A que bloquea la fosforilación en la serina 444 que regula la sumoilación.

RESULTADOS

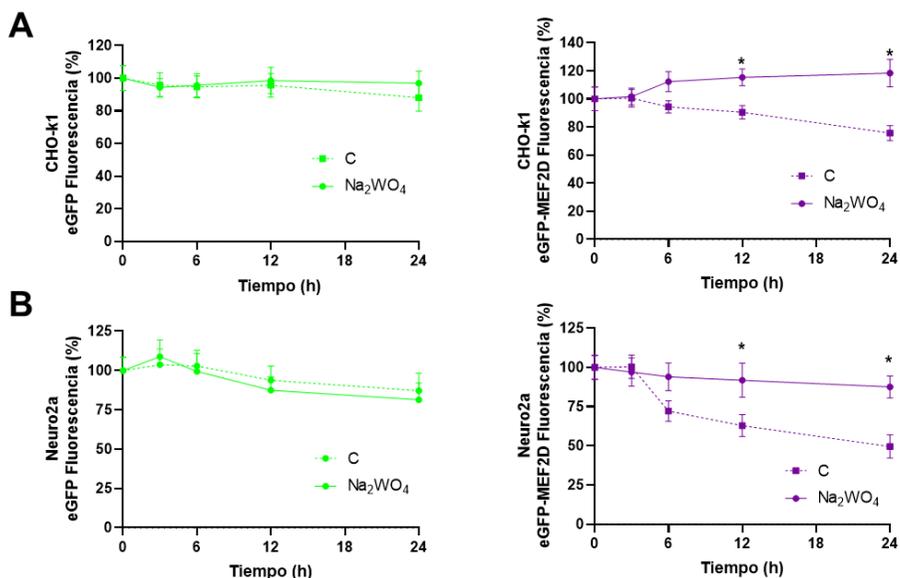


Figura 31. El Na_2WO_4 aumenta la expresión de MEF2D disminuyendo su degradación.

Las células CHO-k1 (A) o Neuro2a (B) fueron transfectadas con plásmidos que codifican para eGFP o una proteína fusión entre eGFP y MEF2D. Las células transfectadas, tratadas sin o con 1 mM Na_2WO_4 , fueron incubadas con 100 μM de cicloheximida durante 24 h, y se midió la fluorescencia de eGFP según lo descrito en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media \pm SEM (n = 4). * $p < 0.05$ vs células no tratadas.

Nuestros resultados muestran que, el Na_2WO_4 aumenta significativamente la actividad transcripcional dependiente de MEF2 de tipo salvaje. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en la actividad de MEF2D entre células tratadas y no tratadas cuando se expresaban los mutantes MEF2 K439R o MEF2 S444A (Figura 38).

Aunque los experimentos iniciales indicaron que los efectos de Na_2WO_4 sobre los niveles de proteína MEF2D podían deber la regulación de la sumoilación, se llevaron a cabo experimentos adicionales para validar estos hallazgos en un contexto de línea celular de neuroblastoma.

Dado que estas células expresan MEF2D endógeno, se diseñó una estrategia para evitar la influencia de la proteína endógena de tipo salvaje en el análisis de las versiones mutadas de MEF2D. Para este propósito, se utilizó un plásmido reportero (pFR-Luc) que contiene copias de la secuencia de unión de GAL4 [519]. Las células Neuro2a se cotransfectaron con pFR-Luc y plásmidos que codifican proteínas de fusión entre el dominio de unión al DNA de GAL4 y MEF2D de tipo salvaje o sus versiones mutadas (GAL-MEF2D K439R y GAL-MEF2D S444A). Los resultados de la actividad

transcripcional en células Neuro2a fueron consistentes con los obtenidos en células CHO-k1 (Figura 38 A).

Además, la vida media de eGFP-MEF2 K439R en células Neuro2a confirmó que el residuo en la posición 439 es crucial para la regulación de los efectos del Na_2WO_4 . (Figura 38 B).

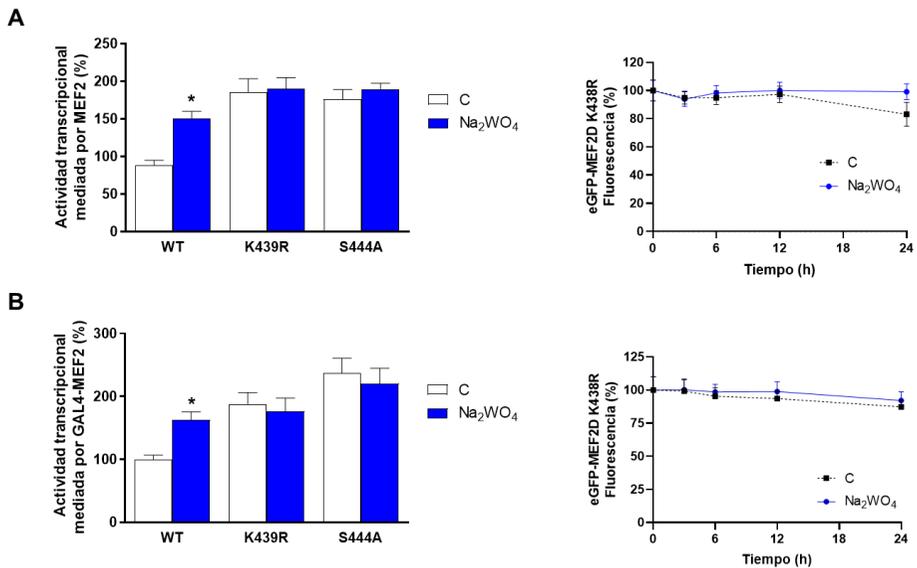


Figura 32. El Na_2WO_4 modula la estabilidad de la proteína MEF2D.

(A) Las células CHO-k1 fueron transfectadas con un plásmido que expresaba proteínas MEF2D mutantes o de tipo salvaje, junto con un plásmido que codificaba un sistema reportero de luciferasa con sitios de unión para MEF2. (B) Las células Neuro2a fueron cotransfectadas con un plásmido que expresaba MEF2D mutante o de tipo salvaje fusionado al dominio de unión al DNA de GAL4, y un plásmido que codificaba un sistema reportero de luciferasa bajo el control de 4 sitios de unión a GAL4. Las células CHO-k1 y Neuro2a fueron incubadas con 1 mM de Na_2WO_4 durante 24 horas y se evaluó la actividad transcripcional. Además, las células CHO-k1 (A) y Neuro2a (B) fueron transfectadas con plásmidos que codificaban eGFP o una proteína de fusión entre eGFP y MEF2D de tipo salvaje o mutante. Las células transfectadas fueron tratadas o no tratadas con 1 mM de Na_2WO_4 , luego incubadas con cicloheximida durante 24 horas, y se midió la fluorescencia de eGFP según lo descrito en la sección de Materiales y Métodos. Los resultados representan la media \pm SEM (n = 4). * $p < 0.05$ vs células no tratadas.

RESULTADOS

6.3 Efecto del Na_2WO_4 en la neuroprotección

El estrés oxidativo y la neuroinflamación inducidos por los AGEs son factores clave en la neurodegeneración. Con el objetivo de evaluar el potencial neuroprotector del Na_2WO_4 , decidimos investigar sus efectos sobre el crecimiento de neuritas en un modelo *in vitro* de estrés oxidativo inducido por AGEs.

En las células Neuro2a (Figura 39) y SH-SY5Y (Figura 40), Na_2WO_4 aumentó el crecimiento de neuritas en comparación con las células control no tratadas y, como era de esperar, la incubación con AGEs en ausencia de Na_2WO_4 redujo significativamente el crecimiento de neuritas. Por el contrario, la incubación de las células con Na_2WO_4 en presencia de AGEs restableció la formación de neuritas a niveles similares a los observados en células tratadas con Na_2WO_4 .

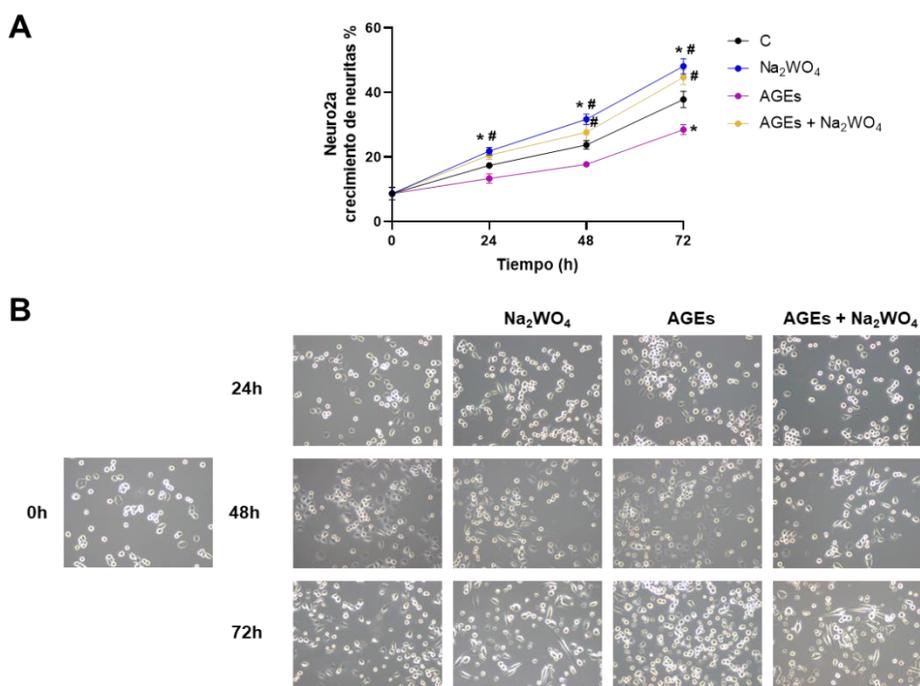


Figura 33. Na_2WO_4 revirtió los efectos de los AGEs en la formación de neuritas.

Las células Neuro 2a se incubaron con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AGEs en ausencia o presencia de Na_2WO_4 . (A) Porcentaje de crecimiento de neuritas en células Neuro 2a. Los resultados representan la media \pm SEM ($n = 4$). * $p < 0.05$ vs células no tratadas; # $p < 0.05$ vs células tratadas con AGEs. (B) Las imágenes muestran ejemplos representativos del estado de los cultivos en los tiempos en que se realizaron los recuentos de neuritas.

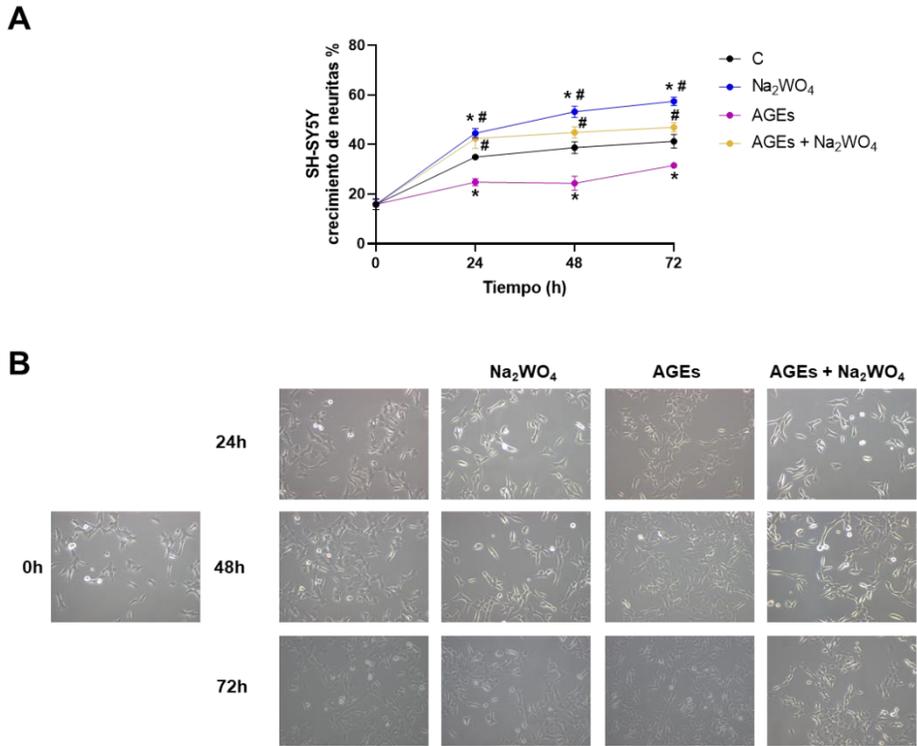


Figura 34. Na₂WO₄ revirtió los efectos de los AGEs en la formación de neuritas.

Las células SH-SY5Y se incubaron con 100 µg/mL de AGEs en ausencia o presencia de Na₂WO₄. (A) Porcentaje de crecimiento de neuritas en células SH-SY5Y. Los resultados representan la media ± SEM (n = 4). *p<0.05 vs células no tratadas; #p<0.05 vs células tratadas con AGEs. (B) Las imágenes muestran ejemplos representativos del estado de los cultivos en los tiempos en que se realizaron los recuentos de neuritas.

En las neuritas, los AGEs, a través de su interacción con su receptor, provocan una reentrada en el ciclo celular, bloqueando la diferenciación de neuritas e incrementando la proliferación celular[520, 521]. La Figura 41(Neuro2a) y Figura 42 (SH-SY5Y) muestran el ciclo celular en células tratadas con AGEs. El Na₂WO₄ promovió un aumento en la fase G0/G1 en comparación con la fase G2, indicando su entrada en el proceso de diferenciación. La incubación con AGEs durante 48 o 72 horas disminuyó el porcentaje de células en la fase G0/G1 y aumentó el de la fase G2, sugiriendo una reentrada en el ciclo celular que impide la diferenciación de neuritas [522, 523]. Por el contrario, la incubación con Na₂WO₄ en presencia de AGEs aumentó el porcentaje de la fase G0/G1, situando a las células en un estado similar al observado solo con Na₂WO₄.

RESULTADOS

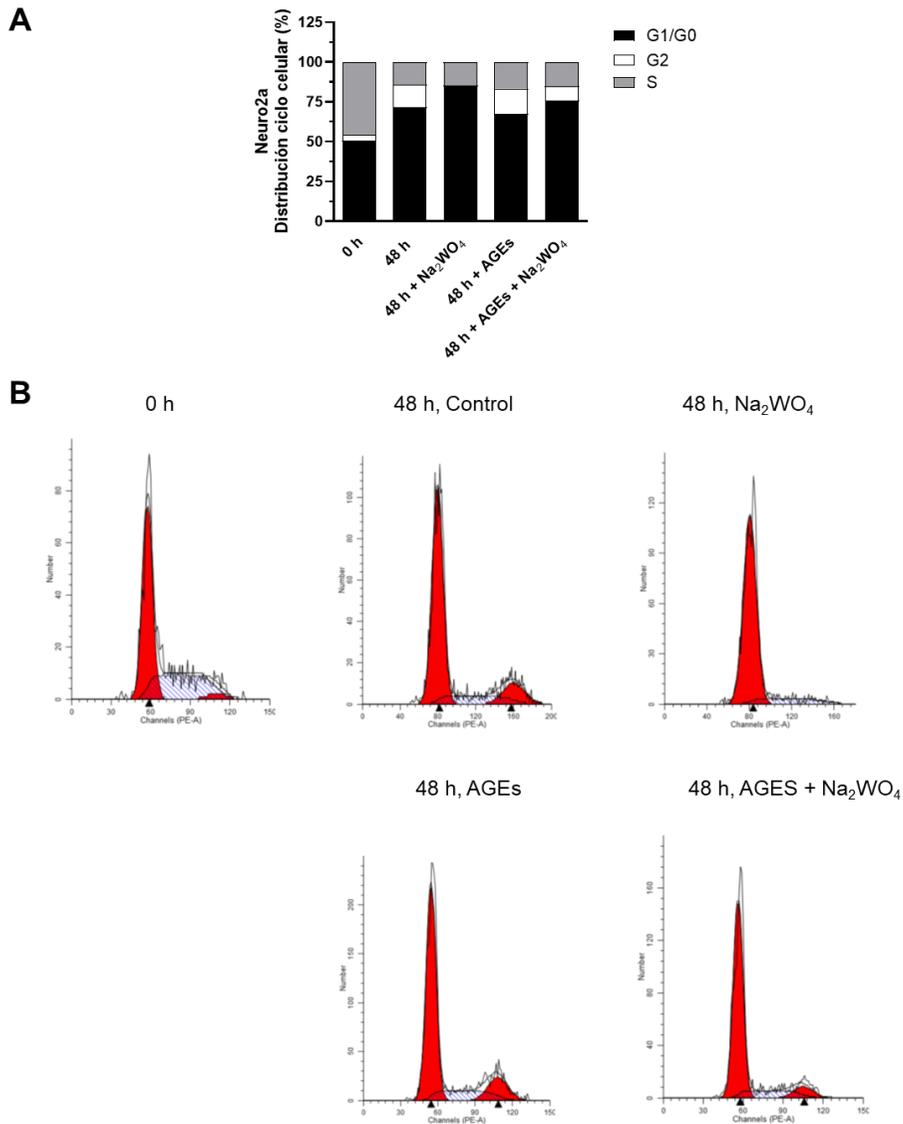


Figura 35.. El Na₂WO₄ revirtió los efectos de los AGES en el ciclo celular en células Neuro2a. Las células Neuro2a fueron cultivadas en medio de diferenciación y en presencia o ausencia de 100 µg/mL de AGES y 1 mM Na₂WO₄ durante 48 h. (A) Representación gráfica del ciclo celular en las distintas condiciones experimentales (B). Análisis del ciclo celular por citometría de flujo. Histogramas de fluorescencia.

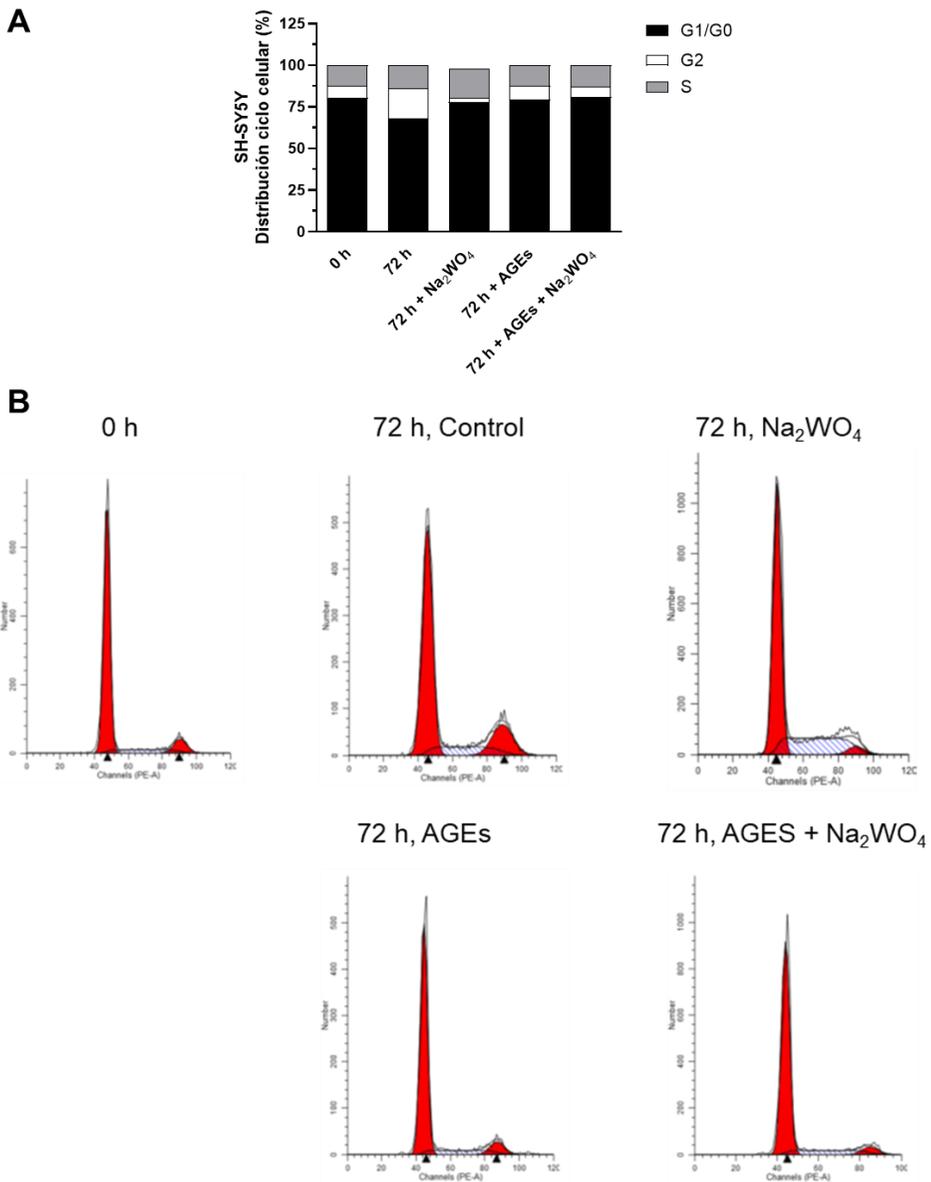


Figura 36. El Na_2WO_4 revirtió los efectos de los AGEs en el ciclo celular en células SH-SY5Y.

Las células SH-SY5Y fueron cultivadas en medio de diferenciación y en presencia o ausencia de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AGEs y 0.25 mM Na_2WO_4 durante 72 h. (A) Representación gráfica del ciclo celular en las distintas condiciones experimentales (B). Análisis del ciclo celular por citometría de flujo. Histogramas de fluorescencia.

RESULTADOS

A continuación, dado que Na_2WO_4 aumenta la expresión de MEF2D en neuritas, evaluamos los niveles de proteína del factor de transcripción en presencia de AGEs y Na_2WO_4 . Estudios previos han relacionado la edad y los depósitos de AGEs con una disminución de los factores de crecimiento neuronal [520]. Confirmando estos resultados, nuestros experimentos indican que la incubación con AGEs en células Neuro2a y SH-SY5Y se traduce en una disminución de la expresión de MEF2D. En contraste, la incubación con Na_2WO_4 previno los efectos negativos de los AGEs (Figura 43).

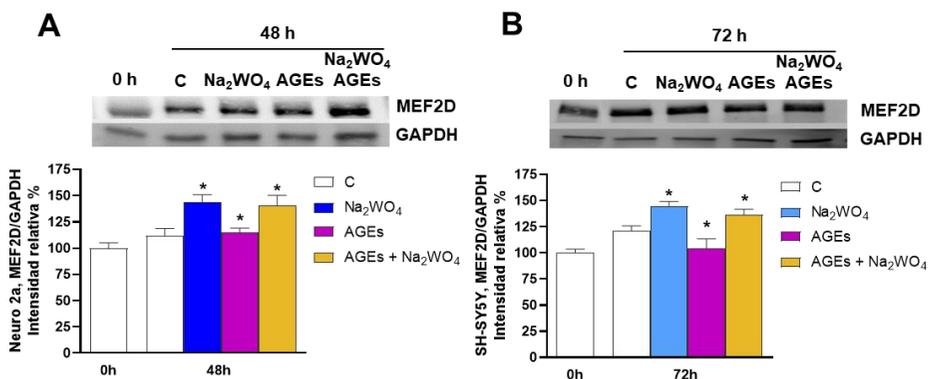


Figura 37. El Na_2WO_4 revierte la disminución de la expresión de MEF2D inducida por AGEs.

Las células fueron cultivadas en medio de diferenciación y en presencia o ausencia de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AGEs y 1 mM Na_2WO_4 durante 48 h células Neuro2a y 0.25 mM Na_2WO_4 durante 72 h células SH-SY5Y. (A) Expresión de MEF2D en células Neuro2a y SH-SY5Y. (B) Los resultados representan medias \pm SEM (n = 4). * $p < 0.05$ vs células no tratadas; # $p < 0.05$ vs células tratadas con AGEs.

de GLUT3 en células Neuro2a y SH-SY5Y. (B) Los resultados representan medias \pm SEM (n = 4). * $p < 0.05$ vs células no tratadas; # $p < 0.05$ vs células tratadas con AGEs.

Además, considerando la relevancia de la captación de glucosa mediada por GLUT3 en las neuronas y su influencia en la mejora del envejecimiento [517], medimos los niveles de este transportador en presencia de AGEs y en combinación con Na₂WO₄ (Figura 44). La incubación con AGEs disminuyó la expresión de GLUT3, como se ha descrito anteriormente [524]. Nuevamente, la incubación en presencia de Na₂WO₄ bloqueó los efectos negativos de los AGEs en ambas líneas celulares.

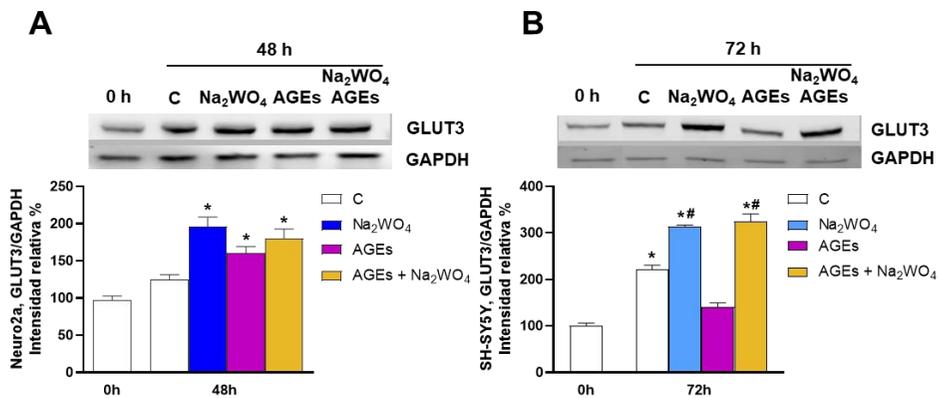


Figura 38 El Na₂WO₄ revierte la disminución de MEF2D inducida por AGEs.

Las células fueron cultivadas en medio de diferenciación y en presencia o ausencia de 100 µg/mL de AGEs y 1 mM Na₂WO₄ durante 48 h células Neuro2a y 0.25 mM Na₂WO₄ durante 72 h células SH-SY5Y. (A) Expresión de GLUT3 en células Neuro2a y SH-SY5Y. (B) Los resultados representan medias ± SEM (n = 4). *p<0.05 vs células no tratadas; #p<0.05 vs células tratadas con AGEs.

RESULTADOS

Finalmente, la incubación con AGEs aumentó la apoptosis en neuronas [520]. Este efecto es parcialmente mediado por la activación proteolítica de la caspasa 3 [521]. En células Neuro2a, medimos la activación de la caspasa 3 mediante western blot y, como era de esperar, la incubación solo con AGEs aumentó la cantidad de caspasa procesada. En contraste, este procesamiento fue prevenido por la incubación en presencia de Na_2WO_4 (Figura 45).

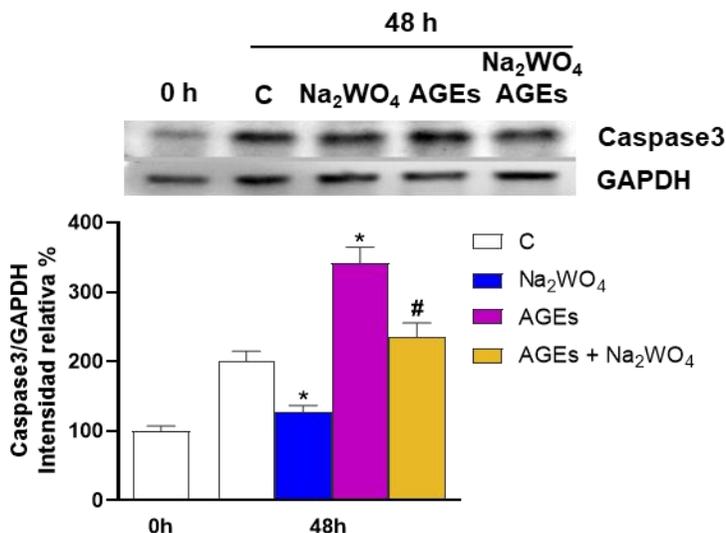


Figura 39. El Na_2WO_4 revierte la disminución la apoptosis inducida por AGEs.

Las células Neuro2a fueron cultivadas en medio de diferenciación y en presencia o ausencia de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AGEs y 1 mM Na_2WO_4 durante 48 h. Expresión de caspasa 3 en células Neuro2a. Los resultados representan medias \pm SEM (n = 4). * $p < 0.05$ vs células no tratadas; # $p < 0.05$ vs células tratadas con AGEs.

DISCUSIÓN

7 DISCUSIÓN

El Na_2WO_4 es una molécula bioactiva con un amplio espectro de actividades biológicas, destacando su capacidad para regular la homeostasis glucémica y promover la pérdida de peso. Es por ello, que la mayoría de los esfuerzos se han dirigido al análisis de sus propiedades anti-diabéticas. En este aspecto, la mayoría de los estudios se han centrado en la regulación de la homeostasis glucídica en el hígado, músculo esquelético y páncreas. Por el contrario, se ha prestado poca atención a su efecto en otros tejidos y en otras situaciones patológicas. Un aspecto particularmente notable del Na_2WO_4 es su capacidad para atravesar la BHE, lo que lo convierte en un compuesto atractivo para la modulación de procesos fisiológicos y patológicos en el SNC [22]. Esta característica, junto con sus efectos beneficiosos en el metabolismo de la glucosa y lipídico, amplía significativamente su potencial terapéutico más allá de la diabetes.

El Na_2WO_4 promueve la homeostasis glucémica al disminuir la absorción intestinal de glucosa, estimular la captación de glucosa por tejidos periféricos (músculo y tejido adiposo) y modular el metabolismo hepático, favoreciendo la síntesis de glucógeno y suprimiendo la gluconeogénesis. Además, el Na_2WO_4 mejora la función de las células beta pancreáticas, aumentando tanto su número como su capacidad secretora de insulina, especialmente en respuesta a niveles normales o elevados de glucosa, evitando así episodios de hipoglucemia.

Los efectos antiobesogénicos del Na_2WO_4 están mediados, en parte, por la modulación de la señalización de la leptina y la inhibición de la lipogénesis y adipogénesis en el tejido adiposo. Un aspecto clave en la acción del Na_2WO_4 es la activación de la vía de señalización de ERK1/2, que parece ser esencial para la mediación de sus múltiples efectos biológicos [1].

Nuestro equipo de investigación ha centrado sus estudios en los efectos del Na_2WO_4 en el músculo esquelético. Experimentos *in vivo* en ratas diabéticas inducidas por inyección de estreptozotocina demuestran que el tratamiento con Na_2WO_4 normaliza en gran medida la reducción de la captación de glucosa en el músculo [20]. Esta normalización se debe a un mecanismo dual: un aumento en la expresión del transportador de glucosa dependiente de insulina GLUT4 y un incremento en su translocación a la membrana plasmática. Por otro lado, el Na_2WO_4 no

DISCUSIÓN

altera la expresión ni la localización del transportador basal GLUT1 en la membrana plasmática, lo que contribuye a evitar episodios de hipoglucemia.

A nivel molecular, en cultivos de miotubos de rata L6 [2], se ha demostrado que el Na_2WO_4 mantiene su acción dual sobre el transportador GLUT4, incrementando su síntesis a nivel transcripcional y favoreciendo su translocación a la membrana plasmática a través de un mecanismo dependiente de ERK1/2, mediado por proteínas quinasas C atípicas y fosfolipasa D. Además, la activación de la transcripción del gen GLUT4 inducida por Na_2WO_4 se encuentra regulada por la modulación de factores de transcripción específicos del tejido, particularmente de la familia MEF2.

Nuestros hallazgos en modelos de miotubos L6 sugieren que Na_2WO_4 ejerce efectos pleiotrópicos en la fisiología muscular, más allá de su acción sobre la captación de glucosa. Al activar la vía de mTOR y al inhibir la vía de la ubiquitina-proteasoma, el Na_2WO_4 promueve la síntesis de proteínas y previene su degradación, lo que contribuye a mitigar la pérdida de masa muscular asociada a la diabetes. Además, nuestros datos en cultivos celulares de músculo esquelético sugieren que la disminución de la autofagia podría ser un mecanismo adicional involucrado en la protección muscular mediada por Na_2WO_4 frente a diferentes agentes como la dexametasona [3].

Hasta este punto, se ha identificado a ERK1/2 como la vía de señalización mediada por Na_2WO_4 en hígado, músculo esquelético, tejido adiposo y páncreas que es capaz de estimular dianas moleculares específicas como transportadores de membrana, factores de transcripción, quinasas y hormonas, y que el compuesto tenga una amplia biodistribución con una baja toxicidad hace que esta molécula sea interesante para la búsqueda de nuevas funciones relevantes en procesos patológicos en otros tejidos.

La neurodegeneración, caracterizada por la progresiva pérdida de la estructura y función de las neuronas, incluye enfermedades como AD, PD y ELA, entre otras. La resistencia a la insulina y el metabolismo de la glucosa juegan un papel crucial en la neurodegeneración. La hiperglucemia crónica, común en la diabetes tipo 2, induce estrés oxidativo y daño mitocondrial, exacerbando la degeneración neuronal. En el cerebro, la insulina y los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF) como IGF-1 y IGF-2 regulan el metabolismo de la glucosa y tienen efectos

neuroprotectores [5]. La desensibilización de los receptores de insulina en el cerebro, agravada por la edad, contribuye a la disfunción sináptica y la muerte neuronal, factores implicados en las enfermedades neurodegenerativas [4, 6].

La hiperglucemia y la resistencia a la insulina provocan complicaciones como la acumulación de proteínas y la disfunción mitocondrial [525]. En las enfermedades neurodegenerativas, se observa la acumulación de β -amiloide, APP, Tau, α -sinucleína y Huntington (HTT). Inicialmente, estas proteínas desempeñan roles cruciales en el crecimiento neuronal, la reparación celular y la estabilización de los microtúbulos. Sin embargo, cuando estas proteínas sufren mutaciones o están sometidas a estrés fisiológico, pierden su función normal, incluyendo la autofagia neuronal, lo que contribuye a la progresión de la neurodegeneración [526, 527].

Como antecedente, se ha descrito que el Na_2WO_4 es capaz de inhibir la fosforilación de la proteína tau mediada por GSK3 β . Este efecto, que podría tener un papel neuroprotector frente a AD, está mediado por la vía de señalización de ERK 1/2. Dado que GSK3 β juega un papel crucial en la señalización de la insulina, se espera que la inactivación de GSK3 β inducida por Na_2WO_4 pueda reducir la resistencia a la insulina en el cerebro. La proteína Tau, asociada a los microtúbulos, es un sustrato importante de GSK3 β en las neuronas, y su hiperfosforilación está implicada en la patogénesis de AD. La capacidad de Na_2WO_4 para inactivar GSK3 β y desfosforilar la proteína Tau, a través de la vía de señalización ERK1/2 resalta su potencial terapéutico en el contexto de esta enfermedad neurodegenerativa [1].

Una estrategia prometedora para combatir la neurodegeneración es estimular la plasticidad neuronal, un proceso esencial durante el desarrollo, en el cual el crecimiento de neuritas es necesario para construir redes neuronales eficientes [479]. Además, la capacidad de formación de neuritas es un paso clave en el proceso de la regeneración neuronal [480]. Este crecimiento está principalmente regulado por dos vías de señalización: las vías PI3K/Akt y MAPK/ERK [7, 8]. Ambas rutas de señalización promueven la activación de factores de transcripción, destacando la familia de MEF2. La sobreexpresión de MEF2 regula procesos celulares como la supervivencia, diferenciación, morfogénesis y apoptosis [9]. Además, inhibe la activación de la microglía, reduce los niveles de citoquinas y protege a las neuronas contra la privación de oxígeno y glucosa [11, 371]. Estas observaciones sugieren que MEF2D

DISCUSIÓN

desempeña un papel crucial en la modulación de las respuestas inflamatorias y en la neuroprotección en el contexto de daño cerebral. Por tanto, la posibilidad de modular la señalización mediada por ERK y MEF2 utilizando compuestos bioactivos permeables a la BHE, como el Na_2WO_4 , es una hipótesis atractiva para esta Tesis Doctoral.

Para evaluar el potencial del Na_2WO_4 en la regeneración neuronal, investigamos sus efectos sobre la diferenciación de las líneas celulares Neuro2a y SH-SY5Y. Nuestros resultados demuestran que el Na_2WO_4 induce una marcada formación de neuritas de manera dosis-dependiente en ambos tipos celulares (Figuras 24 y 25).

El desarrollo del SNC es un proceso altamente regulado que implica una proliferación inicial de células progenitoras seguida de su diferenciación. Esta diferenciación conlleva un crecimiento y diversificación celular en las distintas regiones del SNC. Un evento crucial en este proceso es el crecimiento de neuritas, donde las neuronas en desarrollo extienden y refinan sus dendritas y axones, iniciado con la emisión de prolongaciones primarias desde el soma celular. La salida de la fase quiescente G0 del ciclo celular es un punto de inflexión que desencadena la diferenciación celular y activa un nuevo programa de expresión génica, conduciendo así a la formación de tipos celulares especializados [509, 510].

Teniendo en cuenta estos antecedentes, el siguiente paso en nuestra investigación fue explorar la posible relación entre la diferenciación neuronal inducida por el Na_2WO_4 y la progresión del ciclo celular en estas células. Al incubar las dos líneas celulares en ausencia y presencia de Na_2WO_4 , observamos que el tratamiento con Na_2WO_4 durante 48 horas (células Neuro2a) o 72 horas (células SH-SY5Y) promovió un aumento en la fase G0/G1 acompañado de una disminución en la fase G2. Este desplazamiento sugiere la entrada de las células en el proceso de diferenciación. Las células progenitoras neurales experimentan un ciclo celular más largo antes de iniciar su diferenciación, caracterizado principalmente por una fase G1 extendida durante la transición de un estado proliferativo a uno neurogénico [511]. Además, en presencia de Na_2WO_4 , la fase de síntesis se mantuvo para permitir un crecimiento activo de neuritas (Figuras 26 y 27).

Además, examinamos los efectos del Na_2WO_4 sobre la proliferación celular. El tratamiento con Na_2WO_4 mostró una parada significativa en la proliferación celular en ambas líneas celulares analizadas (Figura 28 A).

Dado que este efecto podría deberse a la toxicidad inducida por el Na_2WO_4 , produciendo muerte celular, realizamos un análisis de citotoxicidad. Para ello, empleamos un método común de determinación de citotoxicidad basado en la medida de la actividad de la enzima LDH, una enzima citoplasmática estable presente en todas las células que se libera rápidamente en el sobrenadante del cultivo celular cuando la membrana plasmática está dañada, lo cual es una característica clave de las células sometidas a apoptosis, necrosis y otras formas de daño celular.

Los resultados de este ensayo mostraron que el Na_2WO_4 no causaba muerte celular (Figura 28 B), lo que sugiere que la reducción en la proliferación celular no es consecuencia de la citotoxicidad. Por lo tanto, es plausible que la disminución en la proliferación celular observada se deba a la diferenciación celular inducida por el Na_2WO_4 , dado que las células diferenciadas pierden su capacidad para proliferar. Esta ausencia de una proliferación aumentada es importante ya que, en estas células de neuroblastoma, el Na_2WO_4 no está implicado en ningún proceso proliferativo no deseado que pudiera resultar en tumorigénesis.

La senescencia celular, un estado de detención del ciclo celular asociado al envejecimiento, se ha relacionado con diversas enfermedades neurodegenerativas. La acumulación de células senescentes en el tejido nervioso contribuye a la inflamación crónica, al estrés oxidativo y a la disfunción sináptica, acelerando así la progresión de estas enfermedades. Además, enfermedades metabólicas como la diabetes mellitus tipo 2 pueden exacerbar la senescencia neuronal, subrayando la importancia de este proceso en la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas

El envejecimiento es uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. Los cambios moleculares y celulares que ocurren con la edad, como la acumulación de daño en el DNA, el acortamiento de los telómeros, las alteraciones epigenéticas, la pérdida de proteostasis y la disfunción mitocondrial, contribuyen a la vulnerabilidad neuronal. La senescencia celular y el agotamiento de las células madre afectan la capacidad del cerebro para regenerarse y mantener su funcionalidad [17].

La senescencia celular se caracteriza por una detención permanente del ciclo celular y una resistencia aumentada a la apoptosis, contribuye a la inflamación crónica, el estrés oxidativo y a la disfunción sináptica, acelerando así el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas [10]. Enfermedades metabólicas como la diabetes

DISCUSIÓN

mellitus tipo 2 pueden exacerbar la senescencia neuronal, subrayando la importancia de este proceso en la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas [528].

Por lo tanto, investigamos si los cambios inducidos por el Na_2WO_4 en el crecimiento de neuritas estaban acompañados por una detección permanente del ciclo celular y senescencia en las células no diferenciadas. Para probar esta hipótesis se analizó la senescencia en ambas líneas celulares utilizando el ensayo de la β -galactosidasa. El Na_2WO_4 aumentó la senescencia de las células no diferenciadas mientras que no afectó a los niveles de senescencia de las células diferenciadas (Figura 29). Estos hallazgos sugieren que el Na_2WO_4 podría inducir la senescencia como un mecanismo alternativo cuando no se alcanza la diferenciación neuronal. Aunque se requieren más estudios para elucidar los mecanismos moleculares subyacentes, nuestros resultados aportan nuevas evidencias sobre la relación entre senescencia y diferenciación celular, y sugieren que la modulación de la senescencia podría ser una estrategia terapéutica prometedora para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, o en procesos tumorales.

En conjunto estos resultados indican que el Na_2WO_4 aumenta la diferenciación neuronal sin producir proliferación no deseada y su actividad podría ser de interés para inducir la regeneración y plasticidad neuronal.

Para investigar más a fondo la diferenciación celular mediada por Na_2WO_4 , se analizaron marcadores específicos de la diferenciación neuronal (Figura 30). Los efectos del Na_2WO_4 se reflejaron en la sobreexpresión de marcadores moleculares hacia el fenotipo colinérgico en ambas líneas celulares, evidenciado por el significativo aumento de la expresión de la acetilcolinesterasa (AChE) y del gen que codifica para *colina O-acetiltransferasa* (*ChAt*), una enzima clave en la biosíntesis del neurotransmisor acetilcolina.

Dado que los neuroblastos pueden diferenciarse en diversos tipos neuronales, como neuronas dopaminérgicas [529, 530] y colinérgicas [531], se utilizó qPCR para medir la expresión de genes específicos. Nuestros resultados indican que las células tratadas con Na_2WO_4 se diferencian en neuronas colinérgicas, reflejado en el aumento de la expresión de *ChAT* y no en el de *tirosina hidroxilasa* (*Th*) ni *NR4A2*, que son marcadores de neuronas dopaminérgicas (Figura 30). No obstante, hay que realizar una consideración, las líneas celulares tienen preferencia a

diferenciarse a neuritas colinérgicas y por tanto el efecto del Na_2WO_4 puede estar influenciado por la propia naturaleza celular. Habría que realizar experimentos en líneas celulares con tendencia a la diferenciación dopaminérgica, como la línea BE (2)-M17 [532] para confirmar si el Na_2WO_4 puede favorecer la diferenciación dopaminérgica en estas células.

El aumento en la diferenciación de neuritas en la línea celular Neuro2a ha sido utilizado clásicamente como un modelo *in vitro* de formación de memoria a largo plazo [533]; por lo tanto, este resultado justifica un estudio adicional para dilucidar el mecanismo molecular de acción del Na_2WO_4 en el proceso de crecimiento de neuritas.

Se ha demostrado que la activación de la vía de señalización PI3K/Akt juega un papel clave en el crecimiento neuronal [7, 8, 512]. En las células Neuro2a, la activación de la señalización ERK1/2 también es relevante para la diferenciación neuronal. Por ejemplo, el ácido alfa-lipoico [513], el litio [514] y el HMB [512] participan en el crecimiento de neuritas activando esta vía de señalización. Además, estudios previos han demostrado que el Na_2WO_4 activa ERK1/2 pero no la señalización Akt en el hígado [18] o en el músculo esquelético [2, 3]. La activación de la vía ERK1/2 por Na_2WO_4 estimula el transporte de glucosa y la síntesis de glucógeno en las células musculares y hepáticas, y mejora el recambio proteico.

El análisis de la fosforilación de ERK1/2 y Akt reveló que el Na_2WO_4 induce una activación rápida y sostenida de ambas quinasas en ambas líneas celulares (Figura 31). De manera notable, la activación de Akt, que no se había descrito previamente en respuesta a este compuesto en otros tejidos, sugiere un papel tejido específico de esta vía mediada por Na_2WO_4 en la regulación de procesos neuronales.

Para determinar el papel de estas vías en la neuritogénesis inducida por Na_2WO_4 , utilizamos inhibidores específicos. Nuestros resultados indican que, en ausencia Na_2WO_4 , la vía Akt es suficiente para promover el crecimiento de neuritas. Sin embargo, en presencia de Na_2WO_4 , la activación simultánea de ambas vías es necesaria para una neuritogénesis óptima (Figura 32 y 33). Estos hallazgos sugieren que tanto ERK 1/2 como Akt desempeñan roles complementarios y sinérgicos en la promoción de la diferenciación neuronal inducida por Na_2WO_4 .

Para el crecimiento de neuritas es necesaria una reprogramación metabólica para satisfacer las necesidades metabólicas y de biosíntesis

DISCUSIÓN

[515]. Estudios previos han demostrado que las vías de señalización MAPK/ERK y PI3K–Akt y mTOR desempeñan roles cruciales en este proceso regulando la síntesis proteica [8, 534, 535]. La activación de mTOR a menudo desencadenada por factores de crecimiento como IGF-1, es esencial para la reprogramación metabólica neuronal, estimulando la captación de glucosa a través del transportador principal de tejido nervioso GLUT3 y promoviendo la síntesis de lípidos y proteínas necesarios para el crecimiento neuronal [153, 154, 536].

A la vista de estos antecedentes, evaluamos el efecto del Na_2WO_4 sobre la neuritogénesis y el metabolismo neuronal. Nuestros resultados presentados en la Figura 34, indican que el tratamiento con Na_2WO_4 induce un aumento significativo en la síntesis de proteínas y en la fosforilación de mTOR y S6K en células Neuro2a, sugiriendo una activación de esta vía de señalización clave. Además, observamos un incremento en la captación de glucosa y en la expresión de GLUT3 en presencia de Na_2WO_4 .

En enfermedades neurodegenerativas, ciertas poblaciones neuronales adultas mueren gradualmente. La familia de factores de transcripción MEF2 participa en la supervivencia y diferenciación de varios tipos de neuronas. Estudios en ratones han demostrado que la eliminación específica en el cerebro de MEF2A/C/D conduce a una letalidad postnatal temprana y un aumento de la apoptosis neuronal, lo que resulta en una respuesta neuroinflamatoria intensificada y daño cerebral. Por otro lado, la sobreexpresión de MEF2D ha mostrado efectos neuroprotectores al inhibir la activación microglial, reducir los niveles de citoquinas y proteger a las neuronas contra la privación de oxígeno y glucosa. Estas observaciones sugieren que MEF2D es fundamental en la modulación de las respuestas inflamatorias y en la neuroprotección en caso de daño cerebral [11, 370, 371]. Además, la expresión de MEF2 está regulada por las vías de señalización de Akt y ERK1/2, destacando su importancia en la transducción de señales necesarias para la función neuronal adecuada [318].

Nuestros resultados indican que el Na_2WO_4 incrementa tanto la actividad transcripcional como los niveles de proteína MEF2D en células Neuro2a (Figura 36), sugiriendo que este compuesto puede tener un papel significativo en la promoción de la neuritogénesis y la neuroprotección. Este hallazgo es consistente con estudios previos que han demostrado una correlación positiva entre los niveles de MEF2D y la longitud de las neuritas [537]. Aunque ya habíamos descrito que el Na_2WO_4 es capaz de

incrementar la expresión de la familia MEF2 en músculo esquelético [2], hasta ahora no se había establecido cuál es el mecanismo molecular responsable de esta expresión incrementada.

Nuestros resultados sugieren que el Na_2WO_4 influye en la regulación postranscripcional de MEF2D, lo que se manifiesta por un aumento en la expresión y actividad transcripcional de MEF2D sin un incremento de los niveles de mRNA de MEF2D en células Neuro2a (Figura 36). Esta observación sugiere la presencia de mecanismos que incluyen un aumento en la traducción de la proteína o una disminución en su degradación.

Para investigar estos mecanismos, realizamos experimentos para analizar el impacto del Na_2WO_4 en la vida media de MEF2D. Utilizamos un plásmido de expresión eucariota que codifica para la proteína MEF2D de rata, la cual es altamente homóloga a las proteínas de ratón y humano, y que mantiene todas las secuencias reguladoras [307]. Transfectamos células CHO-k1 (que no expresan MEF2D) y células Neuro2a (que expresan MEF2D) con un plásmido que codifica la proteína verde fluorescente eucariota (eGFP) o eGFP fusionada con la proteína MEF2D de rata en su forma silvestre, bajo el control de un promotor CMV. Posteriormente, realizamos un ensayo de degradación de proteínas con un inhibidor de la síntesis de proteínas.

Nuestros experimentos revelaron que la fluorescencia de GFP permanecía constante en presencia o ausencia de Na_2WO_4 durante 24 horas, lo cual era esperado dado que GFP es una proteína estable. Sin embargo, en células transfectadas con GFP-MEF2D, observamos una disminución de la fluorescencia en ausencia de Na_2WO_4 , mientras que en presencia de Na_2WO_4 , la fluorescencia se mantuvo constante durante las 24 horas de incubación (Figura 37). Estos resultados apoyan la hipótesis de que Na_2WO_4 aumenta la expresión de MEF2D al disminuir su degradación.

La expresión y la actividad de la familia MEF2D están reguladas mediante fosforilación, sumoilación y acetilación. En humanos y rata, la proteína MEF2D es sumoilada en la lisina 439, lo que inicia un proceso de degradación proteica. Un residuo de serina fosforilable en la posición 444, altamente conservado entre las proteínas MEF2, regula la sumoilación, y, en consecuencia, la degradación proteica. Cuando Cdk5, una quinasa dependiente de ciclina fosforila la serina 444, la actividad transcripcional de MEF2D disminuye y se estimula la sumoilación [314]. Un esquema de estos sitios de regulación se ilustran en la Figura 46.

DISCUSIÓN

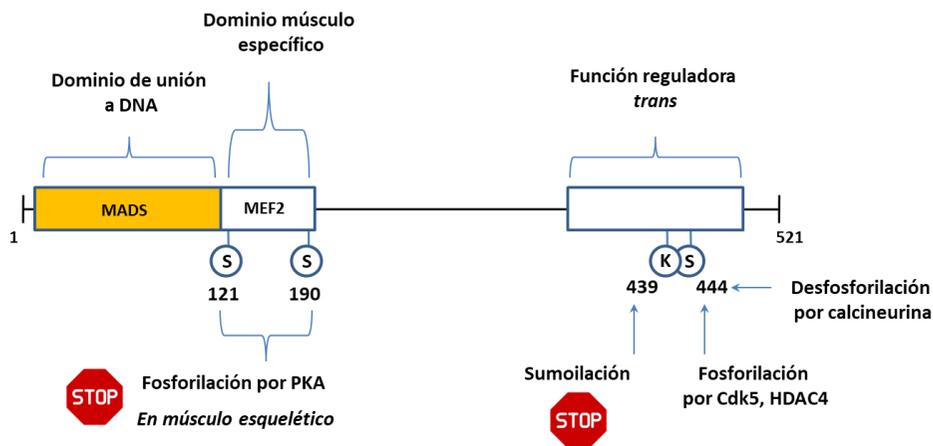


Figura 40. Regulación de la actividad de MEF2D por modificaciones covalentes: sumoilación y fosforilación.

Nuestros resultados sugieren que el Na_2WO_4 tiene un impacto significativo en la regulación postranscripcional de la proteína MEF2D, influyendo en su actividad transcripcional y sumoilación (Figura 38). En células CHO-k1 que no expresan MEF2D, utilizamos el plásmido reportero pMEF2x4 Eb1 Luc, el cual contiene sitios de unión a MEF2, para evaluar la actividad transcripcional dependiente de MEF2D. Al cotransfectar estas células con plásmidos que expresan las versiones mutadas MEF2D K439R (la mutación que previene la sumoilación al eliminar el sitio de sumoilación) y MEF2D S444A (una mutación que bloquea la fosforilación en S444 y por tanto la regulación de la sumoilación en posición 439), observamos que Na_2WO_4 aumentó la transcripción dependiente de MEF2 en el tipo silvestre pero no en las versiones mutadas, sugiriendo que la sumoilación y fosforilación en estas posiciones son cruciales para la regulación de MEF2D por Na_2WO_4 .

La fluorescencia de eGFP en células transfectadas con el mutante eGFP-MEF2 K439R no mostró cambios tras la incubación con Na_2WO_4 durante 24 horas, lo que refuerza la idea de que la estabilización de MEF2D por Na_2WO_4 se debe a la inhibición de su degradación mediada por sumoilación. Este hallazgo es consistente con estudios previos que indican la importancia de la sumoilación en la regulación de la estabilidad y actividad de MEF2D.

Para confirmar estos efectos en un contexto neuronal, realizamos experimentos adicionales en células Neuro2a, que expresan MEF2D

endógeno. Utilizando el plásmido reportero pFR-Luc y cotransfectando con plásmidos que codifican proteínas de fusión entre el dominio de unión al ADN de GAL4 y MEF2D (tanto tipo silvestre como mutantes K439R y S444A), observamos resultados similares a los obtenidos en células CHO-k1. Esto indica que la regulación de MEF2D por Na_2WO_4 es consistente en diferentes tipos celulares y que la posición 439 es crucial en la regulación de los efectos del Na_2WO_4 (Figura 38).

La regulación de la sumoilación de MEF2D por Na_2WO_4 destaca la importancia de las modificaciones postraduccionales en la función y estabilidad de los factores de transcripción. Aunque hemos demostrado que Na_2WO_4 aumenta los niveles de MEF2D en el músculo [2], este estudio amplía estos hallazgos a las neuronas, sugiriendo un mecanismo molecular conservado y relevante en distintos tejidos.

Queda por identificar las quinasas reguladas negativamente por Na_2WO_4 que son responsables de la fosforilación en S444. La elucidación de estas quinasas podría proporcionar nuevas dianas terapéuticas para enfermedades neurodegenerativas, donde la regulación de MEF2D juega un papel protector.

En resumen, nuestros datos proporcionan una comprensión más profunda de cómo Na_2WO_4 regula MEF2D a nivel postranscripcional, destacando la importancia de la sumoilación y fosforilación en la estabilidad y actividad de MEF2D. Este conocimiento puede abrir nuevas vías para el desarrollo de estrategias terapéuticas dirigidas a la modulación de MEF2D en enfermedades neurodegenerativas.

Una segunda parte de este estudio ha sido estudiar si el Na_2WO_4 posee un efecto neuroprotector.

El estrés oxidativo, resultado de un desequilibrio entre la producción de ROS y la capacidad antioxidante del organismo, aumenta con la edad y es un factor clave en la neurodegeneración. Las neuronas son especialmente susceptibles al daño oxidativo debido a su alta demanda energética y su limitada capacidad de regeneración. Además, la neuroinflamación, caracterizada por la activación crónica de la microglía y la liberación de citocinas proinflamatorias, contribuye a la progresión de las enfermedades neurodegenerativas [538-540].

Los AGEs son moléculas altamente reactivas que se originan de la unión no enzimática de azúcares a proteínas y lípidos. Su acumulación en

DISCUSIÓN

el cerebro, acelerada por procesos como el envejecimiento y la diabetes, se vincula estrechamente con el daño oxidativo, la inflamación y la muerte neuronal, contribuyendo significativamente a la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas [24, 25]. Por el contrario, y como ya hemos indicado MEF2D, desempeña un papel protector al modular la respuesta inflamatoria y promueve la resistencia al estrés. Estudios previos han demostrado que la sobreexpresión de MEF2D protege a las neuronas de la muerte celular inducida por diversos estímulos, incluyendo el estrés oxidativo y la privación de oxígeno y glucosa [11, 370-373].

Partiendo de la hipótesis de que Na_2WO_4 , al modular positivamente MEF2D, podría proteger a las neuronas del daño inducido por AGEs, evaluamos su efecto sobre el crecimiento neuronal en presencia de AGEs. En primer lugar, nuestros resultados mostraron que, mientras los AGEs inhibieron significativamente la formación de neuritas, la coincubación con Na_2WO_4 revirtió completamente este efecto (Figuras 39 y 40). Estos hallazgos respaldan nuestra hipótesis inicial y sugieren que Na_2WO_4 posee un potente efecto neuroprotector.

Los AGEs, al interactuar con sus receptores, desencadenan una cascada de señalización que induce la reentrada de las células en el ciclo celular, inhibiendo así la diferenciación neuronal y promoviendo la proliferación [520, 521]. Por el contrario, nuestros resultados indican que el Na_2WO_4 induce una programación del ciclo celular hacia la diferenciación y nos propusimos investigar si el Na_2WO_4 era capaz de contrarrestar los efectos de los AGEs, restableciendo la diferenciación neuronal.

Nuestros resultados mostraron que los AGEs inducen una reentrada en el ciclo celular, lo que se manifiesta en un aumento de la proporción de células en fase S y G2/M. Por el contrario, el tratamiento con Na_2WO_4 incrementó significativamente el porcentaje de células en fase G0/G1, indicando una mayor proporción de células en reposo o diferenciadas (Figuras 41 y 42). Estos hallazgos sugieren que Na_2WO_4 podría contrarrestar los efectos de los AGEs al restaurar el equilibrio del ciclo celular y promover la diferenciación neuronal.

Nuestros experimentos revelan que los AGEs disminuyen drásticamente la expresión de MEF2D, lo que sugiere que la reducción de MEF2D podría contribuir al bloqueo de la diferenciación inducido por los AGEs. El Na_2WO_4 aumenta los niveles de MEF2D en presencia de AGEs

promoviendo la diferenciación neuronal, y también podría conferir protección frente a los efectos tóxicos de los AGEs.

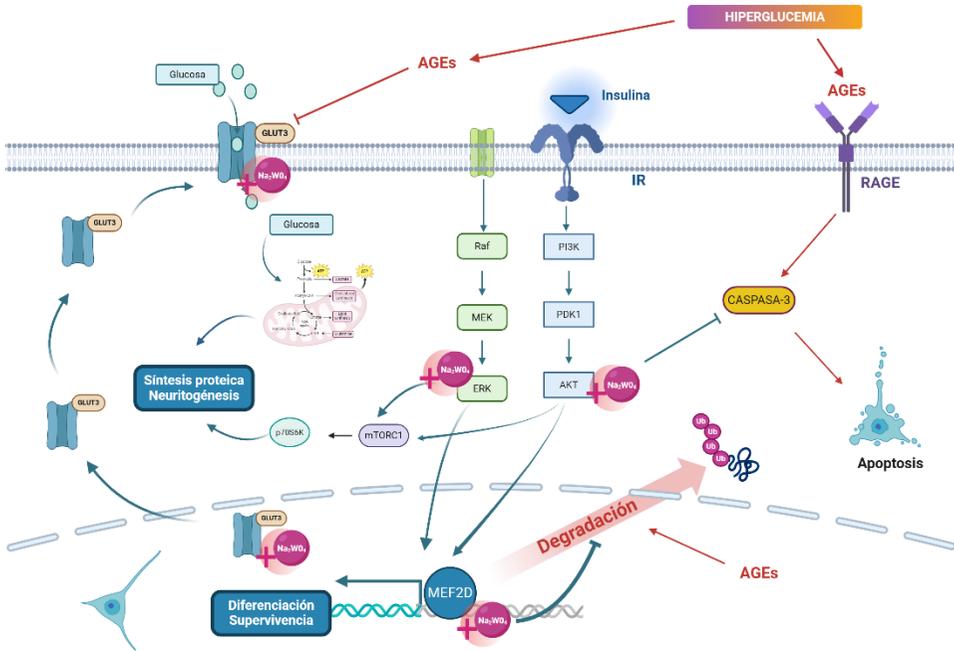


Figura 41. Mecanismo molecular del Na_2WO_4 en la diferenciación neuronal.

Las flechas azules indican las acciones específicas del Na_2WO_4 , mientras que las flechas rojas señalan los efectos de los AGEs en este proceso. El Na_2WO_4 revierte los efectos producidos por los AGEs, restableciendo la neurogénesis, modulando el ciclo celular, aumentando los niveles de GLUT3 y MEF2D, disminuyendo la apoptosis celular.

Nuestros resultados demuestran que la disminución de la expresión de GLUT3 inducida por los AGEs podría explicar, al menos en parte, la inhibición de la diferenciación neuronal observada en estas condiciones. La glucosa es el principal sustrato energético para el cerebro y su captación a través de GLUT3 es esencial para satisfacer las altas demandas metabólicas de las neuronas en crecimiento [515]. Al reducir la expresión de GLUT3, los AGEs comprometen la capacidad de las neuronas para obtener la energía necesaria para la elongación axonal y la sinaptogénesis (Figura 44). Esto sugiere que la disfunción metabólica inducida por los AGEs podría contribuir a la neurodegeneración. Por otro lado, nuestros hallazgos muestran que Na_2WO_4 es capaz de prevenir la disminución de GLUT3 inducida por los AGEs (Figura 44), lo que sugiere que este compuesto podría restaurar la capacidad de las neuronas para captar glucosa y satisfacer sus necesidades energéticas.

DISCUSIÓN

Los AGEs inducen apoptosis neuronal a través de la activación de la caspasa 3, una proteasa clave que desencadena una cascada de eventos que culminan en la fragmentación del ADN y la condensación de la cromatina. Nuestros resultados corroboran estudios previos y sugieren que la disminución de MEF2D, un regulador esencial de la supervivencia neuronal podría exacerbar la susceptibilidad neuronal a la apoptosis inducida por los AGEs [124, 259, 309]. El Na_2WO_4 inhibe la activación de la caspasa 3 (Figura 45), lo que sugiere una acción neuroprotectora multifactorial. Esta capacidad de Na_2WO_4 para modular tanto la expresión de MEF2D como la actividad de la caspasa 3 podría estar relacionada con su capacidad para restaurar la homeostasis celular y prevenir la muerte neuronal.

Nuestros resultados sugieren que el Na_2WO_4 podría ser una herramienta terapéutica prometedora para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. Al modular la expresión de factores de transcripción clave, restaurar la homeostasis energética y prevenir la apoptosis, el Na_2WO_4 ejerce un efecto neuroprotector multifactorial. Dado que el Na_2WO_4 es un agente bien conocido por su capacidad de normalizar la glucosa y cruzar la BHE, su potencial terapéutico en el SNC es considerable. Sin embargo, se necesitan estudios adicionales en modelos animales para elucidar los mecanismos moleculares subyacentes a su acción y evaluar su eficacia en enfermedades neurodegenerativas específicas.

CONCLUSIONES

8 CONCLUSIONES

1. El Na_2WO_4 promueve la diferenciación neuronal en las líneas celulares Neuro2a y SH-SY5Y, incrementando la fase G0/G1 del ciclo celular y manteniendo la fase S, lo que favorece la elongación de neuritas y la adquisición de un fenotipo neuronal colinérgico.
2. La activación de las vías de señalización Akt y ERK1/2 resulta esencial para el proceso de diferenciación mediado por Na_2WO_4 . Esta activación produce efectos significativos sobre el metabolismo celular, aumentando tanto la síntesis proteica como la captación de glucosa.
3. El factor de transcripción MEF2D, un regulador clave de la diferenciación neuronal, se encuentra aumentado en las células tratadas con Na_2WO_4 al prevenir su degradación mediada por sumoilación.
4. Los AGEs ejercen negativos sobre la diferenciación y supervivencia neuronal. En los ensayos en estas líneas celulares, el Na_2WO_4 es capaz de revertir estos efectos negativos de los AGEs, restableciendo la neuritogénesis, modulando el ciclo celular, aumentando los niveles de GLUT3 y MEF2D, y disminuyendo la apoptosis celular.

BIBLIOGRAFÍA

9 BIBLIOGRAFÍA

1. Bertinat R, Nualart F, Li X, Yanez AJ, Gomis R: **Preclinical and Clinical Studies for Sodium Tungstate: Application in Humans.** *J Clin Cell Immunol* 2015, **6**.
2. Giron MD, Sevillano N, Vargas AM, Dominguez J, Guinovart JJ, Salto R: **The glucose-lowering agent sodium tungstate increases the levels and translocation of GLUT4 in L6 myotubes through a mechanism associated with ERK1/2 and MEF2D.** *Diabetologia* 2008, **51**:1285-1295.
3. Salto R, Vilchez JD, Cabrera E, Guinovart JJ, Giron MD: **Activation of ERK by sodium tungstate induces protein synthesis and prevents protein degradation in rat L6 myotubes.** *FEBS Lett* 2014, **588**:2246-2254.
4. Burillo J, Marques P, Jimenez B, Gonzalez-Blanco C, Benito M, Guillen C: **Insulin Resistance and Diabetes Mellitus in Alzheimer's Disease.** *Cells* 2021, **10**.
5. Okouchi M, Okayama N, Alexander JS, Aw TY: **NRF2-dependent glutamate-L-cysteine ligase catalytic subunit expression mediates insulin protection against hyperglycemia-induced brain endothelial cell apoptosis.** *Curr Neurovasc Res* 2006, **3**:249-261.
6. Yang L, Wang H, Liu L, Xie A: **The Role of Insulin/IGF-1/PI3K/Akt/GSK3beta Signaling in Parkinson's Disease Dementia.** *Front Neurosci* 2018, **12**:73.
7. Chong ZZ, Shang YC, Wang S, Maiese K: **A Critical Kinase Cascade in Neurological Disorders: PI 3-K, Akt, and mTOR.** *Future Neurol* 2012, **7**:733-748.
8. Read DE, Gorman AM: **Involvement of Akt in neurite outgrowth.** *Cell Mol Life Sci* 2009, **66**:2975-2984.
9. McKinsey TA, Zhang CL, Olson EN: **MEF2: a calcium-dependent regulator of cell division, differentiation and death.** *Trends Biochem Sci* 2002, **27**:40-47.

BIBLIOGRAFÍA

10. Si Z, Sun L, Wang X: **Evidence and perspectives of cell senescence in neurodegenerative diseases.** *Biomed Pharmacother* 2021, **137**:111327.
11. Wang N, Yang W, Li L, Tian M: **MEF2D upregulation protects neurons from oxygen-glucose deprivation/re-oxygenation-induced injury by enhancing Nrf2 activation.** *Brain Res* 2020, **1741**:146878.
12. **Envejecimiento y Salud**
13. Niccoli T, Partridge L: **Ageing as a risk factor for disease.** *Curr Biol* 2012, **22**:R741-752.
14. Figueira I, Fernandes A, Mladenovic Djordjevic A, Lopez-Contreras A, Henriques CM, Selman C, Ferreiro E, Gonos ES, Trejo JL, Misra J, et al: **Interventions for age-related diseases: Shifting the paradigm.** *Mech Ageing Dev* 2016, **160**:69-92.
15. Melis R, Marengoni A, Angleman S, Fratiglioni L: **Incidence and predictors of multimorbidity in the elderly: a population-based longitudinal study.** *PLoS One* 2014, **9**:e103120.
16. Morsli S, Bellantuono I: **The use of geroprotectors to prevent multimorbidity: Opportunities and challenges.** *Mech Ageing Dev* 2021, **193**:111391.
17. Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G: **Hallmarks of aging: An expanding universe.** *Cell* 2023, **186**:243-278.
18. Zafra D, Nocito L, Dominguez J, Guinovart JJ: **Sodium tungstate activates glycogen synthesis through a non-canonical mechanism involving G-proteins.** *FEBS Lett* 2013, **587**:291-296.
19. Fernandez-Alvarez J, Barbera A, Nadal B, Barcelo-Batlloiri S, Piquer S, Claret M, Guinovart JJ, Gomis R: **Stable and functional regeneration of pancreatic beta-cell population in nSTZ-rats treated with tungstate.** *Diabetologia* 2004, **47**:470-477.
20. Giron MD, Caballero JJ, Vargas AM, Suarez MD, Guinovart JJ, Salto R: **Modulation of glucose transporters in rat diaphragm by sodium tungstate.** *FEBS Lett* 2003, **542**:84-88.
21. Dominguez JE, Munoz MC, Zafra D, Sanchez-Perez I, Baque S, Caron M, Mercurio C, Barbera A, Perona R, Gomis R, Guinovart JJ: **The**

- antidiabetic agent sodium tungstate activates glycogen synthesis through an insulin receptor-independent pathway.** *J Biol Chem* 2003, **278**:42785-42794.
22. Amigo-Correig M, Barcelo-Batllori S, Piquer S, Soty M, Pujadas G, Gasa R, Bortolozzi A, Carmona MC, Gomis R: **Sodium tungstate regulates food intake and body weight through activation of the hypothalamic leptin pathway.** *Diabetes Obes Metab* 2011, **13**:235-242.
 23. Claret M, Corominola H, Canals I, Saura J, Barcelo-Batllori S, Guinovart JJ, Gomis R: **Tungstate decreases weight gain and adiposity in obese rats through increased thermogenesis and lipid oxidation.** *Endocrinology* 2005, **146**:4362-4369.
 24. Reddy VP, Aryal P, Soni P: **RAGE Inhibitors in Neurodegenerative Diseases.** *Biomedicines* 2023, **11**.
 25. Bhattacharya R, Alam MR, Kamal MA, Seo KJ, Singh LR: **AGE-RAGE axis culminates into multiple pathogenic processes: a central road to neurodegeneration.** *Front Mol Neurosci* 2023, **16**:1155175.
 26. Tyng CM, Amin HU, Saad MNM, Malik AS: **The Influences of Emotion on Learning and Memory.** *Front Psychol* 2017, **8**:1454.
 27. Herculano-Houzel S: **The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain.** *Front Hum Neurosci* 2009, **3**:31.
 28. Altman J: **Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats.** *Anat Rec* 1963, **145**:573-591.
 29. Altman J, Das GD: **Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats.** *J Comp Neurol* 1965, **124**:319-335.
 30. Altman J, Das GD: **Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions.** *J Comp Neurol* 1966, **126**:337-389.
 31. Altman J, Das GD: **Postnatal neurogenesis in the guinea-pig.** *Nature* 1967, **214**:1098-1101.

BIBLIOGRAFÍA

32. Paton JA, Nottebohm FN: **Neurons generated in the adult brain are recruited into functional circuits.** *Science* 1984, **225**:1046-1048.
33. Zhao C, Deng W, Gage FH: **Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis.** *Cell* 2008, **132**:645-660.
34. Ming GL, Song H: **Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions.** *Neuron* 2011, **70**:687-702.
35. Liu H, Song N: **Molecular Mechanism of Adult Neurogenesis and its Association with Human Brain Diseases.** *J Cent Nerv Syst Dis* 2016, **8**:5-11.
36. Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ: **Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation.** *Nat Neurosci* 1999, **2**:260-265.
37. van Praag H, Kempermann G, Gage FH: **Neural consequences of environmental enrichment.** *Nat Rev Neurosci* 2000, **1**:191-198.
38. Kempermann G, Gast D, Gage FH: **Neuroplasticity in old age: sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment.** *Ann Neurol* 2002, **52**:135-143.
39. Lindvall O, Kokaia Z, Martinez-Serrano A: **Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders-how to make it work.** *Nat Med* 2004, **10 Suppl**:S42-50.
40. Gage FH: **Neurogenesis in the adult brain.** *J Neurosci* 2002, **22**:612-613.
41. Berger T, Lee H, Young AH, Aarsland D, Thuret S: **Adult Hippocampal Neurogenesis in Major Depressive Disorder and Alzheimer's Disease.** *Trends Mol Med* 2020, **26**:803-818.
42. Reynolds BA, Weiss S: **Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system.** *Science* 1992, **255**:1707-1710.
43. Gage FH, Temple S: **Neural stem cells: generating and regenerating the brain.** *Neuron* 2013, **80**:588-601.
44. Hou S, Saltos TM, Mironets E, Trueblood CT, Connors TM, Tom VJ: **Grafting Embryonic Raphe Neurons Reestablishes Serotonergic**

- Regulation of Sympathetic Activity to Improve Cardiovascular Function after Spinal Cord Injury.** *J Neurosci* 2020, **40**:1248-1264.
45. Gage FH, Kempermann G, Palmer TD, Peterson DA, Ray J: **Multipotent progenitor cells in the adult dentate gyrus.** *J Neurobiol* 1998, **36**:249-266.
46. Kilpatrick TJ, Bartlett PF: **Cloning and growth of multipotential neural precursors: requirements for proliferation and differentiation.** *Neuron* 1993, **10**:255-265.
47. Palmer TD, Takahashi J, Gage FH: **The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells.** *Mol Cell Neurosci* 1997, **8**:389-404.
48. Jiang M, Jang SE, Zeng L: **The Effects of Extrinsic and Intrinsic Factors on Neurogenesis.** *Cells* 2023, **12**.
49. Bazan E, Alonso FJ, Redondo C, Lopez-Toledano MA, Alfaro JM, Reimers D, Herranz AS, Paino CL, Serrano AB, Cobacho N, et al: **In vitro and in vivo characterization of neural stem cells.** *Histol Histopathol* 2004, **19**:1261-1275.
50. Gil-Perotin S, Duran-Moreno M, Cebrian-Silla A, Ramirez M, Garcia-Belda P, Garcia-Verdugo JM: **Adult neural stem cells from the subventricular zone: a review of the neurosphere assay.** *Anat Rec (Hoboken)* 2013, **296**:1435-1452.
51. Shin J, Berg DA, Zhu Y, Shin JY, Song J, Bonaguidi MA, Enikolopov G, Nauen DW, Christian KM, Ming GL, Song H: **Single-Cell RNA-Seq with Waterfall Reveals Molecular Cascades underlying Adult Neurogenesis.** *Cell Stem Cell* 2015, **17**:360-372.
52. Song J, Zhong C, Bonaguidi MA, Sun GJ, Hsu D, Gu Y, Meletis K, Huang ZJ, Ge S, Enikolopov G, et al: **Neuronal circuitry mechanism regulating adult quiescent neural stem-cell fate decision.** *Nature* 2012, **489**:150-154.
53. Jang MH, Bonaguidi MA, Kitabatake Y, Sun J, Song J, Kang E, Jun H, Zhong C, Su Y, Guo JU, et al: **Secreted frizzled-related protein 3 regulates activity-dependent adult hippocampal neurogenesis.** *Cell Stem Cell* 2013, **12**:215-223.

BIBLIOGRAFÍA

54. Zhang J, Jiao J: **Molecular Biomarkers for Embryonic and Adult Neural Stem Cell and Neurogenesis.** *Biomed Res Int* 2015, **2015**:727542.
55. Alvarez-Buylla A, Lim DA: **For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain.** *Neuron* 2004, **41**:683-686.
56. Encinas JM, Michurina TV, Peunova N, Park JH, Tordo J, Peterson DA, Fishell G, Koulakov A, Enikolopov G: **Division-coupled astrocytic differentiation and age-related depletion of neural stem cells in the adult hippocampus.** *Cell Stem Cell* 2011, **8**:566-579.
57. Bonaguidi MA, Stadel RP, Berg DA, Sun J, Ming GL, Song H: **Diversity of Neural Precursors in the Adult Mammalian Brain.** *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2016, **8**:a018838.
58. Calzolari F, Michel J, Baumgart EV, Theis F, Gotz M, Ninkovic J: **Fast clonal expansion and limited neural stem cell self-renewal in the adult subependymal zone.** *Nat Neurosci* 2015, **18**:490-492.
59. Gotz M, Sirko S, Beckers J, Irmeler M: **Reactive astrocytes as neural stem or progenitor cells: In vivo lineage, In vitro potential, and Genome-wide expression analysis.** *Glia* 2015, **63**:1452-1468.
60. Nam HS, Benezra R: **High levels of Id1 expression define B1 type adult neural stem cells.** *Cell Stem Cell* 2009, **5**:515-526.
61. Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A: **Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain.** *J Neurosci* 1997, **17**:5046-5061.
62. Garcia-Marques J, De Carlos JA, Greer CA, Lopez-Mascaraque L: **Different astroglia permissivity controls the migration of olfactory bulb interneuron precursors.** *Glia* 2010, **58**:218-230.
63. Ribeiro FF, Xapelli S: **An Overview of Adult Neurogenesis.** *Adv Exp Med Biol* 2021, **1331**:77-94.
64. Belluzzi O, Benedusi M, Ackman J, LoTurco JJ: **Electrophysiological differentiation of new neurons in the olfactory bulb.** *J Neurosci* 2003, **23**:10411-10418.

65. Kuhn HG, Cooper-Kuhn C, Eriksson P, Nilsson M: **Signals regulating neurogenesis in the adult olfactory bulb.** *Chem Senses* 2005, **30 Suppl 1**:i109-110.
66. Bottes S, Jaeger BN, Pilz GA, Jorg DJ, Cole JD, Kruse M, Harris L, Korobeynyk VI, Mallona I, Helmchen F, et al: **Long-term self-renewing stem cells in the adult mouse hippocampus identified by intravital imaging.** *Nat Neurosci* 2021, **24**:225-233.
67. Bonaguidi MA, Wheeler MA, Shapiro JS, Stadel RP, Sun GJ, Ming GL, Song H: **In vivo clonal analysis reveals self-renewing and multipotent adult neural stem cell characteristics.** *Cell* 2011, **145**:1142-1155.
68. Fukuda S, Kato F, Tozuka Y, Yamaguchi M, Miyamoto Y, Hisatsune T: **Two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus.** *J Neurosci* 2003, **23**:9357-9366.
69. Vadodaria KC, Gage FH: **SnapShot: adult hippocampal neurogenesis.** *Cell* 2014, **156**:1114-1114 e1111.
70. Steiner B, Klempin F, Wang L, Kott M, Kettenmann H, Kempermann G: **Type-2 cells as link between glial and neuronal lineage in adult hippocampal neurogenesis.** *Glia* 2006, **54**:805-814.
71. Hastings NB, Gould E: **Rapid extension of axons into the CA3 region by adult-generated granule cells.** *J Comp Neurol* 1999, **413**:146-154.
72. Zhao C, Teng EM, Summers RG, Jr., Ming GL, Gage FH: **Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus.** *J Neurosci* 2006, **26**:3-11.
73. Sun GJ, Sailor KA, Mahmood QA, Chavali N, Christian KM, Song H, Ming GL: **Seamless reconstruction of intact adult-born neurons by serial end-block imaging reveals complex axonal guidance and development in the adult hippocampus.** *J Neurosci* 2013, **33**:11400-11411.
74. Kempermann G, Gage FH: **Neurogenesis in the adult hippocampus.** *Novartis Found Symp* 2000, **231**:220-235; discussion 235-241, 302-226.
75. Evans J, Sumners C, Moore J, Huentelman MJ, Deng J, Gelband CH, Shaw G: **Characterization of mitotic neurons derived from adult**

BIBLIOGRAFÍA

- rat hypothalamus and brain stem. *J Neurophysiol* 2002, **87**:1076-1085.**
76. Snyder JS, Drew MR: **Functional neurogenesis over the years.** *Behav Brain Res* 2020, **382**:112470.
77. Delgado AC, Ferron SR, Vicente D, Porlan E, Perez-Villalba A, Trujillo CM, D'Ocon P, Farinas I: **Endothelial NT-3 delivered by vasculature and CSF promotes quiescence of subependymal neural stem cells through nitric oxide induction.** *Neuron* 2014, **83**:572-585.
78. Tavazoie M, Van der Veken L, Silva-Vargas V, Louissaint M, Colonna L, Zaidi B, Garcia-Verdugo JM, Doetsch F: **A specialized vascular niche for adult neural stem cells.** *Cell Stem Cell* 2008, **3**:279-288.
79. Sierra A, Encinas JM, Deudero JJ, Chancey JH, Enikolopov G, Overstreet-Wadiche LS, Tsirka SE, Maletic-Savatic M: **Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis.** *Cell Stem Cell* 2010, **7**:483-495.
80. Ekdahl CT, Claassen JH, Bonde S, Kokaia Z, Lindvall O: **Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**:13632-13637.
81. Alfonso J, Le Magueresse C, Zuccotti A, Khodosevich K, Monyer H: **Diazepam binding inhibitor promotes progenitor proliferation in the postnatal SVZ by reducing GABA signaling.** *Cell Stem Cell* 2012, **10**:76-87.
82. Liu X, Wang Q, Haydar TF, Bordey A: **Nonsynaptic GABA signaling in postnatal subventricular zone controls proliferation of GFAP-expressing progenitors.** *Nat Neurosci* 2005, **8**:1179-1187.
83. Kawaguchi D, Furutachi S, Kawai H, Hozumi K, Gotoh Y: **Dll1 maintains quiescence of adult neural stem cells and segregates asymmetrically during mitosis.** *Nat Commun* 2013, **4**:1880.
84. Barkho BZ, Song H, Aimone JB, Smrt RD, Kuwabara T, Nakashima K, Gage FH, Zhao X: **Identification of astrocyte-expressed factors that modulate neural stem/progenitor cell differentiation.** *Stem Cells Dev* 2006, **15**:407-421.
85. Dillen Y, Kemps H, Gervois P, Wolfs E, Bronckaers A: **Adult Neurogenesis in the Subventricular Zone and Its Regulation After**

- Ischemic Stroke: Implications for Therapeutic Approaches.** *Transl Stroke Res* 2020, **11**:60-79.
86. Kazanis I, French-Constant C: **Extracellular matrix and the neural stem cell niche.** *Dev Neurobiol* 2011, **71**:1006-1017.
87. Kokovay E, Wang Y, Kusek G, Wurster R, Lederman P, Lowry N, Shen Q, Temple S: **VCAM1 is essential to maintain the structure of the SVZ niche and acts as an environmental sensor to regulate SVZ lineage progression.** *Cell Stem Cell* 2012, **11**:220-230.
88. Porcheri C, Suter U, Jessberger S: **Dissecting integrin-dependent regulation of neural stem cell proliferation in the adult brain.** *J Neurosci* 2014, **34**:5222-5232.
89. Faigle R, Song H: **Signaling mechanisms regulating adult neural stem cells and neurogenesis.** *Biochim Biophys Acta* 2013, **1830**:2435-2448.
90. Lim DA, Tramontin AD, Trevejo JM, Herrera DG, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A: **Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis.** *Neuron* 2000, **28**:713-726.
91. Mira H, Andreu Z, Suh H, Lie DC, Jessberger S, Consiglio A, San Emeterio J, Hortiguera R, Marques-Torres MA, Nakashima K, et al: **Signaling through BMPRII regulates quiescence and long-term activity of neural stem cells in the adult hippocampus.** *Cell Stem Cell* 2010, **7**:78-89.
92. Breunig JJ, Silbereis J, Vaccarino FM, Sestan N, Rakic P: **Notch regulates cell fate and dendrite morphology of newborn neurons in the postnatal dentate gyrus.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**:20558-20563.
93. Seib DR, Corsini NS, Ellwanger K, Plaas C, Mateos A, Pitzer C, Niehrs C, Celikel T, Martin-Villalba A: **Loss of Dickkopf-1 restores neurogenesis in old age and counteracts cognitive decline.** *Cell Stem Cell* 2013, **12**:204-214.
94. Ferent J, Cochard L, Faure H, Taddei M, Hahn H, Ruat M, Traiffort E: **Genetic activation of Hedgehog signaling unbalances the rate of neural stem cell renewal by increasing symmetric divisions.** *Stem Cell Reports* 2014, **3**:312-323.

BIBLIOGRAFÍA

95. Kuhn HG, Palmer TD, Fuchs E: **Adult neurogenesis: a compensatory mechanism for neuronal damage.** *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2001, **251**:152-158.
96. Aberg MA, Aberg ND, Hedbacker H, Oscarsson J, Eriksson PS: **Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus.** *J Neurosci* 2000, **20**:2896-2903.
97. Pencea V, Bingaman KD, Wiegand SJ, Luskin MB: **Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus.** *J Neurosci* 2001, **21**:6706-6717.
98. Kuhn HG, Winkler J, Kempermann G, Thal LJ, Gage FH: **Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain.** *J Neurosci* 1997, **17**:5820-5829.
99. Berg DA, Belnoue L, Song H, Simon A: **Neurotransmitter-mediated control of neurogenesis in the adult vertebrate brain.** *Development* 2013, **140**:2548-2561.
100. Fernando RN, Eleuteri B, Abdelhady S, Nussenzweig A, Andang M, Ernfors P: **Cell cycle restriction by histone H2AX limits proliferation of adult neural stem cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108**:5837-5842.
101. Kippin TE, Kapur S, van der Kooy D: **Dopamine specifically inhibits forebrain neural stem cell proliferation, suggesting a novel effect of antipsychotic drugs.** *J Neurosci* 2005, **25**:5815-5823.
102. Paez-Gonzalez P, Asrican B, Rodriguez E, Kuo CT: **Identification of distinct ChAT(+) neurons and activity-dependent control of postnatal SVZ neurogenesis.** *Nat Neurosci* 2014, **17**:934-942.
103. Tong CK, Chen J, Cebrian-Silla A, Mirzadeh Z, Obernier K, Guinto CD, Tecott LH, Garcia-Verdugo JM, Kriegstein A, Alvarez-Buylla A: **Axonal control of the adult neural stem cell niche.** *Cell Stem Cell* 2014, **14**:500-511.
104. Kunze A, Congreso MR, Hartmann C, Wallraff-Beck A, Huttmann K, Bedner P, Requardt R, Seifert G, Redecker C, Willecke K, et al: **Connexin expression by radial glia-like cells is required for**

- neurogenesis in the adult dentate gyrus.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**:11336-11341.
105. Ashton RS, Conway A, Pangarkar C, Bergen J, Lim KI, Shah P, Bissell M, Schaffer DV: **Astrocytes regulate adult hippocampal neurogenesis through ephrin-B signaling.** *Nat Neurosci* 2012, **15**:1399-1406.
 106. Ottone C, Krusche B, Whitby A, Clements M, Quadrato G, Pitulescu ME, Adams RH, Parrinello S: **Direct cell-cell contact with the vascular niche maintains quiescent neural stem cells.** *Nat Cell Biol* 2014, **16**:1045-1056.
 107. Lehtinen MK, Zappaterra MW, Chen X, Yang YJ, Hill AD, Lun M, Maynard T, Gonzalez D, Kim S, Ye P, et al: **The cerebrospinal fluid provides a proliferative niche for neural progenitor cells.** *Neuron* 2011, **69**:893-905.
 108. Paik JH, Ding Z, Narurkar R, Ramkissoon S, Muller F, Kamoun WS, Chae SS, Zheng H, Ying H, Mahoney J, et al: **FoxOs cooperatively regulate diverse pathways governing neural stem cell homeostasis.** *Cell Stem Cell* 2009, **5**:540-553.
 109. Renault VM, Rafalski VA, Morgan AA, Salih DA, Brett JO, Webb AE, Villeda SA, Thekkat PU, Guilleroy C, Denko NC, et al: **FoxO3 regulates neural stem cell homeostasis.** *Cell Stem Cell* 2009, **5**:527-539.
 110. Scobie KN, Hall BJ, Wilke SA, Klemenhausen KC, Fujii-Kuriyama Y, Ghosh A, Hen R, Sahay A: **Kruppel-like factor 9 is necessary for late-phase neuronal maturation in the developing dentate gyrus and during adult hippocampal neurogenesis.** *J Neurosci* 2009, **29**:9875-9887.
 111. Lavado A, Lagutin OV, Chow LM, Baker SJ, Oliver G: **Prox1 is required for granule cell maturation and intermediate progenitor maintenance during brain neurogenesis.** *PLoS Biol* 2010, **8**.
 112. Kuwabara T, Hsieh J, Muotri A, Yeo G, Warashina M, Lie DC, Moore L, Nakashima K, Asashima M, Gage FH: **Wnt-mediated activation of NeuroD1 and retro-elements during adult neurogenesis.** *Nat Neurosci* 2009, **12**:1097-1105.
 113. Ehm O, Goritz C, Covic M, Schaffner I, Schwarz TJ, Karaca E, Kempkes B, Kremmer E, Pfrieger FW, Espinosa L, et al: **RBPJkappa-**

BIBLIOGRAFÍA

- dependent signaling is essential for long-term maintenance of neural stem cells in the adult hippocampus.** *J Neurosci* 2010, **30**:13794-13807.
114. Favaro R, Valotta M, Ferri AL, Latorre E, Mariani J, Giachino C, Lancini C, Tosetti V, Ottolenghi S, Taylor V, Nicolis SK: **Hippocampal development and neural stem cell maintenance require Sox2-dependent regulation of Shh.** *Nat Neurosci* 2009, **12**:1248-1256.
115. Andersen J, Urban N, Achimastou A, Ito A, Simic M, Ullom K, Martynoga B, Lebel M, Goritz C, Frisen J, et al: **A transcriptional mechanism integrating inputs from extracellular signals to activate hippocampal stem cells.** *Neuron* 2014, **83**:1085-1097.
116. Qu Q, Sun G, Li W, Yang S, Ye P, Zhao C, Yu RT, Gage FH, Evans RM, Shi Y: **Orphan nuclear receptor TLX activates Wnt/beta-catenin signalling to stimulate neural stem cell proliferation and self-renewal.** *Nat Cell Biol* 2010, **12**:31-40; sup pp 31-39.
117. Hsieh J: **Orchestrating transcriptional control of adult neurogenesis.** *Genes Dev* 2012, **26**:1010-1021.
118. Doetsch F, Petreanu L, Caille I, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A: **EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells.** *Neuron* 2002, **36**:1021-1034.
119. Brill MS, Snapyan M, Wohlfrom H, Ninkovic J, Jawerka M, Mastick GS, Ashery-Padan R, Saghatelyan A, Berninger B, Gotz M: **A dlx2- and pax6-dependent transcriptional code for periglomerular neuron specification in the adult olfactory bulb.** *J Neurosci* 2008, **28**:6439-6452.
120. Hack MA, Saghatelyan A, de Chevigny A, Pfeifer A, Ashery-Padan R, Lledo PM, Gotz M: **Neuronal fate determinants of adult olfactory bulb neurogenesis.** *Nat Neurosci* 2005, **8**:865-872.
121. Li Z, McKercher SR, Cui J, Nie Z, Soussou W, Roberts AJ, Sallmen T, Lipton JH, Talantova M, Okamoto S, Lipton SA: **Myocyte enhancer factor 2C as a neurogenic and antiapoptotic transcription factor in murine embryonic stem cells.** *J Neurosci* 2008, **28**:6557-6568.
122. Li H, Radford JC, Ragusa MJ, Shea KL, McKercher SR, Zaremba JD, Soussou W, Nie Z, Kang YJ, Nakanishi N, et al: **Transcription factor**

- MEF2C influences neural stem/progenitor cell differentiation and maturation in vivo.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**:9397-9402.
123. Barbosa AC, Kim MS, Ertunc M, Adachi M, Nelson ED, McAnally J, Richardson JA, Kavalali ET, Monteggia LM, Bassel-Duby R, Olson EN: **MEF2C, a transcription factor that facilitates learning and memory by negative regulation of synapse numbers and function.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**:9391-9396.
124. Okamoto S, Krainc D, Sherman K, Lipton SA: **Antiapoptotic role of the p38 mitogen-activated protein kinase-myocyte enhancer factor 2 transcription factor pathway during neuronal differentiation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**:7561-7566.
125. Zhu B, Carmichael RE, Solabre Valois L, Wilkinson KA, Henley JM: **The transcription factor MEF2A plays a key role in the differentiation/maturation of rat neural stem cells into neurons.** *Biochem Biophys Res Commun* 2018, **500**:645-649.
126. Flavell SW, Cowan CW, Kim TK, Greer PL, Lin Y, Paradis S, Griffith EC, Hu LS, Chen C, Greenberg ME: **Activity-dependent regulation of MEF2 transcription factors suppresses excitatory synapse number.** *Science* 2006, **311**:1008-1012.
127. Yao B, Christian KM, He C, Jin P, Ming GL, Song H: **Epigenetic mechanisms in neurogenesis.** *Nat Rev Neurosci* 2016, **17**:537-549.
128. Martins-Taylor K, Schroeder DI, LaSalle JM, Lalande M, Xu RH: **Role of DNMT3B in the regulation of early neural and neural crest specifiers.** *Epigenetics* 2012, **7**:71-82.
129. Zhang RR, Cui QY, Murai K, Lim YC, Smith ZD, Jin S, Ye P, Rosa L, Lee YK, Wu HP, et al: **Tet1 regulates adult hippocampal neurogenesis and cognition.** *Cell Stem Cell* 2013, **13**:237-245.
130. Ma DK, Jang MH, Guo JU, Kitabatake Y, Chang ML, Pow-Anpongkul N, Flavell RA, Lu B, Ming GL, Song H: **Neuronal activity-induced Gadd45b promotes epigenetic DNA demethylation and adult neurogenesis.** *Science* 2009, **323**:1074-1077.
131. Liu C, Teng ZQ, Santistevan NJ, Szulwach KE, Guo W, Jin P, Zhao X: **Epigenetic regulation of miR-184 by MBD1 governs neural stem cell proliferation and differentiation.** *Cell Stem Cell* 2010, **6**:433-444.

BIBLIOGRAFÍA

132. Molofsky AV, Pardal R, Iwashita T, Park IK, Clarke MF, Morrison SJ: **Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation.** *Nature* 2003, **425**:962-967.
133. Zhang J, Ji F, Liu Y, Lei X, Li H, Ji G, Yuan Z, Jiao J: **Ezh2 regulates adult hippocampal neurogenesis and memory.** *J Neurosci* 2014, **34**:5184-5199.
134. Norwood J, Franklin JM, Sharma D, D'Mello SR: **Histone deacetylase 3 is necessary for proper brain development.** *J Biol Chem* 2014, **289**:34569-34582.
135. Li X, Jin P: **Roles of small regulatory RNAs in determining neuronal identity.** *Nat Rev Neurosci* 2010, **11**:329-338.
136. Ramos AD, Diaz A, Nellore A, Delgado RN, Park KY, Gonzales-Roybal G, Oldham MC, Song JS, Lim DA: **Integration of genome-wide approaches identifies lncRNAs of adult neural stem cells and their progeny in vivo.** *Cell Stem Cell* 2013, **12**:616-628.
137. Ramos AD, Andersen RE, Liu SJ, Nowakowski TJ, Hong SJ, Gertz C, Salinas RD, Zarabi H, Kriegstein AR, Lim DA: **The long noncoding RNA Pnky regulates neuronal differentiation of embryonic and postnatal neural stem cells.** *Cell Stem Cell* 2015, **16**:439-447.
138. Cheng LC, Pastrana E, Tavazoie M, Doetsch F: **miR-124 regulates adult neurogenesis in the subventricular zone stem cell niche.** *Nat Neurosci* 2009, **12**:399-408.
139. Szulwach KE, Li X, Smrt RD, Li Y, Luo Y, Lin L, Santistevan NJ, Li W, Zhao X, Jin P: **Cross talk between microRNA and epigenetic regulation in adult neurogenesis.** *J Cell Biol* 2010, **189**:127-141.
140. Beukelaers P, Vandenbosch R, Caron N, Nguyen L, Belachew S, Moonen G, Kiyokawa H, Barbacid M, Santamaria D, Malgrange B: **Cdk6-dependent regulation of G(1) length controls adult neurogenesis.** *Stem Cells* 2011, **29**:713-724.
141. Artegiani B, Lindemann D, Calegari F: **Overexpression of cdk4 and cyclinD1 triggers greater expansion of neural stem cells in the adult mouse brain.** *J Exp Med* 2011, **208**:937-948.
142. Farioli-Vecchioli S, Ceccarelli M, Saraulli D, Micheli L, Cannas S, D'Alessandro F, Scardigli R, Leonardi L, Cina I, Costanzi M, et al: **Tis21 is required for adult neurogenesis in the subventricular zone**

- and for olfactory behavior regulating cyclins, BMP4, Hes1/5 and Ids.** *Front Cell Neurosci* 2014, **8**:98.
143. Kawauchi T: **Cdk5 regulates multiple cellular events in neural development, function and disease.** *Dev Growth Differ* 2014, **56**:335-348.
 144. Hirota Y, Ohshima T, Kaneko N, Ikeda M, Iwasato T, Kulkarni AB, Mikoshiba K, Okano H, Sawamoto K: **Cyclin-dependent kinase 5 is required for control of neuroblast migration in the postnatal subventricular zone.** *J Neurosci* 2007, **27**:12829-12838.
 145. Kowalczyk A, Filipkowski RK, Rylski M, Wilczynski GM, Konopacki FA, Jaworski J, Ciemerych MA, Sicinski P, Kaczmarek L: **The critical role of cyclin D2 in adult neurogenesis.** *J Cell Biol* 2004, **167**:209-213.
 146. Glickstein SB, Monaghan JA, Koeller HB, Jones TK, Ross ME: **Cyclin D2 is critical for intermediate progenitor cell proliferation in the embryonic cortex.** *J Neurosci* 2009, **29**:9614-9624.
 147. Jiang Y, Hsieh J: **HDAC3 controls gap 2/mitosis progression in adult neural stem/progenitor cells by regulating CDK1 levels.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014, **111**:13541-13546.
 148. Kawauchi T, Shikanai M, Kosodo Y: **Extra-cell cycle regulatory functions of cyclin-dependent kinases (CDK) and CDK inhibitor proteins contribute to brain development and neurological disorders.** *Genes Cells* 2013, **18**:176-194.
 149. Bourgognon JM, Spiers JG, Scheiblich H, Antonov A, Bradley SJ, Tobin AB, Steinert JR: **Alterations in neuronal metabolism contribute to the pathogenesis of prion disease.** *Cell Death Differ* 2018, **25**:1408-1425.
 150. Maffezzini C, Calvo-Garrido J, Wredenber A, Freyer C: **Metabolic regulation of neurodifferentiation in the adult brain.** *Cell Mol Life Sci* 2020, **77**:2483-2496.
 151. Bauernfeind AL, Barks SK, Duka T, Grossman LI, Hof PR, Sherwood CC: **Aerobic glycolysis in the primate brain: reconsidering the implications for growth and maintenance.** *Brain Struct Funct* 2014, **219**:1149-1167.

BIBLIOGRAFÍA

152. Zheng X, Boyer L, Jin M, Mertens J, Kim Y, Ma L, Ma L, Hamm M, Gage FH, Hunter T: **Metabolic reprogramming during neuronal differentiation from aerobic glycolysis to neuronal oxidative phosphorylation.** *Elife* 2016, **5**.
153. Agostini M, Romeo F, Inoue S, Niklison-Chirou MV, Elia AJ, Dinsdale D, Morone N, Knight RA, Mak TW, Melino G: **Metabolic reprogramming during neuronal differentiation.** *Cell Death Differ* 2016, **23**:1502-1514.
154. Segarra-Mondejar M, Casellas-Diaz S, Ramiro-Pareta M, Muller-Sanchez C, Martorell-Riera A, Hermelo I, Reina M, Aragonés J, Martínez-Estrada OM, Soriano FX: **Synaptic activity-induced glycolysis facilitates membrane lipid provision and neurite outgrowth.** *EMBO J* 2018, **37**.
155. Bond AM, Ming GL, Song H: **Adult Mammalian Neural Stem Cells and Neurogenesis: Five Decades Later.** *Cell Stem Cell* 2015, **17**:385-395.
156. Farioli-Vecchioli S, Tirone F: **Control of the Cell Cycle in Adult Neurogenesis and its Relation with Physical Exercise.** *Brain Plast* 2015, **1**:41-54.
157. Carpentier PA, Palmer TD: **Immune influence on adult neural stem cell regulation and function.** *Neuron* 2009, **64**:79-92.
158. Wyss-Coray T: **Ageing, neurodegeneration and brain rejuvenation.** *Nature* 2016, **539**:180-186.
159. Guo J, Huang X, Dou L, Yan M, Shen T, Tang W, Li J: **Aging and aging-related diseases: from molecular mechanisms to interventions and treatments.** *Signal Transduct Target Ther* 2022, **7**:391.
160. Hou Y, Dan X, Babbar M, Wei Y, Hasselbalch SG, Croteau DL, Bohr VA: **Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease.** *Nat Rev Neurol* 2019, **15**:565-581.
161. Zocher S, Toda T: **Epigenetic aging in adult neurogenesis.** *Hippocampus* 2023, **33**:347-359.
162. Camandola S, Mattson MP: **Brain metabolism in health, aging, and neurodegeneration.** *EMBO J* 2017, **36**:1474-1492.
163. Stranahan AM, Arumugam TV, Cutler RG, Lee K, Egan JM, Mattson MP: **Diabetes impairs hippocampal function through**

- glucocorticoid-mediated effects on new and mature neurons. *Nat Neurosci* 2008, **11**:309-317.**
164. Katsimpardi L, Lledo PM: **Regulation of neurogenesis in the adult and aging brain.** *Curr Opin Neurobiol* 2018, **53**:131-138.
165. Bourdenx M, Koulakiotis NS, Sanoudou D, Bezard E, Dehay B, Tsarbopoulos A: **Protein aggregation and neurodegeneration in prototypical neurodegenerative diseases: Examples of amyloidopathies, tauopathies and synucleinopathies.** *Prog Neurobiol* 2017, **155**:171-193.
166. Vistoli G, De Maddis D, Cipak A, Zarkovic N, Carini M, Aldini G: **Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation.** *Free Radic Res* 2013, **47 Suppl 1**:3-27.
167. Gugliucci A: **Formation of Fructose-Mediated Advanced Glycation End Products and Their Roles in Metabolic and Inflammatory Diseases.** *Adv Nutr* 2017, **8**:54-62.
168. Dorcely B, Katz K, Jagannathan R, Chiang SS, Oluwadare B, Goldberg IJ, Bergman M: **Novel biomarkers for prediabetes, diabetes, and associated complications.** *Diabetes Metab Syndr Obes* 2017, **10**:345-361.
169. Heidari F, Rabizadeh S, Rajab A, Heidari F, Mouodi M, Mirmiranpour H, Esteghamati A, Nakhjavani M: **Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products levels are correlates of duration of type 2 diabetes.** *Life Sci* 2020, **260**:118422.
170. Qiu HY, Hou NN, Shi JF, Liu YP, Kan CX, Han F, Sun XD: **Comprehensive overview of human serum albumin glycation in diabetes mellitus.** *World J Diabetes* 2021, **12**:1057-1069.
171. Ott C, Jacobs K, Haucke E, Navarrete Santos A, Grune T, Simm A: **Role of advanced glycation end products in cellular signaling.** *Redox Biol* 2014, **2**:411-429.
172. Twarda-Clapa A, Olczak A, Bialkowska AM, Koziolkiewicz M: **Advanced Glycation End-Products (AGEs): Formation, Chemistry, Classification, Receptors, and Diseases Related to AGEs.** *Cells* 2022, **11**.

BIBLIOGRAFÍA

173. Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L: **Advanced glycation end-products: a review.** *Diabetologia* 2001, **44**:129-146.
174. Gill V, Kumar V, Singh K, Kumar A, Kim JJ: **Advanced Glycation End Products (AGEs) May Be a Striking Link Between Modern Diet and Health.** *Biomolecules* 2019, **9**.
175. Snelson M, Coughlan MT: **Dietary Advanced Glycation End Products: Digestion, Metabolism and Modulation of Gut Microbial Ecology.** *Nutrients* 2019, **11**.
176. Uribarri J, Woodruff S, Goodman S, Cai W, Chen X, Pyzik R, Yong A, Striker GE, Vlassara H: **Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet.** *J Am Diet Assoc* 2010, **110**:911-916 e912.
177. Delgado-Andrade C: **Carboxymethyl-lysine: thirty years of investigation in the field of AGE formation.** *Food Funct* 2016, **7**:46-57.
178. Monnier VM: **Bacterial enzymes that can deglycate glucose- and fructose-modified lysine.** *Biochem J* 2005, **392**:e1-3.
179. Garay-Sevilla ME, Rojas A, Portero-Otin M, Uribarri J: **Dietary AGEs as Exogenous Boosters of Inflammation.** *Nutrients* 2021, **13**.
180. Mastrocola R, Collotta D, Gaudio G, Le Berre M, Cento AS, Ferreira Alves G, Chiazza F, Verta R, Bertocchi I, Manig F, et al: **Effects of Exogenous Dietary Advanced Glycation End Products on the Cross-Talk Mechanisms Linking Microbiota to Metabolic Inflammation.** *Nutrients* 2020, **12**.
181. van Dongen KCW, Kappetein L, Miro Estruch I, Belzer C, Beekmann K, Rietjens I: **Differences in kinetics and dynamics of endogenous versus exogenous advanced glycation end products (AGEs) and their precursors.** *Food Chem Toxicol* 2022, **164**:112987.
182. Zhang Q, Wang Y, Fu L: **Dietary advanced glycation end-products: Perspectives linking food processing with health implications.** *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2020, **19**:2559-2587.
183. Saito A, Takeda T, Sato K, Hama H, Tanuma A, Kaseda R, Suzuki Y, Gejyo F: **Significance of proximal tubular metabolism of advanced glycation end products in kidney diseases.** *Ann N Y Acad Sci* 2005, **1043**:637-643.

184. Cerami C, Founds H, Nicholl I, Mitsuhashi T, Giordano D, Vanpatten S, Lee A, Al-Abed Y, Vlassara H, Bucala R, Cerami A: **Tobacco smoke is a source of toxic reactive glycation products.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**:13915-13920.
185. Sergi D, Boulestin H, Campbell FM, Williams LM: **The Role of Dietary Advanced Glycation End Products in Metabolic Dysfunction.** *Mol Nutr Food Res* 2021, **65**:e1900934.
186. Cecil DL, Johnson K, Rediske J, Lotz M, Schmidt AM, Terkeltaub R: **Inflammation-induced chondrocyte hypertrophy is driven by receptor for advanced glycation end products.** *J Immunol* 2005, **175**:8296-8302.
187. Vlassara H, Cai W, Crandall J, Goldberg T, Oberstein R, Dardaine V, Peppas M, Rayfield EJ: **Inflammatory mediators are induced by dietary glycotoxins, a major risk factor for diabetic angiopathy.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**:15596-15601.
188. Moheimani F, Morgan PE, van Reyk DM, Davies MJ: **Deleterious effects of reactive aldehydes and glycated proteins on macrophage proteasomal function: possible links between diabetes and atherosclerosis.** *Biochim Biophys Acta* 2010, **1802**:561-571.
189. Shen CY, Lu CH, Wu CH, Li KJ, Kuo YM, Hsieh SC, Yu CL: **The Development of Maillard Reaction, and Advanced Glycation End Product (AGE)-Receptor for AGE (RAGE) Signaling Inhibitors as Novel Therapeutic Strategies for Patients with AGE-Related Diseases.** *Molecules* 2020, **25**.
190. Chaudhuri J, Bains Y, Guha S, Kahn A, Hall D, Bose N, Gugliucci A, Kapahi P: **The Role of Advanced Glycation End Products in Aging and Metabolic Diseases: Bridging Association and Causality.** *Cell Metab* 2018, **28**:337-352.
191. Lund J, Ouwens DM, Wettergreen M, Bakke SS, Thoresen GH, Aas V: **Increased Glycolysis and Higher Lactate Production in Hyperglycemic Myotubes.** *Cells* 2019, **8**.
192. Sharma S, Mustafiz A, Singla-Pareek SL, Shankar Srivastava P, Sopory SK: **Characterization of stress and methylglyoxal inducible triose phosphate isomerase (OscTPI) from rice.** *Plant Signal Behav* 2012, **7**:1337-1345.

BIBLIOGRAFÍA

193. Li J, Liu D, Sun L, Lu Y, Zhang Z: **Advanced glycation end products and neurodegenerative diseases: mechanisms and perspective.** *J Neurol Sci* 2012, **317**:1-5.
194. Van Schaftingen E, Collard F, Wiame E, Veiga-da-Cunha M: **Enzymatic repair of Amadori products.** *Amino Acids* 2012, **42**:1143-1150.
195. Richarme G, Mihoub M, Dairou J, Bui LC, Leger T, Lamouri A: **Parkinsonism-associated protein DJ-1/Park7 is a major protein deglycase that repairs methylglyoxal- and glyoxal-glycated cysteine, arginine, and lysine residues.** *J Biol Chem* 2015, **290**:1885-1897.
196. Lee JY, Song J, Kwon K, Jang S, Kim C, Baek K, Kim J, Park C: **Human DJ-1 and its homologs are novel glyoxalases.** *Hum Mol Genet* 2012, **21**:3215-3225.
197. Taylor A: **Mechanistically linking age-related diseases and dietary carbohydrate via autophagy and the ubiquitin proteolytic systems.** *Autophagy* 2012, **8**:1404-1406.
198. Takahashi A, Takabatake Y, Kimura T, Maejima I, Namba T, Yamamoto T, Matsuda J, Minami S, Kaimori JY, Matsui I, et al: **Autophagy Inhibits the Accumulation of Advanced Glycation End Products by Promoting Lysosomal Biogenesis and Function in the Kidney Proximal Tubules.** *Diabetes* 2017, **66**:1359-1372.
199. Uribarri J, Cai W, Peppas M, Goodman S, Ferrucci L, Striker G, Vlassara H: **Circulating glycotoxins and dietary advanced glycation endproducts: two links to inflammatory response, oxidative stress, and aging.** *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2007, **62**:427-433.
200. Vicente Miranda H, Szego EM, Oliveira LMA, Breda C, Darendelioglu E, de Oliveira RM, Ferreira DG, Gomes MA, Rott R, Oliveira M, et al: **Glycation potentiates alpha-synuclein-associated neurodegeneration in synucleinopathies.** *Brain* 2017, **140**:1399-1419.
201. Yan SD, Chen X, Schmidt AM, Brett J, Godman G, Zou YS, Scott CW, Caputo C, Frappier T, Smith MA, et al.: **Glycated tau protein in Alzheimer disease: a mechanism for induction of oxidant stress.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**:7787-7791.

202. Fleming TH, Theilen TM, Masania J, Wunderle M, Karimi J, Vittas S, Bernauer R, Bierhaus A, Rabbani N, Thornalley PJ, et al: **Aging-dependent reduction in glyoxalase 1 delays wound healing.** *Gerontology* 2013, **59**:427-437.
203. Nowotny K, Jung T, Hohn A, Weber D, Grune T: **Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus.** *Biomolecules* 2015, **5**:194-222.
204. Martin-Ventura JL, Rodrigues-Diez R, Martinez-Lopez D, Salaices M, Blanco-Colio LM, Briones AM: **Oxidative Stress in Human Atherothrombosis: Sources, Markers and Therapeutic Targets.** *Int J Mol Sci* 2017, **18**.
205. Maasen K, van Greevenbroek MMJ, Scheijen J, van der Kallen CJH, Stehouwer CDA, Schalkwijk CG: **High dietary glycemic load is associated with higher concentrations of urinary advanced glycation endproducts: the Cohort on Diabetes and Atherosclerosis Maastricht (CODAM) Study.** *Am J Clin Nutr* 2019, **110**:358-366.
206. Corica D, Aversa T, Ruggeri RM, Cristani M, Alibrandi A, Pepe G, De Luca F, Wasniewska M: **Could AGE/RAGE-Related Oxidative Homeostasis Dysregulation Enhance Susceptibility to Pathogenesis of Cardio-Metabolic Complications in Childhood Obesity?** *Front Endocrinol (Lausanne)* 2019, **10**:426.
207. Cordova R, Knaze V, Viallon V, Rust P, Schalkwijk CG, Weiderpass E, Wagner KH, Mayen-Chacon AL, Aglago EK, Dahm CC, et al: **Dietary intake of advanced glycation end products (AGEs) and changes in body weight in European adults.** *Eur J Nutr* 2020, **59**:2893-2904.
208. Bras IC, Konig A, Outeiro TF: **Glycation in Huntington's Disease: A Possible Modifier and Target for Intervention.** *J Huntingtons Dis* 2019, **8**:245-256.
209. Batkulwar K, Godbole R, Banarjee R, Kassar O, Williams RJ, Kulkarni MJ: **Advanced Glycation End Products Modulate Amyloidogenic APP Processing and Tau Phosphorylation: A Mechanistic Link between Glycation and the Development of Alzheimer's Disease.** *ACS Chem Neurosci* 2018, **9**:988-1000.

BIBLIOGRAFÍA

210. Senavirathna L, Pan S, Chen R: **Protein Advanced Glycation End Products and Their Implications in Pancreatic Cancer.** *Cancer Prev Res (Phila)* 2023, **16**:601-610.
211. Bronowicka-Szydelko A, Kotyra L, Lewandowski L, Gamian A, Kustrzeba-Wojcicka I: **Role of Advanced Glycation End-Products and Other Ligands for AGE Receptors in Thyroid Cancer Progression.** *J Clin Med* 2021, **10**.
212. Zeng C, Li Y, Ma J, Niu L, Tay FR: **Clinical/Translational Aspects of Advanced Glycation End-Products.** *Trends Endocrinol Metab* 2019, **30**:959-973.
213. Khalid M, Petroianu G, Adem A: **Advanced Glycation End Products and Diabetes Mellitus: Mechanisms and Perspectives.** *Biomolecules* 2022, **12**.
214. Vlassara H, Palace MR: **Diabetes and advanced glycation endproducts.** *J Intern Med* 2002, **251**:87-101.
215. Briceno Noriega D, Zenker HE, Croes CA, Ewaz A, Ruinemans-Koerts J, Savelkoul HFJ, van Neerven RJJ, Teodorowicz M: **Receptor Mediated Effects of Advanced Glycation End Products (AGEs) on Innate and Adaptative Immunity: Relevance for Food Allergy.** *Nutrients* 2022, **14**.
216. Xie J, Reverdatto S, Frolov A, Hoffmann R, Burz DS, Shekhtman A: **Structural basis for pattern recognition by the receptor for advanced glycation end products (RAGE).** *J Biol Chem* 2008, **283**:27255-27269.
217. Kierdorf K, Fritz G: **RAGE regulation and signaling in inflammation and beyond.** *J Leukoc Biol* 2013, **94**:55-68.
218. Scavello F, Zeni F, Tedesco CC, Mensa E, Veglia F, Procopio AD, Bonfigli AR, Olivieri F, Raucci A: **Modulation of soluble receptor for advanced glycation end-products (RAGE) isoforms and their ligands in healthy aging.** *Aging (Albany NY)* 2019, **11**:1648-1663.
219. Chuah YK, Basir R, Talib H, Tie TH, Nordin N: **Receptor for advanced glycation end products and its involvement in inflammatory diseases.** *Int J Inflamm* 2013, **2013**:403460.
220. Ding Q, Keller JN: **Evaluation of rage isoforms, ligands, and signaling in the brain.** *Biochim Biophys Acta* 2005, **1746**:18-27.

221. Bayarsaikhan E, Bayarsaikhan D, Lee J, Son M, Oh S, Moon J, Park HJ, Roshini A, Kim SU, Song BJ, et al: **Microglial AGE-albumin is critical for neuronal death in Parkinson's disease: a possible implication for theranostics.** *Int J Nanomedicine* 2015, **10 Spec Iss:**281-292.
222. Bopp C, Bierhaus A, Hofer S, Bouchon A, Nawroth PP, Martin E, Weigand MA: **Bench-to-bedside review: The inflammation-perpetuating pattern-recognition receptor RAGE as a therapeutic target in sepsis.** *Crit Care* 2008, **12:**201.
223. Zgutka K, Tkacz M, Tomasiak P, Tarnowski M: **A Role for Advanced Glycation End Products in Molecular Ageing.** *Int J Mol Sci* 2023, **24.**
224. Shangari N, O'Brien PJ: **The cytotoxic mechanism of glyoxal involves oxidative stress.** *Biochem Pharmacol* 2004, **68:**1433-1442.
225. Guerrero-Hernandez A, Leon-Aparicio D, Chavez-Reyes J, Olivares-Reyes JA, DeJesus S: **Endoplasmic reticulum stress in insulin resistance and diabetes.** *Cell Calcium* 2014, **56:**311-322.
226. Suzuki A, Yabu A, Nakamura H: **Advanced glycation end products in musculoskeletal system and disorders.** *Methods* 2022, **203:**179-186.
227. Soto C, Pritzkow S: **Protein misfolding, aggregation, and conformational strains in neurodegenerative diseases.** *Nat Neurosci* 2018, **21:**1332-1340.
228. Kampmann M: **Molecular and cellular mechanisms of selective vulnerability in neurodegenerative diseases.** *Nat Rev Neurosci* 2024.
229. Chi H, Chang HY, Sang TK: **Neuronal Cell Death Mechanisms in Major Neurodegenerative Diseases.** *Int J Mol Sci* 2018, **19.**
230. Vitek MP, Bhattacharya K, Glendening JM, Stopa E, Vlassara H, Bucala R, Manogue K, Cerami A: **Advanced glycation end products contribute to amyloidosis in Alzheimer disease.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91:**4766-4770.
231. Li XH, Du LL, Cheng XS, Jiang X, Zhang Y, Lv BL, Liu R, Wang JZ, Zhou XW: **Glycation exacerbates the neuronal toxicity of beta-amyloid.** *Cell Death Dis* 2013, **4:**e673.

BIBLIOGRAFÍA

232. D'Cunha NM, Sergi D, Lane MM, Naumovski N, Gamage E, Rajendran A, Kouvari M, Gauci S, Dissanayaka T, Marx W, Travica N: **The Effects of Dietary Advanced Glycation End-Products on Neurocognitive and Mental Disorders.** *Nutrients* 2022, **14**.
233. Zheng H, Koo EH: **Biology and pathophysiology of the amyloid precursor protein.** *Mol Neurodegener* 2011, **6**:27.
234. Guerrero E, Vasudevaraju P, Hegde ML, Britton GB, Rao KS: **Recent advances in alpha-synuclein functions, advanced glycation, and toxicity: implications for Parkinson's disease.** *Mol Neurobiol* 2013, **47**:525-536.
235. Padmaraju V, Bhaskar JJ, Prasada Rao UJ, Salimath PV, Rao KS: **Role of advanced glycation on aggregation and DNA binding properties of alpha-synuclein.** *J Alzheimers Dis* 2011, **24 Suppl 2**:211-221.
236. Chen L, Wei Y, Wang X, He R: **Ribosylation rapidly induces alpha-synuclein to form highly cytotoxic molten globules of advanced glycation end products.** *PLoS One* 2010, **5**:e9052.
237. Shibata N, Hirano A, Hedley-Whyte ET, Dal Canto MC, Nagai R, Uchida K, Horiuchi S, Kawaguchi M, Yamamoto T, Kobayashi M: **Selective formation of certain advanced glycation end products in spinal cord astrocytes of humans and mice with superoxide dismutase-1 mutation.** *Acta Neuropathol* 2002, **104**:171-178.
238. Iannuzzi C, Irace G, Sirangelo I: **Differential effects of glycation on protein aggregation and amyloid formation.** *Front Mol Biosci* 2014, **1**:9.
239. Sirangelo I, Vella FM, Irace G, Manco G, Iannuzzi C: **Glycation in Demethylated Superoxide Dismutase 1 Prevents Amyloid Aggregation and Produces Cytotoxic Ages Adducts.** *Front Mol Biosci* 2016, **3**:55.
240. Haseloff RF, Dithmer S, Winkler L, Wolburg H, Blasig IE: **Transmembrane proteins of the tight junctions at the blood-brain barrier: structural and functional aspects.** *Semin Cell Dev Biol* 2015, **38**:16-25.
241. Rom S, Heldt NA, Gajghate S, Seliga A, Reichenbach NL, Persidsky Y: **Hyperglycemia and advanced glycation end products disrupt BBB and promote occludin and claudin-5 protein secretion on extracellular microvesicles.** *Sci Rep* 2020, **10**:7274.

242. Li W, Maloney RE, Aw TY: **High glucose, glucose fluctuation and carbonyl stress enhance brain microvascular endothelial barrier dysfunction: Implications for diabetic cerebral microvasculature.** *Redox Biol* 2015, **5**:80-90.
243. Bonnans C, Chou J, Werb Z: **Remodelling the extracellular matrix in development and disease.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014, **15**:786-801.
244. Kamada H, Yu F, Nito C, Chan PH: **Influence of hyperglycemia on oxidative stress and matrix metalloproteinase-9 activation after focal cerebral ischemia/reperfusion in rats: relation to blood-brain barrier dysfunction.** *Stroke* 2007, **38**:1044-1049.
245. Jayaraj RL, Azimullah S, Beiram R, Jalal FY, Rosenberg GA: **Neuroinflammation: friend and foe for ischemic stroke.** *J Neuroinflammation* 2019, **16**:142.
246. Navaratna D, Fan X, Leung W, Lok J, Guo S, Xing C, Wang X, Lo EH: **Cerebrovascular degradation of TRKB by MMP9 in the diabetic brain.** *J Clin Invest* 2013, **123**:3373-3377.
247. Furber JD: **Extracellular glycation crosslinks: prospects for removal.** *Rejuvenation Res* 2006, **9**:274-278.
248. Cao L, Wang H, Wang F: **Amyloid-beta-induced matrix metalloproteinase-9 secretion is associated with retinal pigment epithelial barrier disruption.** *Int J Mol Med* 2013, **31**:1105-1112.
249. Fournet M, Bonte F, Desmouliere A: **Glycation Damage: A Possible Hub for Major Pathophysiological Disorders and Aging.** *Aging Dis* 2018, **9**:880-900.
250. Valdinocci D, Radford RAW, Goulding M, Hayashi J, Chung RS, Pountney DL: **Extracellular Interactions of Alpha-Synuclein in Multiple System Atrophy.** *Int J Mol Sci* 2018, **19**.
251. Bongarzone S, Savickas V, Luzi F, Gee AD: **Targeting the Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE): A Medicinal Chemistry Perspective.** *J Med Chem* 2017, **60**:7213-7232.
252. Yan SD, Chen X, Fu J, Chen M, Zhu H, Roher A, Slattery T, Zhao L, Nagashima M, Morser J, et al: **RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease.** *Nature* 1996, **382**:685-691.

BIBLIOGRAFÍA

253. Ray R, Juranek JK, Rai V: **RAGE axis in neuroinflammation, neurodegeneration and its emerging role in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis.** *Neurosci Biobehav Rev* 2016, **62**:48-55.
254. Orlova VV, Choi EY, Xie C, Chavakis E, Bierhaus A, Ihanus E, Ballantyne CM, Gahmberg CG, Bianchi ME, Nawroth PP, Chavakis T: **A novel pathway of HMGB1-mediated inflammatory cell recruitment that requires Mac-1-integrin.** *EMBO J* 2007, **26**:1129-1139.
255. Zhong H, Li X, Zhou S, Jiang P, Liu X, Ouyang M, Nie Y, Chen X, Zhang L, Liu Y, et al: **Interplay between RAGE and TLR4 Regulates HMGB1-Induced Inflammation by Promoting Cell Surface Expression of RAGE and TLR4.** *J Immunol* 2020, **205**:767-775.
256. Fang F, Lue LF, Yan S, Xu H, Luddy JS, Chen D, Walker DG, Stern DM, Yan S, Schmidt AM, et al: **RAGE-dependent signaling in microglia contributes to neuroinflammation, Abeta accumulation, and impaired learning/memory in a mouse model of Alzheimer's disease.** *FASEB J* 2010, **24**:1043-1055.
257. Alikhani M, Maclellan CM, Raptis M, Vora S, Trackman PC, Graves DT: **Advanced glycation end products induce apoptosis in fibroblasts through activation of ROS, MAP kinases, and the FOXO1 transcription factor.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2007, **292**:C850-856.
258. Mahali S, Raviprakash N, Raghavendra PB, Manna SK: **Advanced glycation end products (AGEs) induce apoptosis via a novel pathway: involvement of Ca²⁺ mediated by interleukin-8 protein.** *J Biol Chem* 2011, **286**:34903-34913.
259. Lai MC, Liu WY, Liou SS, Liu IM: **A Bibenzyl Component Moscatilin Mitigates Glycation-Mediated Damages in an SH-SY5Y Cell Model of Neurodegenerative Diseases through AMPK Activation and RAGE/NF-kappaB Pathway Suppression.** *Molecules* 2020, **25**.
260. Guo Y, Zhang Y, Yang X, Lu P, Yan X, Xiao F, Zhou H, Wen C, Shi M, Lu J, Meng QH: **Effects of methylglyoxal and glyoxalase I inhibition on breast cancer cells proliferation, invasion, and apoptosis through modulation of MAPKs, MMP9, and Bcl-2.** *Cancer Biol Ther* 2016, **17**:169-180.

261. Lee JH, Parveen A, Do MH, Kang MC, Yumnam S, Kim SY: **Molecular mechanisms of methylglyoxal-induced aortic endothelial dysfunction in human vascular endothelial cells.** *Cell Death Dis* 2020, **11**:403.
262. Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J, Dichgans J: **Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration.** *Eur J Biochem* 2000, **267**:4904-4911.
263. Samson FE, Nelson SR: **The aging brain, metals and oxygen free radicals.** *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2000, **46**:699-707.
264. Calabrese V, Guagliano E, Sapienza M, Panebianco M, Calafato S, Puleo E, Pennisi G, Mancuso C, Butterfield DA, Stella AG: **Redox regulation of cellular stress response in aging and neurodegenerative disorders: role of vitagenes.** *Neurochem Res* 2007, **32**:757-773.
265. Nikolic-Kokic A, Stevic Z, Blagojevic D, Davidovic B, Jones DR, Spasic MB: **Alterations in anti-oxidative defence enzymes in erythrocytes from sporadic amyotrophic lateral sclerosis (SALS) and familial ALS patients.** *Clin Chem Lab Med* 2006, **44**:589-593.
266. Niwa T, Tsukushi S: **3-deoxyglucosone and AGEs in uremic complications: inactivation of glutathione peroxidase by 3-deoxyglucosone.** *Kidney Int Suppl* 2001, **78**:S37-41.
267. Lapolla A, Piarulli F, Sartore G, Ceriello A, Ragazzi E, Reitano R, Baccarin L, Laverda B, Fedele D: **Advanced glycation end products and antioxidant status in type 2 diabetic patients with and without peripheral artery disease.** *Diabetes Care* 2007, **30**:670-676.
268. Gan WJ, Gao CL, Zhang WQ, Gu JL, Zhao TT, Guo HL, Zhou H, Xu Y, Yu LL, Li LF, et al: **Kuwanon G protects HT22 cells from advanced glycation end product-induced damage.** *Exp Ther Med* 2021, **21**:425.
269. Kuhla B, Boeck K, Schmidt A, Ogunlade V, Arendt T, Munch G, Luth HJ: **Age- and stage-dependent glyoxalase I expression and its activity in normal and Alzheimer's disease brains.** *Neurobiol Aging* 2007, **28**:29-41.

BIBLIOGRAFÍA

270. Distler MG, Palmer AA: **Role of Glyoxalase 1 (Glo1) and methylglyoxal (MG) in behavior: recent advances and mechanistic insights.** *Front Genet* 2012, **3**:250.
271. Dyer AH, McKenna L, Batten I, Jones K, Widdowson M, Dunne J, Conlon N, Reilly R, Woods CP, O'Neill D, et al: **Peripheral Inflammation and Cognitive Performance in Middle-Aged Adults With and Without Type 2 Diabetes: Results From the ENBIND Study.** *Front Aging Neurosci* 2020, **12**:605878.
272. Singh M, Kapoor A, Bhatnagar A: **Physiological and Pathological Roles of Aldose Reductase.** *Metabolites* 2021, **11**.
273. Yagihashi S: **Glucotoxic Mechanisms and Related Therapeutic Approaches.** *Int Rev Neurobiol* 2016, **127**:121-149.
274. Guo Y, Wang P, Sun H, Cai R, Xia W, Wang S: **Advanced glycation end product-induced astrocytic differentiation of cultured neurospheres through inhibition of Notch-Hes1 pathway-mediated neurogenesis.** *Int J Mol Sci* 2013, **15**:159-170.
275. Hsieh J, Nakashima K, Kuwabara T, Mejia E, Gage FH: **Histone deacetylase inhibition-mediated neuronal differentiation of multipotent adult neural progenitor cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**:16659-16664.
276. Balasubramaniyan V, Boddeke E, Bakels R, Kust B, Kooistra S, Veneman A, Copray S: **Effects of histone deacetylation inhibition on neuronal differentiation of embryonic mouse neural stem cells.** *Neuroscience* 2006, **143**:939-951.
277. Chiang MC, Cheng YC, Nicol CJ, Lin CH: **The neuroprotective role of rosiglitazone in advanced glycation end product treated human neural stem cells is PPARgamma-dependent.** *Int J Biochem Cell Biol* 2017, **92**:121-133.
278. Bathina S, Das UN: **Dysregulation of PI3K-Akt-mTOR pathway in brain of streptozotocin-induced type 2 diabetes mellitus in Wistar rats.** *Lipids Health Dis* 2018, **17**:168.
279. Ramasubbu K, Devi Rajeswari V: **Impairment of insulin signaling pathway PI3K/Akt/mTOR and insulin resistance induced AGEs on diabetes mellitus and neurodegenerative diseases: a perspective review.** *Mol Cell Biochem* 2023, **478**:1307-1324.

280. Abedini A, Derk J, Schmidt AM: **The receptor for advanced glycation endproducts is a mediator of toxicity by IAPP and other proteotoxic aggregates: Establishing and exploiting common ground for novel amyloidosis therapies.** *Protein Sci* 2018, **27**:1166-1180.
281. Bathina S, Gundala NKV, Rhenghachar P, Polavarapu S, Hari AD, Sadananda M, Das UN: **Resolvin D1 Ameliorates Nicotinamide-streptozotocin-induced Type 2 Diabetes Mellitus by its Anti-inflammatory Action and Modulating PI3K/Akt/mTOR Pathway in the Brain.** *Arch Med Res* 2020, **51**:492-503.
282. Soutar MPM, Kempthorne L, Miyakawa S, Annuario E, Melandri D, Harley J, O'Sullivan GA, Wray S, Hancock DC, Cookson MR, et al: **AKT signalling selectively regulates PINK1 mitophagy in SHSY5Y cells and human iPSC-derived neurons.** *Sci Rep* 2018, **8**:8855.
283. Walter KR, Ford ME, Gregoski MJ, Kramer RM, Knight KD, Spruill L, Nogueira LM, Krisanits BA, Phan V, La Rue AC, et al: **Advanced glycation end products are elevated in estrogen receptor-positive breast cancer patients, alter response to therapy, and can be targeted by lifestyle intervention.** *Breast Cancer Res Treat* 2019, **173**:559-571.
284. Kellow NJ, Coughlan MT, Reid CM: **Association between habitual dietary and lifestyle behaviours and skin autofluorescence (SAF), a marker of tissue accumulation of advanced glycation endproducts (AGEs), in healthy adults.** *Eur J Nutr* 2018, **57**:2209-2216.
285. Jud P, Sourij H: **Therapeutic options to reduce advanced glycation end products in patients with diabetes mellitus: A review.** *Diabetes Res Clin Pract* 2019, **148**:54-63.
286. Pei Z, Deng Q, Babcock SA, He EY, Ren J, Zhang Y: **Inhibition of advanced glycation endproduct (AGE) rescues against streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy: Role of autophagy and ER stress.** *Toxicol Lett* 2018, **284**:10-20.
287. Van den Eynde MDG, Geleijnse JM, Scheijen J, Hanssen NMJ, Dower JI, Afman LA, Stehouwer CDA, Hollman PCH, Schalkwijk CG: **Quercetin, but Not Epicatechin, Decreases Plasma Concentrations of Methylglyoxal in Adults in a Randomized, Double-Blind,**

BIBLIOGRAFÍA

- Placebo-Controlled, Crossover Trial with Pure Flavonoids.** *J Nutr* 2018, **148**:1911-1916.
288. Houjehani S, Kheirouri S, Faraji E, Jafarabadi MA: **I-Carnosine supplementation attenuated fasting glucose, triglycerides, advanced glycation end products, and tumor necrosis factor-alpha levels in patients with type 2 diabetes: a double-blind placebo-controlled randomized clinical trial.** *Nutr Res* 2018, **49**:96-106.
289. Bucciarelli LG, Wendt T, Qu W, Lu Y, Lalla E, Rong LL, Goova MT, Moser B, Kislinger T, Lee DC, et al: **RAGE blockade stabilizes established atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-null mice.** *Circulation* 2002, **106**:2827-2835.
290. Reiniger N, Lau K, McCalla D, Eby B, Cheng B, Lu Y, Qu W, Quadri N, Ananthakrishnan R, Furmansky M, et al: **Deletion of the receptor for advanced glycation end products reduces glomerulosclerosis and preserves renal function in the diabetic OVE26 mouse.** *Diabetes* 2010, **59**:2043-2054.
291. Xie J, Xu H, Wu X, Xie Y, Lu X, Wang L: **Design, synthesis and anti-TNBC activity of Azeliragon triazole analogues.** *Bioorg Med Chem Lett* 2021, **54**:128444.
292. Shen L, Zhang T, Yang Y, Lu D, Xu A, Li K: **FPS-ZM1 Alleviates Neuroinflammation in Focal Cerebral Ischemia Rats via Blocking Ligand/RAGE/DIAPH1 Pathway.** *ACS Chem Neurosci* 2021, **12**:63-78.
293. Sanchis P, Rivera R, Berga F, Fortuny R, Adrover M, Costa-Bauza A, Grases F, Masmiquel L: **Phytate Decreases Formation of Advanced Glycation End-Products in Patients with Type II Diabetes: Randomized Crossover Trial.** *Sci Rep* 2018, **8**:9619.
294. Mirra P, Nigro C, Prevezano I, Procopio T, Leone A, Raciti GA, Andreozzi F, Longo M, Fiory F, Beguinot F, Miele C: **The role of miR-190a in methylglyoxal-induced insulin resistance in endothelial cells.** *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2017, **1863**:440-449.
295. Yamagishi SI, Matsui T: **Therapeutic Potential of DNA-aptamers Raised Against AGE-RAGE Axis in Diabetes-related Complications.** *Curr Pharm Des* 2018, **24**:2802-2809.

296. Zheng F, Cai W, Mitsuhashi T, Vlassara H: **Lysozyme enhances renal excretion of advanced glycation endproducts in vivo and suppresses adverse age-mediated cellular effects in vitro: a potential AGE sequestration therapy for diabetic nephropathy?** *Mol Med* 2001, **7**:737-747.
297. Xue M, Weickert MO, Qureshi S, Kandala NB, Anwar A, Waldron M, Shafie A, Messenger D, Fowler M, Jenkins G, et al: **Improved Glycemic Control and Vascular Function in Overweight and Obese Subjects by Glyoxalase 1 Inducer Formulation.** *Diabetes* 2016, **65**:2282-2294.
298. Kaur G, Padiya R, Adela R, Putcha UK, Reddy GS, Reddy BR, Kumar KP, Chakravarty S, Banerjee SK: **Garlic and Resveratrol Attenuate Diabetic Complications, Loss of beta-Cells, Pancreatic and Hepatic Oxidative Stress in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats.** *Front Pharmacol* 2016, **7**:360.
299. Maher P, Dargusch R, Ehren JL, Okada S, Sharma K, Schubert D: **Fisetin lowers methylglyoxal dependent protein glycation and limits the complications of diabetes.** *PLoS One* 2011, **6**:e21226.
300. Ruhee RT, Suzuki K: **The Integrative Role of Sulforaphane in Preventing Inflammation, Oxidative Stress and Fatigue: A Review of a Potential Protective Phytochemical.** *Antioxidants (Basel)* 2020, **9**.
301. Suantawee T, Thilavech T, Cheng H, Adisakwattana S: **Cyanidin Attenuates Methylglyoxal-Induced Oxidative Stress and Apoptosis in INS-1 Pancreatic beta-Cells by Increasing Glyoxalase-1 Activity.** *Nutrients* 2020, **12**.
302. Shimomura M, Oyama J, Takeuchi M, Shibata Y, Yamamoto Y, Kawasaki T, Komoda H, Kodama K, Sakuma M, Toyoda S, et al: **Acute effects of statin on reduction of angiotensin-like 2 and glyceraldehyde-derived advanced glycation end-products levels in patients with acute myocardial infarction: a message from SAMIT (Statin for Acute Myocardial Infarction Trial).** *Heart Vessels* 2016, **31**:1583-1589.
303. Gossett LA, Kelvin DJ, Sternberg EA, Olson EN: **A new myocyte-specific enhancer-binding factor that recognizes a conserved element associated with multiple muscle-specific genes.** *Mol Cell Biol* 1989, **9**:5022-5033.

BIBLIOGRAFÍA

304. Potthoff MJ, Olson EN: **MEF2: a central regulator of diverse developmental programs.** *Development* 2007, **134**:4131-4140.
305. Shore P, Sharrocks AD: **The MADS-box family of transcription factors.** *Eur J Biochem* 1995, **229**:1-13.
306. Black BL, Olson EN: **Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 1998, **14**:167-196.
307. Lisek M, Przybyszewski O, Zylinska L, Guo F, Boczek T: **The Role of MEF2 Transcription Factor Family in Neuronal Survival and Degeneration.** *Int J Mol Sci* 2023, **24**.
308. Zhu B, Ramachandran B, Gulick T: **Alternative pre-mRNA splicing governs expression of a conserved acidic transactivation domain in myocyte enhancer factor 2 factors of striated muscle and brain.** *J Biol Chem* 2005, **280**:28749-28760.
309. Li M, Linseman DA, Allen MP, Meintzer MK, Wang X, Laessig T, Wierman ME, Heidenreich KA: **Myocyte enhancer factor 2A and 2D undergo phosphorylation and caspase-mediated degradation during apoptosis of rat cerebellar granule neurons.** *J Neurosci* 2001, **21**:6544-6552.
310. Mao Z, Wiedmann M: **Calcineurin enhances MEF2 DNA binding activity in calcium-dependent survival of cerebellar granule neurons.** *J Biol Chem* 1999, **274**:31102-31107.
311. Liu L, Ding C, Fu T, Feng Z, Lee JE, Xiao L, Xu Z, Yin Y, Guo Q, Sun Z, et al: **Histone methyltransferase MLL4 controls myofiber identity and muscle performance through MEF2 interaction.** *J Clin Invest* 2020, **130**:4710-4725.
312. De Angelis L, Borghi S, Melchionna R, Berghella L, Baccarani-Contri M, Parise F, Ferrari S, Cossu G: **Inhibition of myogenesis by transforming growth factor beta is density-dependent and related to the translocation of transcription factor MEF2 to the cytoplasm.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**:12358-12363.
313. Ma K, Chan JK, Zhu G, Wu Z: **Myocyte enhancer factor 2 acetylation by p300 enhances its DNA binding activity, transcriptional activity, and myogenic differentiation.** *Mol Cell Biol* 2005, **25**:3575-3582.

314. Gregoire S, Tremblay AM, Xiao L, Yang Q, Ma K, Nie J, Mao Z, Wu Z, Giguere V, Yang XJ: **Control of MEF2 transcriptional activity by coordinated phosphorylation and sumoylation.** *J Biol Chem* 2006, **281**:4423-4433.
315. Cox DM, Du M, Marback M, Yang EC, Chan J, Siu KW, McDermott JC: **Phosphorylation motifs regulating the stability and function of myocyte enhancer factor 2A.** *J Biol Chem* 2003, **278**:15297-15303.
316. Han J, Molkentin JD: **Regulation of MEF2 by p38 MAPK and its implication in cardiomyocyte biology.** *Trends Cardiovasc Med* 2000, **10**:19-22.
317. Kasler HG, Victoria J, Duramad O, Winoto A: **ERK5 is a novel type of mitogen-activated protein kinase containing a transcriptional activation domain.** *Mol Cell Biol* 2000, **20**:8382-8389.
318. Chen X, Gao B, Ponnusamy M, Lin Z, Liu J: **MEF2 signaling and human diseases.** *Oncotarget* 2017, **8**:112152-112165.
319. Yin Y, She H, Li W, Yang Q, Guo S, Mao Z: **Modulation of Neuronal Survival Factor MEF2 by Kinases in Parkinson's Disease.** *Front Physiol* 2012, **3**:171.
320. Madugula K, Mulherkar R, Khan ZK, Chigbu DI, Patel D, Harhaj EW, Jain P: **MEF-2 isoforms' (A-D) roles in development and tumorigenesis.** *Oncotarget* 2019, **10**:2755-2787.
321. Linseman DA, Bartley CM, Le SS, Laessig TA, Bouchard RJ, Meintzer MK, Li M, Heidenreich KA: **Inactivation of the myocyte enhancer factor-2 repressor histone deacetylase-5 by endogenous Ca(2+) //calmodulin-dependent kinase II promotes depolarization-mediated cerebellar granule neuron survival.** *J Biol Chem* 2003, **278**:41472-41481.
322. Falcicchio M, Ward JA, Macip S, Doveston RG: **Regulation of p53 by the 14-3-3 protein interaction network: new opportunities for drug discovery in cancer.** *Cell Death Discov* 2020, **6**:126.
323. McKinsey TA, Zhang CL, Olson EN: **Activation of the myocyte enhancer factor-2 transcription factor by calcium/calmodulin-dependent protein kinase-stimulated binding of 14-3-3 to histone deacetylase 5.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**:14400-14405.

BIBLIOGRAFÍA

324. Friday BB, Mitchell PO, Kegley KM, Pavlath GK: **Calcineurin initiates skeletal muscle differentiation by activating MEF2 and MyoD.** *Differentiation* 2003, **71**:217-227.
325. Martin JF, Miano JM, Hustad CM, Copeland NG, Jenkins NA, Olson EN: **A Mef2 gene that generates a muscle-specific isoform via alternative mRNA splicing.** *Mol Cell Biol* 1994, **14**:1647-1656.
326. Slepak TI, Webster KA, Zang J, Prentice H, O'Dowd A, Hicks MN, Bishopric NH: **Control of cardiac-specific transcription by p300 through myocyte enhancer factor-2D.** *J Biol Chem* 2001, **276**:7575-7585.
327. Molkenkin JD, Black BL, Martin JF, Olson EN: **Cooperative activation of muscle gene expression by MEF2 and myogenic bHLH proteins.** *Cell* 1995, **83**:1125-1136.
328. Eckner R, Yao TP, Oldread E, Livingston DM: **Interaction and functional collaboration of p300/CBP and bHLH proteins in muscle and B-cell differentiation.** *Genes Dev* 1996, **10**:2478-2490.
329. Nebbioso A, Manzo F, Miceli M, Conte M, Manente L, Baldi A, De Luca A, Rotili D, Valente S, Mai A, et al: **Selective class II HDAC inhibitors impair myogenesis by modulating the stability and activity of HDAC-MEF2 complexes.** *EMBO Rep* 2020, **21**:e51028.
330. Zhang CL, McKinsey TA, Olson EN: **The transcriptional corepressor MITR is a signal-responsive inhibitor of myogenesis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**:7354-7359.
331. Haberland M, Arnold MA, McAnally J, Phan D, Kim Y, Olson EN: **Regulation of HDAC9 gene expression by MEF2 establishes a negative-feedback loop in the transcriptional circuitry of muscle differentiation.** *Mol Cell Biol* 2007, **27**:518-525.
332. Lu J, McKinsey TA, Nicol RL, Olson EN: **Signal-dependent activation of the MEF2 transcription factor by dissociation from histone deacetylases.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**:4070-4075.
333. Du M, Perry RL, Nowacki NB, Gordon JW, Salma J, Zhao J, Aziz A, Chan J, Siu KW, McDermott JC: **Protein kinase A represses skeletal myogenesis by targeting myocyte enhancer factor 2D.** *Mol Cell Biol* 2008, **28**:2952-2970.

334. Gong X, Tang X, Wiedmann M, Wang X, Peng J, Zheng D, Blair LA, Marshall J, Mao Z: **Cdk5-mediated inhibition of the protective effects of transcription factor MEF2 in neurotoxicity-induced apoptosis.** *Neuron* 2003, **38**:33-46.
335. Okamoto S, Li Z, Ju C, Scholzke MN, Mathews E, Cui J, Salvesen GS, Bossy-Wetzel E, Lipton SA: **Dominant-interfering forms of MEF2 generated by caspase cleavage contribute to NMDA-induced neuronal apoptosis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**:3974-3979.
336. Han J, Jiang Y, Li Z, Kravchenko VV, Ulevitch RJ: **Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation.** *Nature* 1997, **386**:296-299.
337. Shalizi A, Gaudilliere B, Yuan Z, Stegmuller J, Shirogane T, Ge Q, Tan Y, Schulman B, Harper JW, Bonni A: **A calcium-regulated MEF2 sumoylation switch controls postsynaptic differentiation.** *Science* 2006, **311**:1012-1017.
338. Wang X, She H, Mao Z: **Phosphorylation of neuronal survival factor MEF2D by glycogen synthase kinase 3beta in neuronal apoptosis.** *J Biol Chem* 2009, **284**:32619-32626.
339. Tarasova EO, Gaydukov AE, Balezina OP: **Calcineurin and Its Role in Synaptic Transmission.** *Biochemistry (Mosc)* 2018, **83**:674-689.
340. Lim D, Tapella L, Dematteis G, Talmon M, Genazzani AA: **Calcineurin Signalling in Astrocytes: From Pathology to Physiology and Control of Neuronal Functions.** *Neurochem Res* 2023, **48**:1077-1090.
341. Fujii H, Bito H: **Deciphering Ca(2+)-controlled biochemical computation governing neural circuit dynamics via multiplex imaging.** *Neurosci Res* 2022, **179**:79-90.
342. Lynch J, Guo L, Gelebart P, Chilibeck K, Xu J, Molkentin JD, Agellon LB, Michalak M: **Calreticulin signals upstream of calcineurin and MEF2C in a critical Ca(2+)-dependent signaling cascade.** *J Cell Biol* 2005, **170**:37-47.
343. Yang Q, She H, Gearing M, Colla E, Lee M, Shacka JJ, Mao Z: **Regulation of neuronal survival factor MEF2D by chaperone-mediated autophagy.** *Science* 2009, **323**:124-127.

BIBLIOGRAFÍA

344. Sala G, Arosio A, Stefanoni G, Melchionda L, Riva C, Marinig D, Brighina L, Ferrarese C: **Rotenone upregulates alpha-synuclein and myocyte enhancer factor 2D independently from lysosomal degradation inhibition.** *Biomed Res Int* 2013, **2013**:846725.
345. Chu Y, Mickiewicz AL, Kordower JH: **alpha-synuclein aggregation reduces nigral myocyte enhancer factor-2D in idiopathic and experimental Parkinson's disease.** *Neurobiol Dis* 2011, **41**:71-82.
346. Rashid AJ, Cole CJ, Josselyn SA: **Emerging roles for MEF2 transcription factors in memory.** *Genes Brain Behav* 2014, **13**:118-125.
347. Assali A, Harrington AJ, Cowan CW: **Emerging roles for MEF2 in brain development and mental disorders.** *Curr Opin Neurobiol* 2019, **59**:49-58.
348. Barker SJ, Raju RM, Milman NEP, Wang J, Davila-Velderrain J, Gunter-Rahman F, Parro CC, Bozzelli PL, Abdurrob F, Abdelaal K, et al: **MEF2 is a key regulator of cognitive potential and confers resilience to neurodegeneration.** *Sci Transl Med* 2021, **13**:eabd7695.
349. Lyons GE, Micales BK, Schwarz J, Martin JF, Olson EN: **Expression of mef2 genes in the mouse central nervous system suggests a role in neuronal maturation.** *J Neurosci* 1995, **15**:5727-5738.
350. Mao Z, Bonni A, Xia F, Nadal-Vicens M, Greenberg ME: **Neuronal activity-dependent cell survival mediated by transcription factor MEF2.** *Science* 1999, **286**:785-790.
351. Flavell SW, Kim TK, Gray JM, Harmin DA, Hemberg M, Hong EJ, Markenscoff-Papadimitriou E, Bear DM, Greenberg ME: **Genome-wide analysis of MEF2 transcriptional program reveals synaptic target genes and neuronal activity-dependent polyadenylation site selection.** *Neuron* 2008, **60**:1022-1038.
352. Heidenreich KA, Linseman DA: **Myocyte enhancer factor-2 transcription factors in neuronal differentiation and survival.** *Mol Neurobiol* 2004, **29**:155-166.
353. Ma Q, Telese F: **Genome-wide epigenetic analysis of MEF2A and MEF2C transcription factors in mouse cortical neurons.** *Commun Integr Biol* 2015, **8**:e1087624.

354. Fiore R, Khudayberdiev S, Christensen M, Siegel G, Flavell SW, Kim TK, Greenberg ME, Schratt G: **Mef2-mediated transcription of the miR379-410 cluster regulates activity-dependent dendritogenesis by fine-tuning Pumilio2 protein levels.** *EMBO J* 2009, **28**:697-710.
355. Latchney SE, Jiang Y, Petrik DP, Eisch AJ, Hsieh J: **Inducible knockout of Mef2a, -c, and -d from nestin-expressing stem/progenitor cells and their progeny unexpectedly uncouples neurogenesis and dendritogenesis in vivo.** *FASEB J* 2015, **29**:5059-5071.
356. Chan SF, Huang X, McKercher SR, Zaidi R, Okamoto SI, Nakanishi N, Lipton SA: **Transcriptional profiling of MEF2-regulated genes in human neural progenitor cells derived from embryonic stem cells.** *Genom Data* 2015, **3**:24-27.
357. Gao L, She H, Li W, Zeng J, Zhu J, Jones DP, Mao Z, Gao G, Yang Q: **Oxidation of survival factor MEF2D in neuronal death and Parkinson's disease.** *Antioxid Redox Signal* 2014, **20**:2936-2948.
358. Arosio A, Sala G, Rodriguez-Menendez V, Grana D, Gerardi F, Lunetta C, Ferrarese C, Tremolizzo L: **MEF2D and MEF2C pathways disruption in sporadic and familial ALS patients.** *Mol Cell Neurosci* 2016, **74**:10-17.
359. Chen SX, Cherry A, Tari PK, Podgorski K, Kwong YK, Haas K: **The transcription factor MEF2 directs developmental visually driven functional and structural metaplasticity.** *Cell* 2012, **151**:41-55.
360. Leysen I, Van der Gucht E, Eysel UT, Huybrechts R, Vandesande F, Arckens L: **Time-dependent changes in the expression of the MEF2 transcription factor family during topographic map reorganization in mammalian visual cortex.** *Eur J Neurosci* 2004, **20**:769-780.
361. Abraham WC: **Metaplasticity: tuning synapses and networks for plasticity.** *Nat Rev Neurosci* 2008, **9**:387.
362. Gaudilliere B, Shi Y, Bonni A: **RNA interference reveals a requirement for myocyte enhancer factor 2A in activity-dependent neuronal survival.** *J Biol Chem* 2002, **277**:46442-46446.
363. Tang X, Wang X, Gong X, Tong M, Park D, Xia Z, Mao Z: **Cyclin-dependent kinase 5 mediates neurotoxin-induced degradation of**

BIBLIOGRAFÍA

- the transcription factor myocyte enhancer factor 2. *J Neurosci* 2005, **25**:4823-4834.**
364. Kim MK, Kim SC, Kang JI, Hyun JH, Boo HJ, Eun SY, Park DB, Yoo ES, Kang HK, Kang JH: **6-Hydroxydopamine-induced PC12 cell death is mediated by MEF2D down-regulation.** *Neurochem Res* 2011, **36**:223-231.
365. Smith PD, Mount MP, Shree R, Callaghan S, Slack RS, Anisman H, Vincent I, Wang X, Mao Z, Park DS: **Calpain-regulated p35/cdk5 plays a central role in dopaminergic neuron death through modulation of the transcription factor myocyte enhancer factor 2.** *J Neurosci* 2006, **26**:440-447.
366. Kawasaki H, Morooka T, Shimohama S, Kimura J, Hirano T, Gotoh Y, Nishida E: **Activation and involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in glutamate-induced apoptosis in rat cerebellar granule cells.** *J Biol Chem* 1997, **272**:18518-18521.
367. Mennerick S, Zorumski CF: **Neural activity and survival in the developing nervous system.** *Mol Neurobiol* 2000, **22**:41-54.
368. Skerjanc IS, Wilton S: **Myocyte enhancer factor 2C upregulates MASH-1 expression and induces neurogenesis in P19 cells.** *FEBS Lett* 2000, **472**:53-56.
369. Lin X, Shah S, Bulleit RF: **The expression of MEF2 genes is implicated in CNS neuronal differentiation.** *Brain Res Mol Brain Res* 1996, **42**:307-316.
370. Akhtar MW, Kim MS, Adachi M, Morris MJ, Qi X, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN, Kavalali ET, Monteggia LM: **In vivo analysis of MEF2 transcription factors in synapse regulation and neuronal survival.** *PLoS One* 2012, **7**:e34863.
371. Shi L, Li B, Chen G, Huang Y, Tian Z, Zhang L, Tian L, Fu Q: **MEF2D Participates in Microglia-Mediated Neuroprotection in Cerebral Ischemia-Reperfusion Rats.** *Shock* 2022, **57**:118-130.
372. Cao J, Guo B, Li S, Zhang X, Zhang X, Zhang G, Sun Y, Wang Y, Song X, Zhang Z: **Neuroprotection against 1-Methyl-4-phenylpyridinium-induced cytotoxicity by naturally occurring polydatin through activation of transcription factor MEF2D.** *Neuroreport* 2021, **32**:1065-1072.

373. Chen H, Cao J, Zha L, Wang P, Liu Z, Guo B, Zhang G, Sun Y, Zhang Z, Wang Y: **Neuroprotective and neurogenic effects of novel tetramethylpyrazine derivative T-006 in Parkinson's disease models through activating the MEF2-PGC1alpha and BDNF/CREB pathways.** *Aging (Albany NY)* 2020, **12**:14897-14917.
374. Dorsey ER, Sherer T, Okun MS, Bloem BR: **The Emerging Evidence of the Parkinson Pandemic.** *J Parkinsons Dis* 2018, **8**:S3-S8.
375. Ye H, Robak LA, Yu M, Cykowski M, Shulman JM: **Genetics and Pathogenesis of Parkinson's Syndrome.** *Annu Rev Pathol* 2023, **18**:95-121.
376. She H, Yang Q, Shepherd K, Smith Y, Miller G, Testa C, Mao Z: **Direct regulation of complex I by mitochondrial MEF2D is disrupted in a mouse model of Parkinson disease and in human patients.** *J Clin Invest* 2011, **121**:930-940.
377. Brion JP, Couck AM: **Cortical and brainstem-type Lewy bodies are immunoreactive for the cyclin-dependent kinase 5.** *Am J Pathol* 1995, **147**:1465-1476.
378. Henchcliffe C, Burke RE: **Increased expression of cyclin-dependent kinase 5 in induced apoptotic neuron death in rat substantia nigra.** *Neurosci Lett* 1997, **230**:41-44.
379. Nakamura S, Kawamoto Y, Nakano S, Akiguchi I, Kimura J: **p35nck5a and cyclin-dependent kinase 5 colocalize in Lewy bodies of brains with Parkinson's disease.** *Acta Neuropathol* 1997, **94**:153-157.
380. Smith PD, Crocker SJ, Jackson-Lewis V, Jordan-Sciutto KL, Hayley S, Mount MP, O'Hare MJ, Callaghan S, Slack RS, Przedborski S, et al: **Cyclin-dependent kinase 5 is a mediator of dopaminergic neuron loss in a mouse model of Parkinson's disease.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**:13650-13655.
381. Wang B, Cai Z, Lu F, Li C, Zhu X, Su L, Gao G, Yang Q: **Destabilization of survival factor MEF2D mRNA by neurotoxin in models of Parkinson's disease.** *J Neurochem* 2014, **130**:720-728.
382. Hu S, Mak S, Zuo X, Li H, Wang Y, Han Y: **Neuroprotection Against MPP(+)-Induced Cytotoxicity Through the Activation of PI3-K/Akt/GSK3beta/MEF2D Signaling Pathway by Rhynchophylline, the Major Tetracyclic Oxindole Alkaloid Isolated From Uncaria rhynchophylla.** *Front Pharmacol* 2018, **9**:768.

BIBLIOGRAFÍA

383. Angelopoulou E, Pyrgelis ES, Piperi C: **Neuroprotective potential of chrysin in Parkinson's disease: Molecular mechanisms and clinical implications.** *Neurochem Int* 2020, **132**:104612.
384. Li T, Zhang W, Kang X, Yang R, Li R, Huang L, Chen J, Yang Q, Sun X: **Salidroside protects dopaminergic neurons by regulating the mitochondrial MEF2D-ND6 pathway in the MPTP/MPP(+) - induced model of Parkinson's disease.** *J Neurochem* 2020, **153**:276-289.
385. Zhang QS, Liao YG, Ji Z, Gu Y, Jiang HS, Xie ZS, Pan SY, Hu YF: **TFP5 prevents 1-methyl-4-phenyl pyridine ion-induced neurotoxicity in mouse cortical neurons.** *Exp Ther Med* 2016, **12**:2594-2598.
386. Guo B, Hu S, Zheng C, Wang H, Luo F, Li H, Cui W, Yang X, Cui G, Mak S, et al: **Substantial protection against MPTP-associated Parkinson's neurotoxicity in vitro and in vivo by anti-cancer agent SU4312 via activation of MEF2D and inhibition of MAO-B.** *Neuropharmacology* 2017, **126**:12-24.
387. Cosgrove D, Whitton L, Fahey L, P OB, Donohoe G, Morris DW: **Genes influenced by MEF2C contribute to neurodevelopmental disease via gene expression changes that affect multiple types of cortical excitatory neurons.** *Hum Mol Genet* 2021, **30**:961-970.
388. Wu Q, Yang X, Zhang L, Zhang Y, Feng L: **Nuclear Accumulation of Histone Deacetylase 4 (HDAC4) Exerts Neurotoxicity in Models of Parkinson's Disease.** *Mol Neurobiol* 2017, **54**:6970-6983.
389. Yao L, Li W, She H, Dou J, Jia L, He Y, Yang Q, Zhu J, Capiro NL, Walker DI, et al: **Activation of transcription factor MEF2D by bis(3)-cognitin protects dopaminergic neurons and ameliorates Parkinsonian motor defects.** *J Biol Chem* 2012, **287**:34246-34255.
390. De-Paula VJ, Radanovic M, Diniz BS, Forlenza OV: **Alzheimer's disease.** *Subcell Biochem* 2012, **65**:329-352.
391. Breijyeh Z, Karaman R: **Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment.** *Molecules* 2020, **25**.
392. Burton TR, Dibrov A, Kashour T, Amara FM: **Anti-apoptotic wild-type Alzheimer amyloid precursor protein signaling involves the p38 mitogen-activated protein kinase/MEF2 pathway.** *Brain Res Mol Brain Res* 2002, **108**:102-120.

393. Gonzalez P, Alvarez V, Menendez M, Lahoz CH, Martinez C, Corao AI, Calatayud MT, Pena J, Garcia-Castro M, Coto E: **Myocyte enhancing factor-2A in Alzheimer's disease: genetic analysis and association with MEF2A-polymorphisms.** *Neurosci Lett* 2007, **411**:47-51.
394. Natarajaseenivasan K, Shanmughapriya S, Velusamy P, Sayre M, Garcia A, Gomez NM, Langford D: **Inflammation-induced PINCH expression leads to actin depolymerization and mitochondrial mislocalization in neurons.** *Transl Neurodegener* 2020, **9**:32.
395. Yang S, Gao L, Lu F, Wang B, Gao F, Zhu G, Cai Z, Lai J, Yang Q: **Transcription factor myocyte enhancer factor 2D regulates interleukin-10 production in microglia to protect neuronal cells from inflammation-induced death.** *J Neuroinflammation* 2015, **12**:33.
396. Lu F, Wang R, Xia L, Nie T, Gao F, Yang S, Huang L, Shao K, Liu J, Yang Q: **Regulation of IFN-Is by MEF2D Promotes Inflammatory Homeostasis in Microglia.** *J Inflamm Res* 2021, **14**:2851-2863.
397. Deczkowska A, Matcovitch-Natan O, Tsitsou-Kampeli A, Ben-Hamo S, Dvir-Szternfeld R, Spinrad A, Singer O, David E, Winter DR, Smith LK, et al: **Mef2C restrains microglial inflammatory response and is lost in brain ageing in an IFN-I-dependent manner.** *Nat Commun* 2017, **8**:717.
398. Perea JR, Bolos M, Avila J: **Microglia in Alzheimer's Disease in the Context of Tau Pathology.** *Biomolecules* 2020, **10**.
399. Xue F, Tian J, Yu C, Du H, Guo L: **Type I interferon response-related microglial Mef2c deregulation at the onset of Alzheimer's pathology in 5xFAD mice.** *Neurobiol Dis* 2021, **152**:105272.
400. Camargo LM, Zhang XD, Loerch P, Caceres RM, Marine SD, Uva P, Ferrer M, de Rinaldis E, Stone DJ, Majercak J, et al: **Pathway-based analysis of genome-wide siRNA screens reveals the regulatory landscape of APP processing.** *PLoS One* 2015, **10**:e0115369.
401. Li H, Wang F, Guo X, Jiang Y: **Decreased MEF2A Expression Regulated by Its Enhancer Methylation Inhibits Autophagy and May Play an Important Role in the Progression of Alzheimer's Disease.** *Front Neurosci* 2021, **15**:682247.

BIBLIOGRAFÍA

402. Huang L, Zhong X, Qin S, Deng M: **Protocatechuic acid attenuates beta-secretase activity and okadaic acid-induced autophagy via the Akt/GSK-3beta/MEF2D pathway in PC12 cells.** *Mol Med Rep* 2020, **21**:1328-1335.
403. Huang LP, Zhong XQ, Zhou XY, Deng MQ, Wu MJ, Deng MZ: **[Galangin alleviates learning and memory impairments in APP/PS1 double-transgenic mice by regulating Akt/MEF2D/Beclin-1 signaling pathway].** *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 2022, **47**:2729-2737.
404. Dietrich JB: **The MEF2 family and the brain: from molecules to memory.** *Cell Tissue Res* 2013, **352**:179-190.
405. Edmondson DG, Lyons GE, Martin JF, Olson EN: **Mef2 gene expression marks the cardiac and skeletal muscle lineages during mouse embryogenesis.** *Development* 1994, **120**:1251-1263.
406. Liu N, Nelson BR, Bezprozvannaya S, Shelton JM, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN: **Requirement of MEF2A, C, and D for skeletal muscle regeneration.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014, **111**:4109-4114.
407. Schiaffino S, Dyar KA, Calabria E: **Skeletal muscle mass is controlled by the MRF4-MEF2 axis.** *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2018, **21**:164-167.
408. Pownall ME, Gustafsson MK, Emerson CP, Jr.: **Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 2002, **18**:747-783.
409. Isesele PO, Mazurak VC: **Regulation of Skeletal Muscle Satellite Cell Differentiation by Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids: A Critical Review.** *Front Physiol* 2021, **12**:682091.
410. Blais A, Tsikitis M, Acosta-Alvear D, Sharan R, Kluger Y, Dynlacht BD: **An initial blueprint for myogenic differentiation.** *Genes Dev* 2005, **19**:553-569.
411. Molkenin JD, Olson EN: **Combinatorial control of muscle development by basic helix-loop-helix and MADS-box transcription factors.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**:9366-9373.
412. Buchberger A, Ragge K, Arnold HH: **The myogenin gene is activated during myocyte differentiation by pre-existing, not newly**

- synthesized transcription factor MEF-2.** *J Biol Chem* 1994, **269**:17289-17296.
413. Cheng TC, Wallace MC, Merlie JP, Olson EN: **Separable regulatory elements governing myogenin transcription in mouse embryogenesis.** *Science* 1993, **261**:215-218.
414. Yee SP, Rigby PW: **The regulation of myogenin gene expression during the embryonic development of the mouse.** *Genes Dev* 1993, **7**:1277-1289.
415. Shen H, McElhinny AS, Cao Y, Gao P, Liu J, Bronson R, Griffin JD, Wu L: **The Notch coactivator, MAML1, functions as a novel coactivator for MEF2C-mediated transcription and is required for normal myogenesis.** *Genes Dev* 2006, **20**:675-688.
416. Berdeaux R, Goebel N, Banaszynski L, Takemori H, Wandless T, Shelton GD, Montminy M: **SIK1 is a class II HDAC kinase that promotes survival of skeletal myocytes.** *Nat Med* 2007, **13**:597-603.
417. Tapscott SJ: **The circuitry of a master switch: Myod and the regulation of skeletal muscle gene transcription.** *Development* 2005, **132**:2685-2695.
418. Wang DZ, Valdez MR, McAnally J, Richardson J, Olson EN: **The Mef2c gene is a direct transcriptional target of myogenic bHLH and MEF2 proteins during skeletal muscle development.** *Development* 2001, **128**:4623-4633.
419. Edmondson DG, Cheng TC, Cserjesi P, Chakraborty T, Olson EN: **Analysis of the myogenin promoter reveals an indirect pathway for positive autoregulation mediated by the muscle-specific enhancer factor MEF-2.** *Mol Cell Biol* 1992, **12**:3665-3677.
420. Potthoff MJ, Wu H, Arnold MA, Shelton JM, Backs J, McAnally J, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN: **Histone deacetylase degradation and MEF2 activation promote the formation of slow-twitch myofibers.** *J Clin Invest* 2007, **117**:2459-2467.
421. Sokol NS, Ambros V: **Mesodermally expressed Drosophila microRNA-1 is regulated by Twist and is required in muscles during larval growth.** *Genes Dev* 2005, **19**:2343-2354.

BIBLIOGRAFÍA

422. Zhao Y, Samal E, Srivastava D: **Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis.** *Nature* 2005, **436**:214-220.
423. Boutz PL, Chawla G, Stoilov P, Black DL: **MicroRNAs regulate the expression of the alternative splicing factor nPTB during muscle development.** *Genes Dev* 2007, **21**:71-84.
424. Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM, Conlon FL, Wang DZ: **The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation.** *Nat Genet* 2006, **38**:228-233.
425. Kim HK, Lee YS, Sivaprasad U, Malhotra A, Dutta A: **Muscle-specific microRNA miR-206 promotes muscle differentiation.** *J Cell Biol* 2006, **174**:677-687.
426. Rao PK, Kumar RM, Farkhondeh M, Baskerville S, Lodish HF: **Myogenic factors that regulate expression of muscle-specific microRNAs.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**:8721-8726.
427. Potthoff MJ, Arnold MA, McAnally J, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN: **Regulation of skeletal muscle sarcomere integrity and postnatal muscle function by Mef2c.** *Mol Cell Biol* 2007, **27**:8143-8151.
428. Lin Q, Schwarz J, Bucana C, Olson EN: **Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C.** *Science* 1997, **276**:1404-1407.
429. Sebastian S, Faralli H, Yao Z, Rakopoulos P, Pali C, Cao Y, Singh K, Liu QC, Chu A, Aziz A, et al: **Tissue-specific splicing of a ubiquitously expressed transcription factor is essential for muscle differentiation.** *Genes Dev* 2013, **27**:1247-1259.
430. Chen B, You W, Wang Y, Shan T: **The regulatory role of Myomaker and Myomixer-Myomerger-Minion in muscle development and regeneration.** *Cell Mol Life Sci* 2020, **77**:1551-1569.
431. Estrella NL, Desjardins CA, Nocco SE, Clark AL, Maksimenko Y, Naya FJ: **MEF2 transcription factors regulate distinct gene programs in mammalian skeletal muscle differentiation.** *J Biol Chem* 2015, **290**:1256-1268.

432. Tobin SW, Yang D, Girgis J, Farahzad A, Blais A, McDermott JC: **Regulation of Hspb7 by MEF2 and AP-1: implications for Hspb7 in muscle atrophy.** *J Cell Sci* 2016, **129**:4076-4090.
433. Arredondo JJ, Vivar J, Laine-Menendez S, Martinez-Morentin L, Cervera M: **CF2 transcription factor is involved in the regulation of Mef2 RNA levels, nuclei number and muscle fiber size.** *PLoS One* 2017, **12**:e0179194.
434. Dequiedt F, Cherrier T: **Refining the Class IIa HDAC/MEF2 Paradigm in Muscle Biology: More than Meets the Eye.** *Journal of Cellular Signaling* 2020, **1**:144-150.
435. Snyder CM, Rice AL, Estrella NL, Held A, Kandarian SC, Naya FJ: **MEF2A regulates the Gtl2-Dio3 microRNA mega-cluster to modulate WNT signaling in skeletal muscle regeneration.** *Development* 2013, **140**:31-42.
436. Seok HY, Tatsuguchi M, Callis TE, He A, Pu WT, Wang DZ: **miR-155 inhibits expression of the MEF2A protein to repress skeletal muscle differentiation.** *J Biol Chem* 2011, **286**:35339-35346.
437. Calvo S, Venepally P, Cheng J, Buonanno A: **Fiber-type-specific transcription of the troponin I slow gene is regulated by multiple elements.** *Mol Cell Biol* 1999, **19**:515-525.
438. Wu H, Rothermel B, Kanatous S, Rosenberg P, Naya FJ, Shelton JM, Hutcheson KA, DiMaio JM, Olson EN, Bassel-Duby R, Williams RS: **Activation of MEF2 by muscle activity is mediated through a calcineurin-dependent pathway.** *EMBO J* 2001, **20**:6414-6423.
439. Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang CY, Wu Z, Boss O, Michael LF, Puigserver P, Isotani E, Olson EN, et al: **Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres.** *Nature* 2002, **418**:797-801.
440. Frontera WR, Ochala J: **Skeletal muscle: a brief review of structure and function.** *Calcif Tissue Int* 2015, **96**:183-195.
441. Yin L, Li N, Jia W, Wang N, Liang M, Yang X, Du G: **Skeletal muscle atrophy: From mechanisms to treatments.** *Pharmacol Res* 2021, **172**:105807.
442. Nunes EA, Stokes T, McKendry J, Currier BS, Phillips SM: **Disuse-induced skeletal muscle atrophy in disease and nondisease states**

BIBLIOGRAFÍA

- in humans: mechanisms, prevention, and recovery strategies. *Am J Physiol Cell Physiol* 2022, **322**:C1068-C1084.**
443. Beaudart C, Rizzoli R, Bruyere O, Reginster JY, Biver E: **Sarcopenia: burden and challenges for public health.** *Arch Public Health* 2014, **72**:45.
444. Sousa-Victor P, Gutarra S, Garcia-Prat L, Rodriguez-Ubreva J, Ortet L, Ruiz-Bonilla V, Jardi M, Ballestar E, Gonzalez S, Serrano AL, et al: **Geriatric muscle stem cells switch reversible quiescence into senescence.** *Nature* 2014, **506**:316-321.
445. Jang YC, Sinha M, Cerletti M, Dall'Osso C, Wagers AJ: **Skeletal muscle stem cells: effects of aging and metabolism on muscle regenerative function.** *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2011, **76**:101-111.
446. Barbalho SM, Flato UAP, Tofano RJ, Goulart RA, Guiguer EL, Detregiachi CRP, Buchaim DV, Araujo AC, Buchaim RL, Reina FTR, et al: **Physical Exercise and Myokines: Relationships with Sarcopenia and Cardiovascular Complications.** *Int J Mol Sci* 2020, **21**.
447. Rome S, Forterre A, Mizgier ML, Bouzakri K: **Skeletal Muscle-Released Extracellular Vesicles: State of the Art.** *Front Physiol* 2019, **10**:929.
448. Siriatt V, Salerno MS, Berry C, Nicholas G, Bower R, Kambadur R, Sharma M: **Antagonism of myostatin enhances muscle regeneration during sarcopenia.** *Mol Ther* 2007, **15**:1463-1470.
449. Shao X, Gong W, Wang Q, Wang P, Shi T, Mahmut A, Qin J, Yao Y, Yan W, Chen D, et al: **Atrophic skeletal muscle fibre-derived small extracellular vesicle miR-690 inhibits satellite cell differentiation during ageing.** *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2022, **13**:3163-3180.
450. Juo LY, Liao WC, Shih YL, Yang BY, Liu AB, Yan YT: **HSPB7 interacts with dimerized FLNC and its absence results in progressive myopathy in skeletal muscles.** *J Cell Sci* 2016, **129**:1661-1670.
451. Kim J, Aydemir TB, Jimenez-Rondan FR, Ruggiero CH, Kim MH, Cousins RJ: **Deletion of metal transporter Zip14 (Slc39a14) produces skeletal muscle wasting, endotoxemia, Mef2c activation and induction of miR-675 and Hspb7.** *Sci Rep* 2020, **10**:4050.

452. Pesta DH, Goncalves RLS, Madiraju AK, Strasser B, Sparks LM: **Resistance training to improve type 2 diabetes: working toward a prescription for the future.** *Nutr Metab (Lond)* 2017, **14**:24.
453. Thai MV, Guruswamy S, Cao KT, Pessin JE, Olson AL: **Myocyte enhancer factor 2 (MEF2)-binding site is required for GLUT4 gene expression in transgenic mice. Regulation of MEF2 DNA binding activity in insulin-deficient diabetes.** *J Biol Chem* 1998, **273**:14285-14292.
454. Liu ML, Olson AL, Edgington NP, Moya-Rowley WS, Pessin JE: **Myocyte enhancer factor 2 (MEF2) binding site is essential for C2C12 myotube-specific expression of the rat GLUT4/muscle-adipose facilitative glucose transporter gene.** *J Biol Chem* 1994, **269**:28514-28521.
455. Mora S, Pessin JE: **The MEF2A isoform is required for striated muscle-specific expression of the insulin-responsive GLUT4 glucose transporter.** *J Biol Chem* 2000, **275**:16323-16328.
456. Knight JB, Eyster CA, Griesel BA, Olson AL: **Regulation of the human GLUT4 gene promoter: interaction between a transcriptional activator and myocyte enhancer factor 2A.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**:14725-14730.
457. Santalucia T, Moreno H, Palacin M, Yacoub MH, Brand NJ, Zorzano A: **A novel functional co-operation between MyoD, MEF2 and TRalpha1 is sufficient for the induction of GLUT4 gene transcription.** *J Mol Biol* 2001, **314**:195-204.
458. Egan B, Zierath JR: **Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation.** *Cell Metab* 2013, **17**:162-184.
459. McGee SL, van Denderen BJ, Howlett KF, Mollica J, Schertzer JD, Kemp BE, Hargreaves M: **AMP-activated protein kinase regulates GLUT4 transcription by phosphorylating histone deacetylase 5.** *Diabetes* 2008, **57**:860-867.
460. McGee SL, Swinton C, Morrison S, Gaur V, Campbell DE, Jorgensen SB, Kemp BE, Baar K, Steinberg GR, Hargreaves M: **Compensatory regulation of HDAC5 in muscle maintains metabolic adaptive responses and metabolism in response to energetic stress.** *FASEB J* 2014, **28**:3384-3395.

BIBLIOGRAFÍA

461. McGee SL, Fairlie E, Garnham AP, Hargreaves M: **Exercise-induced histone modifications in human skeletal muscle.** *J Physiol* 2009, **587**:5951-5958.
462. Chin ER, Olson EN, Richardson JA, Yang Q, Humphries C, Shelton JM, Wu H, Zhu W, Bassel-Duby R, Williams RS: **A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type.** *Genes Dev* 1998, **12**:2499-2509.
463. Wu H, Kanatous SB, Thurmond FA, Gallardo T, Isotani E, Bassel-Duby R, Williams RS: **Regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle by CaMK.** *Science* 2002, **296**:349-352.
464. Michael LF, Wu Z, Cheatham RB, Puigserver P, Adelmant G, Lehman JJ, Kelly DP, Spiegelman BM: **Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**:3820-3825.
465. Mahmoud AI: **Metabolic switches during development and regeneration.** *Development* 2023, **150**.
466. Roberts-Wilson TK, Reddy RN, Bailey JL, Zheng B, Ordas R, Gooch JL, Price SR: **Calcineurin signaling and PGC-1alpha expression are suppressed during muscle atrophy due to diabetes.** *Biochim Biophys Acta* 2010, **1803**:960-967.
467. Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, Puigserver P, Carlsson E, Ridderstrale M, Laurila E, et al: **PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes.** *Nat Genet* 2003, **34**:267-273.
468. Mastrocola R, Collino M, Rogazzo M, Medana C, Nigro D, Boccuzzi G, Aragno M: **Advanced glycation end products promote hepatosteatosis by interfering with SCAP-SREBP pathway in fructose-drinking mice.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2013, **305**:G398-407.
469. Mastrocola R, Collino M, Nigro D, Chiazza F, D'Antona G, Aragno M, Minetto MA: **Accumulation of advanced glycation end-products and activation of the SCAP/SREBP Lipogenetic pathway occur in diet-induced obese mouse skeletal muscle.** *PLoS One* 2015, **10**:e0119587.

470. Lecomte V, Meugnier E, Euthine V, Durand C, Freyssenet D, Nemoz G, Rome S, Vidal H, Lefai E: **A new role for sterol regulatory element binding protein 1 transcription factors in the regulation of muscle mass and muscle cell differentiation.** *Mol Cell Biol* 2010, **30**:1182-1198.
471. Hennebry A, Berry C, Siriatt V, O'Callaghan P, Chau L, Watson T, Sharma M, Kambadur R: **Myostatin regulates fiber-type composition of skeletal muscle by regulating MEF2 and MyoD gene expression.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2009, **296**:C525-534.
472. Zhu LN, Ren Y, Chen JQ, Wang YZ: **Effects of myogenin on muscle fiber types and key metabolic enzymes in gene transfer mice and C2C12 myoblasts.** *Gene* 2013, **532**:246-252.
473. Riuzzi F, Sorci G, Sgheddu R, Donato R: **HMGB1-RAGE regulates muscle satellite cell homeostasis through p38-MAPK- and myogenin-dependent repression of Pax7 transcription.** *J Cell Sci* 2012, **125**:1440-1454.
474. Mastrocola R, Nigro D, Chiazza F, Medana C, Dal Bello F, Boccuzzi G, Collino M, Aragno M: **Fructose-derived advanced glycation end-products drive lipogenesis and skeletal muscle reprogramming via SREBP-1c dysregulation in mice.** *Free Radic Biol Med* 2016, **91**:224-235.
475. Loumaye A, Lause P, Zhong X, Zimmers TA, Bindels LB, Thissen JP: **Activin A Causes Muscle Atrophy through MEF2C-Dependent Impaired Myogenesis.** *Cells* 2022, **11**.
476. Moretti I, Ciciliot S, Dyar KA, Abraham R, Murgia M, Agatea L, Akimoto T, Bicciato S, Forcato M, Pierre P, et al: **MRF4 negatively regulates adult skeletal muscle growth by repressing MEF2 activity.** *Nat Commun* 2016, **7**:12397.
477. Neyroud D, Nosacka RL, Callaway CS, Trevino JG, Hu H, Judge SM, Judge AR: **FoxP1 is a transcriptional repressor associated with cancer cachexia that induces skeletal muscle wasting and weakness.** *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2021, **12**:421-442.
478. Nath SR, Lieberman ML, Yu Z, Marchioretta C, Jones ST, Danby ECE, Van Pelt KM, Soraru G, Robins DM, Bates GP, et al: **MEF2 impairment underlies skeletal muscle atrophy in polyglutamine disease.** *Acta Neuropathol* 2020, **140**:63-80.

BIBLIOGRAFÍA

479. Hrvoj-Mihic B, Bienvenu T, Stefanacci L, Muotri AR, Semendeferi K: **Evolution, development, and plasticity of the human brain: from molecules to bones.** *Front Hum Neurosci* 2013, **7**:707.
480. Liu HH, Jan YN: **Mechanisms of neurite repair.** *Curr Opin Neurobiol* 2020, **63**:53-58.
481. Puck TT, Cieciura SJ, Robinson A: **Genetics of somatic mammalian cells: III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects.** *Journal of Experimental Medicine* 1958, **108**:945-956.
482. Olmsted JB, Carlson K, Klebe R, Ruddle F, Rosenbaum J: **Isolation of microtubule protein from cultured mouse neuroblastoma cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1970, **65**:129-136.
483. Perez MJ, Carden TR, Dos Santos Claro PA, Silberstein S, Paez PM, Cheli VT, Correale J, Pasquini JM: **Transferrin Enhances Neuronal Differentiation.** *ASN Neuro* 2023, **15**:17590914231170703.
484. Kovalevich J, Santerre M, Langford D: **Considerations for the Use of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells in Neurobiology.** *Neuronal Cell Culture, 2 Edition* 2021, **2311**:9-23.
485. Sambrook J, Fritsch ER, Maniatis T: **Molecular Cloning: a laboratory manual.** Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
486. Khiem D, Cyster JG, Schwarz JJ, Black BL: **A p38 MAPK-MEF2C pathway regulates B-cell proliferation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**:17067-17072.
487. Nishimura A, Morita M, Nishimura Y, Sugino Y: **A rapid and highly efficient method for preparation of competent Escherichia coli cells.** *Nucleic Acids Res* 1990, **18**:6169.
488. Hanahan D: **Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids.** *J Mol Biol* 1983, **166**:557-580.
489. Childs BG, Gluscevic M, Baker DJ, Laberge RM, Marquess D, Dananberg J, van Deursen JM: **Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing.** *Nat Rev Drug Discov* 2017, **16**:718-735.
490. Debacq-Chainiaux F, Erusalimsky JD, Campisi J, Toussaint O: **Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase**

- (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo.** *Nat Protoc* 2009, **4**:1798-1806.
491. Ma C, Gurkan-Cavusoglu E: **A comprehensive review of computational cell cycle models in guiding cancer treatment strategies.** *NPJ Syst Biol Appl* 2024, **10**:71.
492. Ormerod MG: **Flow Cytometry: A practical approach.** Second edition: Oxford University Press; 2000: 119-135
493. Skrypina NA, Timofeeva AV, Khaspekov GL, Savochkina LP, Beabealashvilli R: **Total RNA suitable for molecular biology analysis.** *J Biotechnol* 2003, **105**:1-9.
494. Aranda PS, LaJoie DM, Jorcyk CL: **Bleach gel: a simple agarose gel for analyzing RNA quality.** *Electrophoresis* 2012, **33**:366-369.
495. Wong ML, Medrano JF: **Real-time PCR for mRNA quantitation.** *Biotechniques* 2005, **39**:75-85.
496. Kucinska M, Giron MD, Piotrowska H, Lisiak N, Granig WH, Lopez-Jaramillo FJ, Salto R, Murias M, Erker T: **Novel Promising Estrogenic Receptor Modulators: Cytotoxic and Estrogenic Activity of Benzanilides and Dithiobenzanilides.** *PLoS One* 2016, **11**:e0145615.
497. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC: **Measurement of protein using bicinchoninic acid.** *Anal Biochem* 1985, **150**:76-85.
498. Ladner CL, Yang J, Turner RJ, Edwards RA: **Visible fluorescent detection of proteins in polyacrylamide gels without staining.** *Anal Biochem* 2004, **326**:13-20.
499. Maloy A, Alexander S, Andreas A, Nyunoya T, Chandra D: **Stain-Free total-protein normalization enhances the reproducibility of Western blot data.** *Anal Biochem* 2022, **654**:114840.
500. Miao Y, Du Q, Zhang HG, Yuan Y, Zuo Y, Zheng H: **Cycloheximide (CHX) Chase Assay to Examine Protein Half-life.** *Bio Protoc* 2023, **13**:e4690.
501. Park SJ, Jin ML, An HK, Kim KS, Ko MJ, Kim CM, Choi YW, Lee YC: **Emodin induces neurite outgrowth through PI3K/Akt/GSK-3beta-**

BIBLIOGRAFÍA

- mediated signaling pathways in Neuro2a cells. *Neurosci Lett* 2015, **588**:101-107.**
502. Wu PY, Lin YC, Chang CL, Lu HT, Chin CH, Hsu TT, Chu D, Sun SH: **Functional decreases in P2X7 receptors are associated with retinoic acid-induced neuronal differentiation of Neuro-2a neuroblastoma cells.** *Cell Signal* 2009, **21**:881-891.
503. Yanaka N, Nogusa Y, Fujioka Y, Yamashita Y, Kato N: **Involvement of membrane protein GDE2 in retinoic acid-induced neurite formation in Neuro2A cells.** *FEBS Lett* 2007, **581**:712-718.
504. Maiuolo J, Costanzo P, Masullo M, D'Errico A, Nasso R, Bonacci S, Mollace V, Oliverio M, Arcone R: **Hydroxytyrosol-Donepezil Hybrids Play a Protective Role in an In Vitro Induced Alzheimer's Disease Model and in Neuronal Differentiated Human SH-SY5Y Neuroblastoma Cells.** *Int J Mol Sci* 2023, **24**.
505. Shipley MM, Mangold CA, Szpara ML: **Differentiation of the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line.** *J Vis Exp* 2016:53193.
506. Xicoy H, Wieringa B, Martens GJ: **The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review.** *Mol Neurodegener* 2017, **12**:10.
507. Ramm P, Alexandrov Y, Cholewinski A, Cybuch Y, Nadon R, Soltys BJ: **Automated screening of neurite outgrowth.** *J Biomol Screen* 2003, **8**:7-18.
508. Radio NM, Mundy WR: **Developmental neurotoxicity testing in vitro: models for assessing chemical effects on neurite outgrowth.** *Neurotoxicology* 2008, **29**:361-376.
509. Galderisi U, Jori FP, Giordano A: **Cell cycle regulation and neural differentiation.** *Oncogene* 2003, **22**:5208-5219.
510. Wang JL, Wang JJ, Cai ZN, Xu CJ: **The effect of curcumin on the differentiation, apoptosis and cell cycle of neural stem cells is mediated through inhibiting autophagy by the modulation of Atg7 and p62.** *Int J Mol Med* 2018, **42**:2481-2488.
511. Hindley C, Philpott A: **Co-ordination of cell cycle and differentiation in the developing nervous system.** *Biochem J* 2012, **444**:375-382.

512. Salto R, Vilchez JD, Giron MD, Cabrera E, Campos N, Manzano M, Rueda R, Lopez-Pedrosa JM: **beta-Hydroxy-beta-Methylbutyrate (HMB) Promotes Neurite Outgrowth in Neuro2a Cells.** *PLoS One* 2015, **10**:e0135614.
513. Wang X, Wang Z, Yao Y, Li J, Zhang X, Li C, Cheng Y, Ding G, Liu L, Ding Z: **Essential role of ERK activation in neurite outgrowth induced by alpha-lipoic acid.** *Biochim Biophys Acta* 2011, **1813**:827-838.
514. Wang Z, Wang J, Li J, Wang X, Yao Y, Zhang X, Li C, Cheng Y, Ding G, Liu L, Ding Z: **MEK/ERKs signaling is essential for lithium-induced neurite outgrowth in N2a cells.** *Int J Dev Neurosci* 2011, **29**:415-422.
515. Zoungrana LI, Krause-Hauch M, Wang H, Fatmi MK, Bates L, Li Z, Kulkarni P, Ren D, Li J: **The Interaction of mTOR and Nrf2 in Neurogenesis and Its Implication in Neurodegenerative Diseases.** *Cells* 2022, **11**.
516. Coelho P, Fao L, Mota S, Rego AC: **Mitochondrial function and dynamics in neural stem cells and neurogenesis: Implications for neurodegenerative diseases.** *Ageing Res Rev* 2022, **80**:101667.
517. Peng W, Tan C, Mo L, Jiang J, Zhou W, Du J, Zhou X, Liu X, Chen L: **Glucose transporter 3 in neuronal glucose metabolism: Health and diseases.** *Metabolism* 2021, **123**:154869.
518. Kao SH, Wang WL, Chen CY, Chang YL, Wu YY, Wang YT, Wang SP, Nesvizhskii AI, Chen YJ, Hong TM, Yang PC: **Analysis of Protein Stability by the Cycloheximide Chase Assay.** *Bio Protoc* 2015, **5**.
519. Yamada M, Nagasaki SC, Suzuki Y, Hirano Y, Imayoshi I: **Optimization of Light-Inducible Gal4/UAS Gene Expression System in Mammalian Cells.** *iScience* 2020, **23**:101506.
520. Reddy Addi U, Jakhotia S, Reddy SS, Reddy GB: **Age-related neuronal damage by advanced glycation end products through altered proteostasis.** *Chem Biol Interact* 2022, **355**:109840.
521. Ren X, Ma H, Qiu Y, Liu B, Qi H, Li Z, Kong H, Kong L: **The downregulation of thioredoxin accelerated Neuro2a cell apoptosis induced by advanced glycation end product via activating several pathways.** *Neurochem Int* 2015, **87**:128-135.

BIBLIOGRAFÍA

522. Schmidt A, Kuhla B, Bigl K, Munch G, Arendt T: **Cell cycle related signaling in Neuro2a cells proceeds via the receptor for advanced glycation end products.** *J Neural Transm (Vienna)* 2007, **114**:1413-1424.
523. Kuhla A, Ludwig SC, Kuhla B, Munch G, Vollmar B: **Advanced glycation end products are mitogenic signals and trigger cell cycle reentry of neurons in Alzheimer's disease brain.** *Neurobiol Aging* 2015, **36**:753-761.
524. Souza CG, Riboldi BP, Hansen F, Moreira JD, Souza DG, de Assis AM, Brum LM, Perry ML, Souza DO: **Chronic sulforaphane oral treatment accentuates blood glucose impairment and may affect GLUT3 expression in the cerebral cortex and hypothalamus of rats fed with a highly palatable diet.** *Food Funct* 2013, **4**:1271-1276.
525. Chu F, Li K, Li X, Xu L, Huang J, Yang Z: **Graphene Oxide Ameliorates the Cognitive Impairment Through Inhibiting PI3K/Akt/mTOR Pathway to Induce Autophagy in AD Mouse Model.** *Neurochem Res* 2021, **46**:309-325.
526. Barbier P, Zejneli O, Martinho M, Lasorsa A, Belle V, Smet-Nocca C, Tsvetkov PO, Devred F, Landrieu I: **Role of Tau as a Microtubule-Associated Protein: Structural and Functional Aspects.** *Front Aging Neurosci* 2019, **11**:204.
527. Brothers HM, Gosztyla ML, Robinson SR: **The Physiological Roles of Amyloid-beta Peptide Hint at New Ways to Treat Alzheimer's Disease.** *Front Aging Neurosci* 2018, **10**:118.
528. Bury JJ, Chambers A, Heath PR, Ince PG, Shaw PJ, Matthews FE, Brayne C, Simpson JE, Wharton SB, Cognitive F, Ageing S: **Type 2 diabetes mellitus-associated transcriptome alterations in cortical neurones and associated neurovascular unit cells in the ageing brain.** *Acta Neuropathol Commun* 2021, **9**:5.
529. Volpicelli F, Perrone-Capano C, Da Pozzo P, Colucci-D'Amato L, di Porzio U: **Modulation of nurr1 gene expression in mesencephalic dopaminergic neurones.** *J Neurochem* 2004, **88**:1283-1294.
530. White RB, Thomas MG: **Moving beyond tyrosine hydroxylase to define dopaminergic neurons for use in cell replacement therapies for Parkinson's disease.** *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2012, **11**:340-349.

531. Butcher LL, Oh JD, Woolf NJ, Edwards RH, Roghani A: **Organization of central cholinergic neurons revealed by combined in situ hybridization histochemistry and choline-O-acetyltransferase immunocytochemistry.** *Neurochem Int* 1992, **21**:429-445.
532. Carvajal-Oliveros A, Uriostegui-Arcos M, Zurita M, Melchy-Perez EI, Narvaez-Padilla V, Reynaud E: **The BE (2)-M17 cell line has a better dopaminergic phenotype than the traditionally used for Parkinson s research SH-SY5Y, which is mostly serotonergic.** *IBRO Neurosci Rep* 2022, **13**:543-551.
533. Dickey CA, De Mesquita DD, Morgan D, Pennypacker KR: **Induction of memory-associated immediate early genes by nerve growth factor in rat primary cortical neurons and differentiated mouse Neuro2A cells.** *Neurosci Lett* 2004, **366**:10-14.
534. Xiao J, Liu Y: **Differential roles of ERK and JNK in early and late stages of neuritogenesis: a study in a novel PC12 model system.** *J Neurochem* 2003, **86**:1516-1523.
535. Switon K, Kotulska K, Janusz-Kaminska A, Zmorzynska J, Jaworski J: **Molecular neurobiology of mTOR.** *Neuroscience* 2017, **341**:112-153.
536. Yu J, Li J, Zhang S, Xu X, Zheng M, Jiang G, Li F: **IGF-1 induces hypoxia-inducible factor 1alpha-mediated GLUT3 expression through PI3K/Akt/mTOR dependent pathways in PC12 cells.** *Brain Res* 2012, **1430**:18-24.
537. Lam BY, Chawla S: **MEF2D expression increases during neuronal differentiation of neural progenitor cells and correlates with neurite length.** *Neurosci Lett* 2007, **427**:153-158.
538. Calder PC, Bosco N, Bourdet-Sicard R, Capuron L, Delzenne N, Dore J, Franceschi C, Lehtinen MJ, Recker T, Salvioli S, Visioli F: **Health relevance of the modification of low grade inflammation in ageing (inflammageing) and the role of nutrition.** *Ageing Res Rev* 2017, **40**:95-119.
539. Hickman S, Izzy S, Sen P, Morsett L, El Khoury J: **Microglia in neurodegeneration.** *Nat Neurosci* 2018, **21**:1359-1369.
540. Franceschi C, Capri M, Monti D, Giunta S, Olivieri F, Sevini F, Panourgia MP, Invidia L, Celani L, Scurti M, et al: **Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity**

BIBLIOGRAFÍA

emerged from studies in humans. *Mech Ageing Dev* 2007, **128:92-105.**