

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II

**Modulación de Rutas de Señalización,
Metabolismo Proteico y Diferenciación Celular en
Músculo y Cerebro**



José Dámaso Vílchez Rienda

Facultad de Farmacia
Universidad de Granada
2015

.Editor: Universidad de Granada. Tesis doctorales
Autor: José Damaso Vilchez Rienda
ISBN: 978-84-9125-573-4
URI: <http://hdl.handle.net/10481/42884>

Modulación de Rutas de Señalización, Metabolismo Proteico y Diferenciación Celular en Músculo y Cerebro

Memoria presentada para aspirar al grado de Doctor en Farmacia por el Licenciado D. José Dámaso Vílchez Rienda, dirigida por los Drs. María Dolores Girón González, Rafael Salto González y Alberto Manuel Vargas Morales.

Directores:

M. Dolores Girón González Rafael Salto González Alberto M. Vargas Morales

Licenciado:

José Dámaso Vílchez Rienda

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.



Parte de los resultados que se recogen en esta Tesis Doctoral han sido presentados en los, XXXV, XXXVI, XXXVII y XXXVIII Congresos de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular y Publicados en FEBS Letters 588(14): 2246-2254.

El doctorando José Dámaso Vílchez Rienda y los directores de la tesis María Dolores Girón González, Rafael Salto González y Alberto Manuel Vargas Morales garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada a 9 de Noviembre de 2015

Director/es de la Tesis

Doctorando

Fdo.:

Fdo.:

ABREVIATURAS

4E-BP: *eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein*

8-OHdG: 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina

8-oxodG: 8-oxo-2'-desoxiguanosina

AMP: adenosín monofosfato

AMPK: *5'-AMP-activated protein kinase*

APS: persulfato amónico

ASK1: *apoptosis signal-regulating kinase 1*

Atg: *autophagy-related protein*

ATP: adenosín trifosfato

BAD: *Bcl2-associated agonist of cell death*

Bak: *Bcl-2 homologous antagonist/killer*

BDNF: *brain-derived neurotrophic factor*

BID: *BH3-interacting domain death agonist*

BMF: *Bcl-2-modifying factor*

BMP: *bone morphogenetic protein*

bp: pares de bases

BSA: albúmina sérica bovina

cAMP: adenosín monofosfato-3',5' cíclico

Cdk: *cyclin-dependent-like kinase*

cDNA: DNA complementario

CMA: *chaperone-mediated autophagy*

CREB: *cAMP response-element binding protein*

DARPP: *dopamine and cAMP regulated neuronal phosphoprotein*

dbcAMP: dibutilil cAMP

DCFDA: diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína

DEPC: dietilpirocarbonato

DEPTOR: *DEP domain-containing mTOR-interacting protein*

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico

dpm: desintegraciones por minuto

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etildiaminotetraacético

eEF: *eukaryotic elongation factor*

eEF-2K: *eukaryotic elongation factor 2 kinase*

EGTA: ácido tetraacético de etilenglicol

eIF: *eukaryotic translation initiation factor*

ERK: *extracelular signal-regulated kinase*

Fas-L: *Fas Ligand*

FBS: suero bovino fetal

FGF: *fibroblast growth factor*

FoxO: *forkhead box protein O*

GAD: *glutamate decarboxylase*

GDNF: *glial cell line-derived neurotrophic factor*

GDP: *guanosín difosfato*

GFP: *green fluorescent protein*

GSK3 β : *glycogen synthase kinase-3 beta*

GTP: *guanosín trifosfato*

HDAC4: *histone deacetylase 4*

HEPES: *Ácido 4-(2-Hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico*

HIF: *hypoxia-inducible factor*

HNE: *4-hidroxi-2-nonenal*

Hsc70: *heat shock 70 kDa protein 8*

HuR: *Hu-antigen R*

IGF: *insulin-like growth factor*

IRS-2: *insulin receptor substrate 2*

JNK: *c-Jun N-terminal kinase*

Kb: *kilobase*

LATS: *large tumor suppressor homolog*

LB: *Luria-Bertani*

LC3: *microtubule-associated protein 1 light chain 3*

M-MuLV: *Moloney Murine Leukemia Virus*

MAP: *microtubule-associated protein*

MAPK: *mitogen-activated protein kinase*

MAPKAP: *mitogen-activated protein kinase 2-associated protein*

MEF2: *myocyte enhanced factor*

MLC: *myosin light chain*

mLST8: *mammalian lethal with SEC13 protein 8*

MRF: *myogenic regulatory factors*

Mrf-4: *muscle-specific regulatory factor 4*

mRNA: *RNA mensajero*

MST: *mammalian STE20-like protein kinase*

mTOR: *mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)*

mTORC1: *mTOR complex1*

mTORC2: *mTOR complex 2*

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

MuRF1: *muscle-specific RING finger protein 1*

MyBP-C: *myosin-binding protein C*

Myf: *myogenic factor*

MyHC: *myosin heavy chain*

MyoD: *myoblast determination protein*

NADPH: *nicotinamida adenina dinucleótido fosfato*

Notch: *neurogenic locus notch homolog protein*

NT: *neurotrophin*

Nurr1/NR4A2: *nuclear receptor subfamily 4 group A member 2*

p62: *sequestosome 1*

Pax: *paired box protein*

PBS: *tampón fosfato salino*

PCR: *polymerase chain reaction*

PDCD4: *programmed cell death protein 4*

PEG: polietilenglicol

PHB: *prohibitin*

PI3K: *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase*

Pitx: *pituitary homeobox*

PKA: *protein kinase A*

PKB/Akt: *RAC-alpha serine/threonine-protein kinase*

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PRAS40: *40 kDa Pro-rich Akt substrate*

PROTOR 1/2: *proline-rich protein 5*

PTEN: *phosphatase and tensin homolog*

PVDF: fluoruro de polivinilideno

qPCR: *quantitative polymerase chain reaction*

Rag: *Ras-related GTP-binding protein*

RAPTOR: *regulatory-associated protein of mTOR*

rDNA: DNA ribosomal

REDD1: *protein regulated in development and DNA damage response 1*

Rheb: *Ras homolog enriched in brain*

RICTOR: *rapamycin-insensitive companion of mTOR*

RNA: ácido ribonucléico

ROS: especies reactivas de oxígeno

S6K: *ribosomal protein S6 kinase*

SDS: dodecil sulfato sódico

SHH: *Sonic hedgehog protein*

SL1: *promotor selectivity factor*

SQSTM1: *sequestosome-1*

TBS: tampón Tris salino

TCA: ácido tricloroacético

TE: Tampón Tris EDTA

TEMED: tetrametiletilendiamina

TGS: tampón Tris glicina SDS

TH: *tyrosine hydroxylase*

TNE: tampón Tris salino EDTA

TNF α : *tumor necrosis factor α*

TRAF: *tumor necrosis factor receptor-associated factor*

Trx: *thioredoxin*

TSC: *tuberous sclerosis complex*

UBF: *upstream binding factor*

UCH-L1: *ubiquitin carboxyl terminal hydrolase L1*

VGLuT: *vesicular glutamate transporter*

VMAT: *vesicular monoamine transporter*

YAP: *yes-associated protein*

ÍNDICE

1	RESUMEN	17
2	INTRODUCCIÓN	19
3	ANTECEDENTES	23
3.1	Miogénesis y recambio proteico en músculo esquelético	23
3.1.1	Miogénesis.....	23
3.1.1.1	Proceso de miogénesis	23
3.1.1.2	Regulación de la miogénesis.....	25
3.1.2	Síntesis y degradación de proteínas en músculo esquelético	27
3.1.2.1	Síntesis de proteínas en músculo esquelético: mTOR.....	27
3.1.2.2	Degradación de proteínas en músculo esquelético.....	36
3.2	Neurogénesis y neuroprotección	41
3.2.1	Neurogénesis.....	41
3.2.2	Estrés oxidativo, enfermedades neurodegenerativas y neuroprotección	43
3.2.2.1	Estrés oxidativo.....	44
3.2.2.2	Estrés oxidativo y apoptosis	46
3.2.2.3	Enfermedades neurodegenerativas.....	47
3.2.2.4	Sistemas de defensa frente al estrés oxidativo	50
4	OBJETIVOS	51
5	MATERIAL Y MÉTODOS.....	53
5.1	Material	53
5.1.1	Instrumentación.	53
5.1.2	Líneas celulares.....	54
5.1.2.1	Procariotas.....	54
5.1.2.2	Líneas celulares eucariotas.	55
5.1.3	Material para el cultivo de células.....	55
5.1.3.1	Medios de cultivo para bacterias.....	55
5.1.3.2	Medios de cultivo para líneas celulares eucariotas	56
5.1.4	Material para la manipulación de ácidos nucleicos.....	56
5.1.4.1	Plásmidos comerciales	56

5.1.4.2	Construcciones realizadas en plásmidos de DNA	60
5.1.4.3	Oligonucleótidos.	61
5.1.4.4	Reactivos	62
5.1.5	Material para la manipulación de proteínas.....	62
5.1.6	Aplicaciones informáticas	63
5.2	Métodos.....	65
5.2.1	Métodos de cultivo y manipulación de bacterias.....	65
5.2.1.1	Preparación de células competentes.....	65
5.2.1.2	Transformación por choque térmico	65
5.2.2	Métodos de cultivo, manipulación y observación de células eucariotas.....	66
5.2.2.1	Generalidades	66
5.2.2.2	Tripsinización.....	66
5.2.2.3	Recuento de células	66
5.2.2.4	Congelación y almacenamiento de líneas celulares	67
5.2.2.5	Transfección eucariota	67
5.2.2.6	Microscopía de fluorescencia.....	68
5.2.2.7	Microscopía confocal de fluorescencia	68
5.2.2.8	Ensayo de autofagia mediante microscopía confocal.....	69
5.2.2.9	Ensayos de viabilidad y proliferación celular basados en MTT.....	69
5.2.2.10	Recuento de formación de neuritas.....	70
5.2.2.11	Ensayo de detección de especies reactivas de oxígeno en cultivos celulares	70
5.2.2.12	Estudio de la apoptosis por citometría de flujo usando yoduro de propidio.....	70
5.2.2.13	Cuantificación de los niveles de cAMP.....	71
5.2.3	Técnicas para el análisis de ácidos nucleicos.....	71
5.2.3.1	Aislamiento y purificación de DNA plasmídico	71
5.2.3.2	Cuantificación de DNA	73
5.2.3.3	Digestión con endonucleasas de restricción.....	74
5.2.3.4	Electroforesis de DNA en geles horizontales de agarosa.....	74

5.2.3.5	Ligación de DNA.....	74
5.2.3.6	Reacción en cadena de la polimerasa.....	75
5.2.3.7	Secuenciación de DNA	75
5.2.3.8	Extracción de RNA.....	76
5.2.3.9	Cuantificación de RNA	76
5.2.3.10	Electroforesis de RNA en geles horizontales de agarosa.....	76
5.2.3.11	Transcripción inversa o retrotranscripción (RT) de RNA	77
5.2.3.12	PCR cuantitativa (qPCR) o PCR en tiempo real	77
5.2.4	Técnicas para el análisis de proteínas	78
5.2.4.1	Determinación de la síntesis de proteínas.....	78
5.2.4.2	Determinación de la degradación de proteínas	78
5.2.4.3	Estudio de promotores mediante el uso de genes reporteros codificantes de luciferasas.....	79
5.2.4.4	Preparación de extractos proteicos.....	79
5.2.4.5	Cuantificación de proteínas	80
5.2.4.6	Electroforesis vertical en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE)	81
5.2.4.7	Western Blot	82
6	RESULTADOS.....	85
6.1	Diferenciación celular y metabolismo proteico en células L6.....	85
6.1.1	El tungstato sódico induce la diferenciación de mioblastosL6.....	85
6.1.2	Regulación de la transcripción y expresión de MEF2D por tungstato sódico.....	90
6.1.2.1	El tungstato sódico inhibe la sumoilación de MEF2D	90
6.1.2.2	MEF2D presenta sitios de fosforilación que modulan su actividad	93
6.2	La activación de ERK1/2 por tungstato sódico induce la síntesis y previene la degradación de proteínas en miotubos L6 de rata.....	96
6.2.1	Efectos del tungstato sódico sobre el recambio proteico	96
6.2.2	Modulación de la señalización corriente arriba de mTOR por tungstato sódico.....	99

6.2.3	La activación de ERK1/2 por tungstato sódico es concomitante con una disminución en la actividad de FoxO3a	100
6.3	El tungstato sódico induce la diferenciación y protege de la apoptosis debida a estrés oxidativo en células Neuro2a	107
6.3.1	El tungstato sódico induce la diferenciación de células Neuro2a.....	107
6.3.2	El tungstato sódico protege frente a la muerte celular producida por estrés oxidativo	114
7	DISCUSIÓN	125
8	CONCLUSIONES.....	143
9	BIBLIOGRAFÍA	145

1 RESUMEN

En esta Tesis Doctoral se ha estudiado el efecto del tungstato sódico, un compuesto que se ha descrito como un agente antidiabético oral en diferentes modelos animales de diabetes (Barbera *et al.*, 1997; Barbera *et al.*, 1994). Su principal característica es la capacidad de activar la ruta de señalización de Ras-Raf-MAPK/ERK en líneas celulares procedentes de diversos órganos y tejidos (Dominguez *et al.*, 2003). Haciendo uso de esta propiedad hemos estudiado su efecto protector en dos patologías: atrofia muscular y neurodegeneración.

La atrofia muscular se produce por una disminución en la síntesis de proteínas conjuntamente con un aumento en su degradación. La degradación de proteínas en músculo esquelético está mediada por la actividad de dos rutas conservadas: ubiquitina-proteasoma y autofagia-lisosomal (Sandri, 2013).

La primera ruta, responsable del recambio de la mayoría de proteínas musculares solubles y miofibrilares, se activa como resultado de una expresión aumentada de ubiquitina y ligasas de ubiquitina, como atrogin-1 y MuRF1 (Bodine *et al.*, 2001).

La autofagia es un mecanismo homeostático empleado por la célula para la degradación y reciclaje de orgánulos y proteínas de vida media larga y su incremento produce un desequilibrio en el recambio proteico a favor de la degradación. En tal caso, se produce un incremento en la transcripción de una serie de genes como LC3, p62 y Bnip3 (Bonaldo y Sandri, 2013).

Ambas rutas están moduladas por el factor de transcripción FoxO3 (*forkhead box O3*) (Sanchez *et al.*, 2014). FoxO3 normalmente está fosforilado por Akt y en estado inactivo en el citosol, pero en ausencia de una represión de Akt, se transloca al núcleo donde induce la expresión de una serie de genes relacionados con los dos sistemas de degradación.

En cultivos de células musculares de rata L6, el tungstato sódico es capaz de promover la diferenciación de mioblastos a miotubos acelerando los cambios en los niveles de expresión de los factores de transcripción MRF (*myogenic regulatory factor*) y MEF2D. Además, tiene un efector positivo sobre la estabilidad de MEF2D por inhibición de la sumoilación.

Por otra parte, el tungstato sódico induce la síntesis de proteínas por la activación de la ruta de señalización Ras-Raf-MAPK/ERK y su efecto positivo sobre la actividad de mTOR, una quinasa de suma importancia en la regulación de la traducción del mRNA y el crecimiento celular. Además, origina una disminución de la degradación de proteínas porque promueve la fosforilación de FoxO3a, lo que conduce a su inactivación y a la inhibición de su translocación al núcleo y, por tanto, a una disminución en la actividad del promotor de ubiquitina así como una menor expresión de las ligasas de ubiquitina.

Asimismo, el tungstato sódico reduce la formación de autofagosomas, la expresión de la forma lipidada de LC3, la degradación de p62 y reduce los niveles de mRNA de Bnip3 en células tratadas con dexametasona.

Estos resultados obtenidos en cultivos celulares apoyan la idea de que la activación de ERK1/2 disminuye la degradación proteica a través de los dos sistemas celulares, ubiquitina-proteasoma y autofagia-lisosomal, por lo que el tungstato sódico podría ser un agente útil en situaciones fisiopatológicas en las que se presentase una atrofia muscular.

Por otro lado, el desarrollo de neuritas se considera como un indicador de diferenciación celular de neuroblastos a neuronas. Cuando células Neuro2a son tratadas con tungstato sódico durante 48 horas, el porcentaje de neuroblastos que desarrollan neuritas es significativamente mayor que en las células control. A nivel molecular esto se traduce en incrementos en la expresión de la acetilcolinesterasa y de la colina O-acetiltransferasa; este último como marcador de diferenciación a neuronas de tipo colinérgico. La diferenciación inducida se produce a la par que una disminución en la proliferación celular.

En neuronas, el estrés oxidativo desencadena un incremento de la autofagia y una inducción de la apoptosis (Buttke y Sandstrom, 1994; Chen *et al.*, 2008). En células Neuro2a tratadas con peróxido de hidrógeno, el tungstato sódico es capaz de normalizar la autofagia y prevenir la apoptosis, ensayadas mediante microscopía confocal y citometría de flujo. Adicionalmente, el tungstato sódico normaliza el metabolismo proteico en células Neuro2a.

La suma de los efectos positivos del tungstato sódico, tanto en diferenciación y generación de neuritas como de protección frente al estrés oxidativo hacen de este compuesto un buen candidato para ser un agente neuroprotector.

2 INTRODUCCIÓN

La búsqueda y validación de agentes terapéuticos está viviendo en la actualidad una época dorada. Las posibilidades que ofrece la nueva Biomedicina, conjugando técnicas de Biología Molecular, Biología Celular, Ingeniería Genética y Señalización Celular, hacen que las bases moleculares de la acción de numerosos agentes terapéuticos pueda ser elucidada de una manera inequívoca.

Las etapas que conducen a la aprobación de un agente terapéutico como medicamento son largas y muy costosas, lo que hace que en definitiva sólo puedan ser abordados por la industria farmacéutica unos pocos de ellos. No obstante, las etapas iniciales de búsqueda y validación de dianas moleculares para el desarrollo de medicamentos y los primeros pasos de selección de candidatos sí se encuentran al alcance de numerosos laboratorios tanto del ámbito académico como del industrial. Aquellos candidatos más prometedores tendrán que seducir, es decir, ser licenciados a una gran empresa farmacéutica para seguir su desarrollo posterior. A este nivel la competencia es feroz ya que muchos son los llamados y pocos los elegidos.

Dentro de las áreas de interés de la industria y el mercado farmacéutico, aquellas enfermedades asociadas con el envejecimiento y deterioro en general de la población occidental desarrollada ocupan una posición prioritaria dado el número de posibles pacientes y su poder adquisitivo. Así, patologías asociadas al tándem obesidad-diabetes tipo 2, sarcopenia y pérdida de masa muscular asociada a la enfermedad, envejecimiento o sedentarismo, y neurodegeneración debida al propio proceso de envejecimiento, a patologías cardiovasculares o bien a enfermedades específicas como Parkinson o Alzheimer son uno de los principales focos de atención de la industria farmacéutica en la actualidad.

Todas estas enfermedades tienen además un condicionante único que es el desarrollo de la patología a muy largo plazo, decenas de años al menos, por lo que tratamientos preventivos e incluso el desarrollo de alimentos funcionales que conduzcan al retraso de la aparición de los síntomas son uno de los objetivos más buscados. Además, si alguno de los candidatos tiene un efecto global en el conjunto de todas estas patologías ocupará una posición prevalente para su desarrollo ya que se trata normalmente de patologías multiasociadas en los pacientes.

El estudio de las vías intracelulares de señalización (*cell signalling*) es esencial hoy día tanto para la búsqueda de dianas moleculares como para el diseño de agentes terapéuticos. La existencia de anticuerpos comerciales frente a las quinasas clave de las cascadas de señalización en su forma fosforilada o no, así como la existencia de sistemas de genes reporteros para cada uno de los factores de transcripción implicados en la señalización celular ha hecho que haya revivido este campo de investigación en el desarrollo de medicamentos.

Muchas de las rutas de señalización intracelular tienen puntos comunes, o encrucijadas como PKB/Akt, en los que la activación de una determinada quinasa

hace que puedan modularse varias rutas de señalización. Así, es frecuente que un fármaco que ejerce su acción principal activando una determinada ruta, pueda tener acciones paralelas mediante la activación de otras rutas de señalización. Esto conduce a encontrar nuevas actividades biológicas para un medicamento ya conocido, lo cual tiene la ventaja adicional de que gran parte de los estudios de seguridad y toxicidad ya se encuentran realizados.

El tungstato sódico es un compuesto que se ha descrito como un agente hipoglucemiante oral. Fue referido como tal en la década de 1990 (Barbera *et al.*, 1997; Barbera *et al.*, 1994) y a la vía de administración oral sumaba una baja o nula toxicidad (a diferencia de otros compuestos como los derivados del vanadato) así como la propiedad muy destacada de no conducir a situaciones de hipoglucemia en respuesta al tratamiento (Barbera *et al.*, 2001). Rápidamente, se determinó la capacidad de normalizar el metabolismo hepático de la glucosa (Barbera *et al.*, 1994) y nuestro grupo de investigación demostró su capacidad de favorecer la entrada de glucosa al músculo tanto en modelos *in vivo* (Giron *et al.*, 2003) como *in vitro* (Giron *et al.*, 2008). Paralelamente, el efecto anti-obesidad del compuesto fue establecido (Claret *et al.*, 2005).

Una de las características más destacables del tungstato sódico es su mecanismo de acción independiente de la insulina y de la vía de señalización intracelular dependiente de PKB/Akt (Dominguez *et al.*, 2003). Esto lo hace un compuesto muy atractivo en el caso de la resistencia periférica a la acción de la insulina ya que su mecanismo de actuación se basa fundamentalmente en la activación de la vía de señalización de MAP quinasas.

Nuestro grupo de investigación se centró en los efectos del tungstato sódico en músculo esquelético y en concreto en la modulación del transporte de glucosa al músculo. Los resultados que obtuvimos indicaban un incremento en la membrana plasmática del transportador de glucosa GLUT4. Este incremento se debía a un aumento de la translocación desde reservorios intracelulares, dependiente de la fosforilación de MEK así como un aumento en la cantidad total del transportador debido a una activación de factores de transcripción musculo específicos como los de la familia de MEF2 (Giron *et al.*, 2008).

El hecho de que el tungstato sódico sea capaz de modular la actividad de los reguladores transcripcionales MEF2 ha sido clave para el desarrollo de esta Tesis Doctoral ya que se trata de una familia de factores de transcripción cuya expresión en músculo y cerebro regula procesos de diferenciación y plasticidad. Puesto que el tungstato sódico, en su función de facilitar el transporte de glucosa en músculo ejerce su acción activando MEF2D, ¿sería posible que dicho compuesto tuviera un efecto positivo en diferenciación de músculo y de neuronas, los principales tejidos donde se expresa la familia de MEF2? E incluso, ¿sería posible que los efectos del tungstato sódico fueran más allá de la diferenciación y promoviera en estos tejidos otros efectos positivos? En concreto, el aumento de la síntesis proteica en músculo,

un proceso concomitante con la diferenciación muscular y efectos neuroprotectores en neuronas, un efecto normalmente asociado al de plasticidad neuronal.

Todos estos efectos putativos serían muy interesantes ya que el tungstato sódico combinaría sus efectos antidiabéticos y antiobesidad con un efecto protector frente a la pérdida de masa muscular. La pérdida de masa muscular acelerada o sarcopenia se asocia con numerosas patologías de la edad y entre ellas la diabetes tipo 2 (Tanaka *et al.*, 2015). Así mismo, la diabetes tipo 2 se asocia con un incremento del estrés oxidativo en el organismo. Este estrés a nivel neuronal conduce a neurodegeneración a través de los propios radicales libres o el plegamiento incorrecto de proteínas oxidadas (Martinez *et al.*, 2010). Disponer de un agente terapéutico que a través de dianas moleculares específicas abordase todas estas patologías asociadas es muy atractivo.

En esta Tesis Doctoral se presentarán resultados que validan la hipótesis expuesta en el párrafo anterior. El tungstato sódico a través de rutas de señalización que implican a las MAP quinasas es capaz de promover la diferenciación muscular y neuronal, de normalizar el metabolismo proteico en músculo y tiene la capacidad de proteger frente al estrés oxidativo en células neuronales. Estos efectos están mediados por rutas de señalización y dianas moleculares específicas, lo que soporta los efectos descritos para esta molécula.

Probablemente el tungstato sódico no acabe como un medicamento en una oficina de farmacia. E incluso es posible que su acción a dosis terapéuticas en humanos no sea lo suficientemente potente, pero creemos que su mecanismo de acción único a través de dianas moleculares propias y su efecto pleiotrópico sobre patologías concomitantes a la diabetes y el envejecimiento lo hacen un buen modelo para, a partir de él, desarrollar fármacos más potentes que se dirijan a las mismas dianas moleculares. Esto es lo que creemos que da validez a este trabajo

3 ANTECEDENTES

3.1 Miogénesis y recambio proteico en músculo esquelético

El músculo esquelético supone aproximadamente un 50% de la masa corporal en vertebrados superiores. Además de su evidente función motora, juega un papel relevante como reservorio de aminoácidos durante situaciones de ayuno, en el control de la respiración y en la regulación de parámetros metabólicos como la glucemia (Izumiya *et al.*, 2008). Por todo esto, es razonable pensar que la conservación de la masa muscular es crucial para el mantenimiento de un estado saludable del individuo y garantizar una buena calidad de vida a largo plazo (Seguin y Nelson, 2003; Srikanthan y Karlamangla, 2011). Un conocimiento en profundidad de las bases moleculares que regulan la masa muscular esquelética permitirá desarrollar posibles estrategias terapéuticas destinadas a prevenir o paliar su atrofia, o bien a promover su desarrollo.

3.1.1 Miogénesis

El músculo esquelético es un tejido dinámico con capacidad para recuperarse de un daño severo por su capacidad regenerativa. Dicha capacidad se debe fundamentalmente a la presencia de las denominadas células satélite que se caracterizan morfológicamente por ser pequeñas, tener un solo núcleo y estar situadas entre la lámina basal y la membrana plasmática de los miotubos (Holterman y Rudnicki, 2005). A nivel molecular, presentan elevados niveles de las proteínas Pax-3 (*paired box protein*) y Pax-7. En respuesta a un daño, las células satélite se activan y comienzan a proliferar para acabar diferenciándose en miotubos. Algunas no se diferencian quedando como reservorio para hacer frente a una futura lesión (Shi y Garry, 2006).

Los mecanismos por los cuales se generan las células que dan lugar al tejido muscular en el embrión son diferentes en función de si centramos nuestra atención en el tronco, las extremidades o la cabeza. En el caso del individuo adulto, las rutas son iguales en todas las localizaciones (Mok y Sweetman, 2011). En este apartado trataremos sobre lo que ocurre en el tejido del individuo adulto.

3.1.1.1 Proceso de miogénesis

El proceso de diferenciación celular en músculo siempre comienza con la expresión de los llamados MRF (*myogenic regulatory factors*), un grupo de cuatro factores de transcripción que tienen en común la presencia de un motivo hélice-giro-hélice en su estructura y que son: Myf-5 (*myogenic factor 5*), MyoD (*myoblast determination protein*), Mrf-4 (*muscle-specific regulatory factor 4*) y myogenin (Pownall *et al.*, 2002). Los dos primeros, Myf-5 y MyoD, parecen estar más

relacionados con el comienzo del proceso de diferenciación mientras que los otros dos, Mrf-4 y myogenin, son asociados al fenómeno de terminación y mantenimiento de la homeostasis en las fibras recién formadas (Singh y Dilworth, 2013).

El dominio básico de los MRF se une al DNA, mientras que el motivo hélice-giro-hélice es necesario para su dimerización con las proteínas de unión a *E-boxes* que, como su propio nombre indica, tienen la capacidad de unirse a dicho motivo genético (*E-box*) presente en los promotores de numerosos genes que se expresan en músculo (Massari y Murre, 2000).

La actividad de los MRF es potenciada por su interacción con los miembros de otra familia de factores de transcripción: MEF2 (*myocyte enhanced factor*). Esta está constituida por cuatro isoformas (A-D) (Black y Olson, 1998), pero en músculo solo se expresan tres de ellas: MEF2A, C y D (Potthoff y Olson, 2007). La represión de su expresión no influye en la viabilidad de las células satélite, pero hace imposible su diferenciación (Liu *et al.*, 2014).

Los MRF y MEF2 inducen mutuamente la transcripción de los genes que los codifican y también la de diversos genes que codifican para proteínas estructurales de músculo y otros factores de transcripción que propagan y amplifican la señal iniciada por los MRF (Blais *et al.*, 2005; Molkentin y Olson, 1996).

La regulación de MEF2 es compleja y se produce a distintos niveles, incluyendo *splicing* alternativo (Zhu *et al.*, 2005), degradación mediada por caspasas (Li *et al.*, 2001), modulación de la capacidad de unión a DNA (Mao y Wiedmann, 1999), asociación con reguladores transcripcionales (Chen *et al.*, 2002), translocación desde el núcleo al citoplasma (De Angelis *et al.*, 1998) y acetilación (Ma *et al.*, 2005).

Además, MEF2 está sometido a una regulación por modificaciones covalentes como son la fosforilación (Cox *et al.*, 2003; Han y Molkentin, 2000; Kasler *et al.*, 2000; Molkentin *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 2005) y la sumoilación (Gregoire y Yang, 2005).

Centrándonos en MEF2D, los restos S121 y S190 son susceptibles de ser fosforilados por mediación de la proteína quinasa A (PKA) dando lugar a una inhibición de su actividad (Du *et al.*, 2008). Por otra parte, el resto K439 puede ser sumoilado quedando la proteína marcada para su degradación. Esta sumoilación únicamente se lleva a cabo si previamente se produce la fosforilación del resto S444 por la acción de Cdk5 (*cyclin-dependent-like kinase 5*) (Gregoire *et al.*, 2006).

En condiciones fisiológicas, es evidente que no siempre es necesario que las células satélite comiencen a diferenciarse. Para evitar que MyoD lleve a cabo su acción en estos casos, existen numerosos factores de transcripción (como Sharp-1, Mist, MyoR o Twist) que compiten para evitar que se una a los motivos *E-box* del DNA. También se pueden unir directamente a MyoD, desplazando a MEF2, para dar lugar a dímeros inactivos (Ling *et al.*, 2012).

Por último, diremos que en el momento en que se produce un daño en el músculo, se liberan diversos factores de crecimiento en el entorno extracelular. Estos

factores pueden provenir de las fibras dañadas, de los nuevos miotubos en formación, de células implicadas en el proceso de inflamación (como macrófagos) o del riego sanguíneo. En su conjunto juegan un papel importante en las distintas etapas de la regeneración del músculo. Este proceso está comentado en detalle en Karalaki *et al.* (2009).

3.1.1.2 Regulación de la miogénesis

Como acabamos de ver, el proceso de formación de nuevas células musculares está bajo el control de varios factores de transcripción miogénicos. Obviamente estos no actúan de forma aislada, sino que forman la etapa final de un complejo sistema de cascadas de señalización. A continuación explicaremos cómo algunas de estas rutas modulan el proceso de miogénesis.

- Proteína quinasa A

La PKA participa en multitud de procesos celulares y puede actuar sobre centenares de sustratos. En su forma inactiva, está constituida por dos subunidades catalíticas y dos subunidades reguladoras. Cada una de las subunidades reguladoras puede unirse a AMP cíclico (cAMP) liberándose del conjunto y activando las subunidades catalíticas (Skalhegg y Tasken, 1997).

La activación de PKA es necesaria para la expresión de Pax-3, MyoD y Myf-5 (Chen *et al.*, 2005). Cuando PKA se encuentra activa, fosforila a CREB (*cAMP response-element binding protein*) que es un factor de transcripción cuya fosforilación permite iniciar la transcripción de genes que contienen el elemento CRE, dos de los cuales son Pax-3 y Myf-5.

Por otra parte, se conoce que PKA puede inhibir la actividad de Myf-5, MyoD, myogenin y MEF2D (Du *et al.*, 2008; Li *et al.*, 1992; Winter *et al.*, 1993).

El hecho de que la misma enzima tenga estos dos papeles antagónicos en la diferenciación celular puede explicarse por modificaciones en los niveles de cAMP o por cambios en la localización de la enzima según la etapa de la diferenciación. En relación a la localización de la enzima, diremos que parece esencial la presencia de PKA en los *lamellipodia* de los miotubos recién formados para su fusión (Mukai y Hashimoto, 2008).

- Ruta de PI3K/Akt

La principal vía de activación de Akt (*RAC-alpha serine/threonine-protein kinase*) es a través de la insulina o IGF (*insulin-like growth factor*). En cultivos celulares se ha comprobado que IGF es un potente estimulador de la diferenciación de mioblastos y de la hipertrofia (Tureckova *et al.*, 2001). Estos efectos también se han observado en ensayos realizados con ratones (Coleman *et al.*, 1995).

Por otra parte, son numerosos los estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*, que demuestran que es esencial la activación de Akt para que se pueda llevar a cabo la diferenciación de los mioblastos en miotubos (Sarker y Lee, 2004).

En realidad, Akt presenta tres isoformas (Akt1-3) de las que solo Akt1 y Akt2 participan en la miogénesis. A su vez, únicamente Akt2 ve incrementada su expresión durante el proceso de diferenciación, mientras que Akt1 parece estar implicada en la proliferación (Heron-Milhavet *et al.*, 2006). Una vez que Akt2 se activa, fosforila al factor de transcripción Pitx2 (*Pituitary homeobox 2*). Este interacciona con la proteína de unión a mRNA HuR (*Hu-antigen R*) para estabilizar los niveles de transcripción de cyclin D1 manteniendo de este modo el estado proliferativo. Cuando Akt2 fosforila a Pitx2, se desestabiliza el complejo con HuR y se produce la degradación del mRNA de cyclin D1 propiciando la salida del ciclo celular (Gherzi *et al.*, 2010). Una vez que esto ocurre, se produce la fosforilación e inhibición de los factores de transcripción FoxO por parte de Akt dando inicio al proceso de diferenciación (Hribal *et al.*, 2003).

En mioblastos, la actividad de MyoD y MEF2 está parcialmente reprimida por su unión al represor transcripcional PHB2 (*prohibitin-2*). Akt2 puede unirse a PHB2 e impedir su actuación activándose de este modo la transcripción mediada por MyoD y MEF2 (Heron-Milhavet *et al.*, 2008).

Para concluir diremos que GSK3 β (*glycogen synthase kinase-3 beta*) suprime la miogénesis porque, en última instancia, impide la activación de factores de transcripción necesarios para que se produzca dicho fenómeno (van der Velden *et al.*, 2008). La fosforilación de GSK3 β por parte de Akt revierte esta situación (van der Velden *et al.*, 2006).

- Ruta de Ras-Raf-MAPK/ERK

En principio, la fosforilación y activación de ERK1/2 (*extracelular signal-regulated kinase*) inhibe la diferenciación de los mioblastos, pero posteriormente es requerida para la fusión de los miotubos. Al parecer, el comportamiento de la célula va a estar determinado por qué factor de crecimiento es el que origina la estimulación de la actividad de ERK. En este sentido, tanto IGF como FGF (*fibroblast growth factor*) activan a ERK, pero una vez que las células en cultivo alcanzan la confluencia, IGF promueve la diferenciación (Adi *et al.*, 2002) mientras que FGF la impide (Tortorella *et al.*, 2001). Probablemente la diferencia radique en la capacidad de IGF para activar otras rutas de señalización simultáneamente. Es por tanto importante tener en cuenta el contexto fisiológico en el que se encuentra la célula para evaluar el papel de la activación de ERK.

En el caso de FGF, la fosforilación de ERK conduce a una disminución de MEF2 en el núcleo (Winter y Arnold, 2000) y la inhibición de la expresión de diversos factores miogénicos como MyoD (Vaidya *et al.*, 1989)

- Ruta de p38 MAPK

La familia de las p38 MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) está constituida por una serie de isoformas de la proteína p38 (α , β , γ y δ) que participan en la diferenciación de diversos tipos celulares; pero en lo que concierne al músculo, es p38 α la que juega un papel crítico.

Aunque existen varios mecanismos de activación de p38 α (Bhatnagar *et al.*, 2010), el principal es la formación de un complejo de proteínas de la membrana citoplasmática que secuestra y activa a p38 α como respuesta a la interacción célula-célula (Kang *et al.*, 2008).

Una vez activada, p38 α promueve la diferenciación celular a distintos niveles: favorece la salida del ciclo celular (Perdiguero *et al.*, 2007), disminuye la expresión de Pax-7 (Palacios *et al.*, 2010), fosforila y activa a los factores de transcripción MEF2C (Zetser *et al.*, 1999) y E47 que forma un heterodímero activo con MyoD (Lluis *et al.*, 2005), e induce la expresión de otros genes que participan en la diferenciación del músculo como son Akt (Cabane *et al.*, 2004), caveolin 3 (Galbiati *et al.*, 1999) e IGF2 (Lovett *et al.*, 2010).

3.1.2 Síntesis y degradación de proteínas en músculo esquelético

En última instancia, la masa muscular esquelética viene determinada por lo que denominamos recambio proteico, esto es, la diferencia neta entre los índices de síntesis y degradación de proteínas (Sandri, 2013). Un incremento de la degradación y/o una disminución de la síntesis, dará lugar a un menor tamaño del músculo y, como consecuencia, a una pérdida en la fuerza que puede ejercer. Esto es lo que se denomina atrofia muscular.

Por el contrario, si la síntesis de proteínas está incrementada y/o la degradación disminuida, entonces hablaremos de hipertrofia muscular en cuyo caso el diámetro de la sección transversal de las fibras musculares y su volumen aumentarán, pero no así su número.

Ambos procesos pueden verse alterados por diversos estímulos como la presencia de determinados nutrientes, la actividad neuronal, citoquinas, factores de crecimiento, hormonas, ejercicio físico y enfermedades (cardíacas y renales, sepsis, cáncer, sida...) (Gordon *et al.*, 2013).

A continuación expondremos cuáles son los principales procesos que intervienen en la síntesis y degradación de proteínas en músculo esquelético haciendo especial hincapié en los elementos que participan en su regulación.

3.1.2.1 Síntesis de proteínas en músculo esquelético: mTOR

A día de hoy, podemos decir con certeza que existe un elemento que juega un papel fundamental en la regulación de la masa muscular: la proteína quinasa

mTOR (*mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)*). Esta tiene una importancia vital en la regulación de la traducción del mRNA y el crecimiento celular.

Estudios llevados a cabo en diversos tejidos muestran que mTOR se encuentra localizada en múltiples compartimentos celulares: dispersa en el citoplasma y, en presencia de determinados estímulos, en las membranas de diversos orgánulos como el retículo endoplásmico y aparato de Golgi (Drenan *et al.*, 2004; Withers *et al.*, 1997); en la membrana externa mitocondrial (Desai *et al.*, 2002) e incluso en el interior del núcleo (Bachmann *et al.*, 2006).

En el caso concreto del músculo, una serie de estímulos, como son factores de crecimiento (insulina o IGF-1), la presencia de aminoácidos o la activación mecánica del músculo, originan la translocación de mTOR desde el citoplasma a las membranas que conforman el sistema endosomal-lisosomal (Jacobs *et al.*, 2014).

En realidad, mTOR es la subunidad catalítica de dos complejos proteicos distintos denominados mTORC1 (*mTOR complex 1*) y mTORC2 (*mTOR complex 2*). Cada uno de estos complejos viene definido por una proteína que es RAPTOR (*regulatory-associated protein of mTOR*) y RICTOR (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*) respectivamente. Ambas sirven de soporte para el ensamblaje de los complejos y para la unión de sustratos y elementos reguladores de su actividad (Hara *et al.*, 2002; Pearce *et al.*, 2007).

Tanto mTORC1 como mTORC2 presentan en su estructura a mLST8 (*mammalian lethal with SEC13 protein 8*) que es un regulador positivo (Kim *et al.*, 2003) y a DEPTOR (*DEP domain-containing mTOR-interacting protein*) que es un regulador negativo (Peterson *et al.*, 2009).

Por su parte mTORC1 presenta otro regulador negativo denominado PRAS40 (*40 kDa Pro-rich Akt substrate*) (Vander Haar *et al.*, 2007), mientras que mTORC2 incluye a PROTOR1/2 (*proline-rich protein 5*) que parece tener una función estructural (Pearce *et al.*, 2007) y a MAPKAP1 (*mitogen-activated protein kinase 2-associated protein 1*) que puede participar en el transporte del complejo hasta la membrana plasmática (BerchtoldyWalther, 2009).

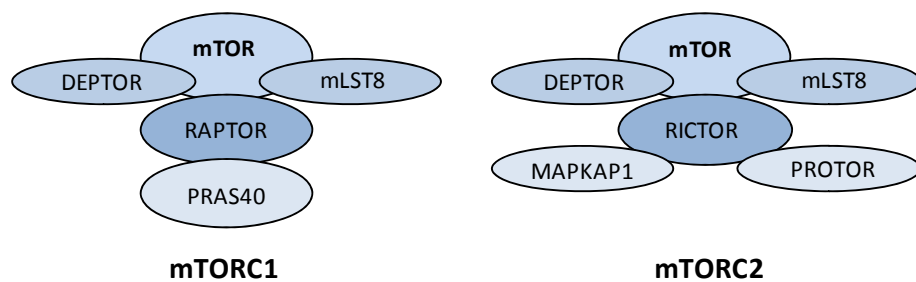


Figura 3.1. Diagrama de las proteínas que conforman los complejos mTORC1 y mTORC2.

Un esquema de las distintas proteínas que forman parte de mTORC1 y mTORC2 se puede apreciar en la Figura 3.1.

De aquí en adelante nos centraremos en el papel de mTOR en el contexto del complejo mTORC1.

- Sustratos de mTOR

Dos son las principales proteínas diana que son fosforiladas por mTOR: S6K1 (*ribosomal protein S6 kinase*) y 4E-BP1 (*eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1*) (Weigl, 2012). Ambas están implicadas fundamentalmente en la fase de iniciación de la traducción del mRNA y, por tanto, participan en la síntesis proteica. Una completa revisión del proceso de traducción se puede encontrar en Hershey *et al.* (2012).

A continuación, además de estudiar con más detalle cómo actúan S6K1 y 4E-BP1 (ver Figura 3.2), también dedicaremos un apartado a eIF2Bε (*eukaryotic translation initiation factor 2B subunit epsilon*) que es un elemento activador de la síntesis proteica y cuya expresión parece estar condicionada por mTOR aunque por el momento no se conoce en profundidad cómo interactúan estos dos elementos.

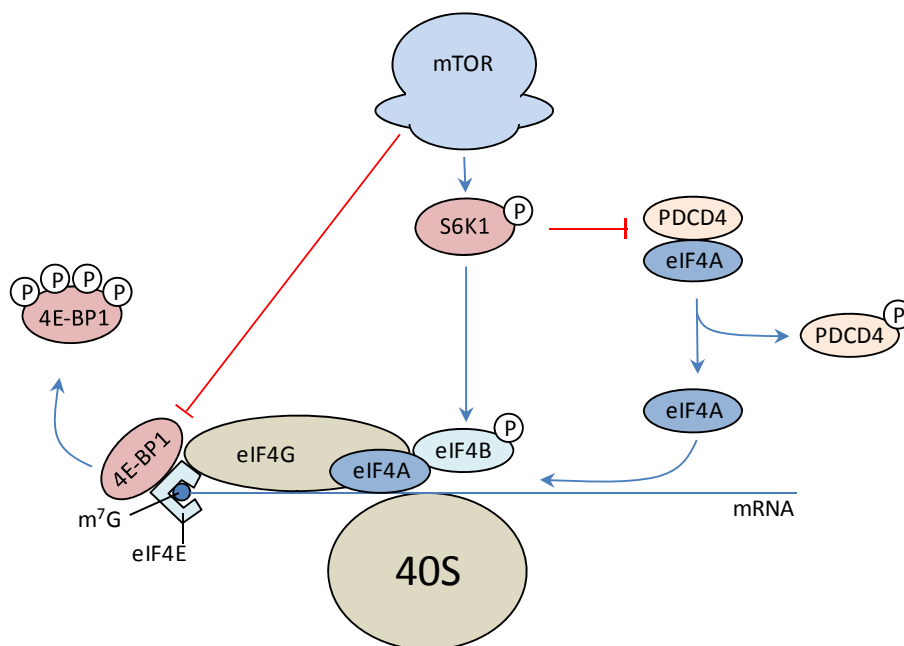


Figura 3.2. La fosforilación de S6K1 y 4E-BP1 por parte de mTOR activa el inicio de la síntesis de proteínas. 4E-BP1, *eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1*; eIF4, *eukaryotic translation initiation factor*; mTOR, *mechanistic target of rapamycin*; PDCD4, *programmed cell death protein 4*; S6K1, *ribosomal protein S6 kinase*.

+ S6K1

No son pocos los mRNA que tienden a formar estructuras secundarias estables en la región cercana al extremo 5' no traducido de manera que se ve disminuida drásticamente la eficiencia de traducción. Para que el complejo de inicio de la traducción pueda ser reclutado cerca del extremo 5' del mRNA es necesario que dichas estructuras secundarias sean eliminadas. Este proceso lo lleva a cabo la actividad helicasa que presenta eIF4A (*eukaryotic translation initiation factor A*) que se ve activada considerablemente cuando se asocia a eIF4B (Holz *et al.*, 2005). Esta interacción solo se produce cuando eIF4B se encuentra fosforilada y dicha fosforilación la lleva a cabo la quinasa S6K1.

Por otra parte, la proteína PDCD4 (*programmed cell death protein 4*) se une a eIF4A dando lugar a su inhibición. Cuando S6K1 se activa por mediación de mTOR, fosforila a PDCD4 que a continuación es degradada por el sistema ubiquitina-proteasoma, restaurándose así la actividad helicasa de eIF4A y el inicio de la traducción. Se ha comprobado que la expresión en cultivos celulares de un mutante de PDCD4 no fosforilable por S6K1 impide su ubiquitinación y posterior degradación dando lugar a un menor tamaño celular y un enlentecimiento en la progresión del ciclo celular (Dorrello *et al.*, 2006).

En cuanto a la etapa de elongación de la traducción, para que esta se lleve a cabo es necesario que eEF-2 (*eukaryotic elongation factor 2*) no esté fosforilada en T56. Esta condición solo se produce si la quinasa eEF-2K (*eukaryotic elongation factor 2 kinase*) no está activada. En este sentido, cuando S6K1 fosforila a eEF-2K en S366 tiene lugar su inhibición. De esta forma, eEF-2 se encuentra desfosforilada, por tanto activa, y puede ejercer su función en la etapa de elongación de la síntesis de proteínas (Wang *et al.*, 2001).

Por último diremos que para que se produzca un incremento de la síntesis proteica es necesario un aumento en el número de ribosomas disponibles. La biogénesis de ribosomas se inicia con la activación del factor de transcripción de rDNA UBF (*upstream binding factor*) que se unirá al factor de transcripción SL-1 (*promotor selectivity factor*). Para que dicha asociación tenga lugar, es necesaria la fosforilación por parte de S6K1 de diversos restos del extremo carboxilo de UBF (aminoácidos 675 a 765) (Hannan *et al.*, 2003). Además, la actividad de un elevado porcentaje de las proteínas participantes en el proceso de biogénesis de ribosomas está bajo el control de S6K1 (Chauvin *et al.*, 2014).

+ 4E-BP1

En el momento en que el mRNA es exportado al citoplasma, su caperuza interacciona con el complejo eIF4F, cuya función es facilitar la unión del ribosoma al extremo 5' del mRNA y que de esta manera comience la traducción (Sonenberg y Hinnebusch, 2009). De las distintas subunidades que forman el complejo eIF4F, es la proteína eIF4E la que interacciona directamente con la caperuza.

Cuando 4E-BP1 se encuentra hipofosforilada secuestra a eIF4E impidiendo la formación del complejo eIF4F y por tanto el inicio de la traducción (Richter y Sonenberg, 2005). Por su parte, mTOR fosforila a 4E-BP1 en diversos restos dando lugar a la disociación del complejo eIF4E/4E-BP1 revertiendo la situación de inhibición (HeesomyDenton, 1999).

+ *eIF2B ϵ*

Se denomina así a una de las cinco subunidades de la proteína eIF2B que, a su vez, forma parte del complejo eIF2 que es el encargado de transportar el metionil-tRNA iniciador hasta el ribosoma durante la formación del complejo de iniciación 40S (Pavitt, 2005).

Se ha observado que la sobreexpresión de eIF2B ϵ es suficiente para inducir la actividad de eIF2B, mientras que si se produce una represión de la expresión del gen, se aprecia una menor síntesis de proteínas (Gallagher *et al.*, 2008). También se ha comprobado que el uso de rapamicina, un inhibidor de mTOR, origina una disminución de la expresión de eIF2B ϵ (Kubica *et al.*, 2008). Esto pone de manifiesto que debe existir cierta relación entre eIF2B ϵ y mTOR, sin embargo, el mecanismo por el cual están vinculadas las actividades de estas dos proteínas aún no ha sido dilucidado.

- Regulación de mTOR

Vistas las acciones que mTOR lleva a cabo sobre sus sustratos en relación con la síntesis de proteínas, nos detendremos ahora a estudiar qué proteínas ejercen su acción sobre mTOR y cómo modulan su actividad.

Se puede decir que mTOR actúa como un elemento integrador de las señales provenientes de cuatro importantes tipos de estímulos: nutrientes, factores de crecimiento, balance energético y estrés (Dibble y Manning, 2013). Estos estímulos pueden tener un efecto sinérgico o antagónico sobre mTOR lo que permite una regulación fina de la actividad de la proteína en cada momento.

+ *Nutrientes*

Numerosos estudios han puesto de manifiesto que se requieren aminoácidos ramificados, y más concretamente leucina, para activar la señalización de mTOR en cultivos celulares (Hara *et al.*, 1998). La leucina debe encontrarse en el citoplasma para que mTOR se active. Esto es posible gracias a la existencia de un sistema bidireccional de transportadores de aminoácidos (Nicklin *et al.*, 2009).

Como se puede apreciar en la Figura 3.3, el elemento que vincula la presencia de leucina en el interior celular con la activación de mTOR es la familia de proteínas Rag GTPasas (*Ras-related GTP-binding protein*) (Sancak *et al.*, 2008) que son heterodímeros unidos a nucleótidos de guanina de manera que se emparejan Rag A o Rag B con Rag C o Rag D. Cuando Rag A/B está asociado a GTP, Rag C/D lo está a GDP y viceversa.

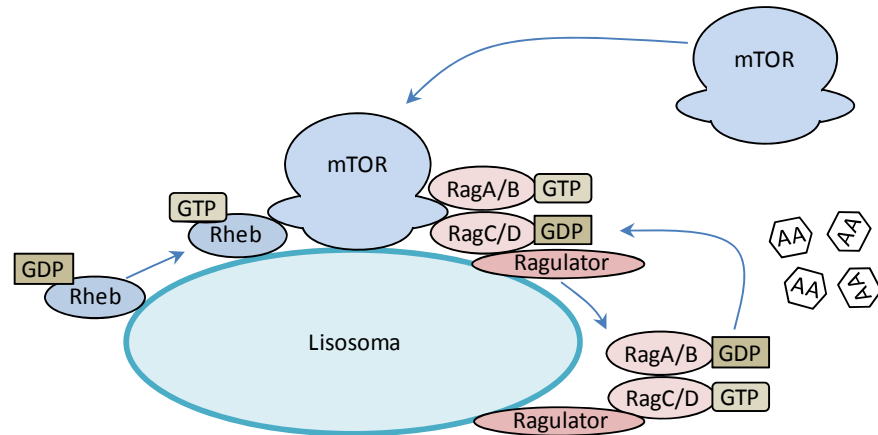


Figura 3.3. Los aminoácidos promueven la translocación de mTOR a membranas lisosomales donde es activado por mediación de Rheb. AA, aminoácidos; mTOR, *mechanistic target of rapamycin*; Rag, *Ras-related GTP-binding protein*; Rheb, *Ras homolog enriched in brain*.

En presencia de leucina se observa la conformación activa (Rag A/B^{GTP}; Rag C/D^{GDP}) que se puede unir a RAPTOR promoviendo la translocación de mTOR a membranas de endosomas y lisosomas donde las Rag GTPasas se encuentran ancladas gracias a un complejo formado por tres pequeñas proteínas (MP1, p14 y p18) denominado Ragulator. Es en este momento cuando mTOR se encuentra en disposición de ser activado por Rheb (*Ras homolog enriched in brain*) cuya actividad está controlada por diversos factores de crecimiento (Jewell *et al.*, 2013).

Aunque venimos hablando de aminoácidos, estudios recientes ponen de manifiesto que el efecto atribuido a estos en relación con la síntesis de proteínas en músculo puede ser debido a un metabolito de la leucina: el β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB). Este produce una activación de la ruta de señalización de mTOR en miotubos L6 mientras que la leucina no lo consigue. Más aún, cuando las células se transfectan con el gen codificante de la α -cetoisocaproatodioxigenasa, que es la enzima encargada de la conversión de α -cetoisocaproato (un metabolito intermediario de la leucina) en HMB, la adición de leucina al medio de cultivo arroja resultados similares a los obtenidos previamente con HMB en células no transfectadas (Girón *et al.*, 2015).

+ Factores de crecimiento

Hemos comentado en el apartado anterior que, en última instancia, la activación de mTOR es llevada a cabo por Rheb. A su vez, esta es modulada por factores de crecimiento de manera que se activa cuando se encuentra unida a una molécula de GTP. En mamíferos, el déficit de Rheb limita drásticamente la activación de mTOR aun en presencia de aminoácidos y factores de transcripción (Groenewoud *et al.*, 2013).

La insulina o el IGF-1 se unen a su receptor y activan la ruta de PI3K (*Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase*) que conduce a la fosforilación y activación de PKB/Akt (Rommel *et al.*, 2001). A su vez, Akt fosforila a TSC2 (*tuberin*) que junto a TSC1 (*hamartin*) forman el complejo TSC (*tuberous sclerosis complex*) (Inoki *et al.*, 2002). TSC desfosforilada tiene actividad GTPasa sobre Rheb de forma que queda unida a GDP y, por tanto, inactiva. De este modo queda interrumpida la señalización a través de mTOR (Inoki *et al.*, 2003). Como hemos dicho anteriormente, Akt tiene como sustrato a TSC2 que al fosforilarse hace que TSC pierda su actividad GTPasa sobre Rheb de manera que queda en disposición de activar a mTOR.

Por otra parte, Akt también tiene como sustrato a PRAS40 (regulador negativo del complejo mTORC1) lo que da lugar a su unión a proteínas 14-3-3 e impide que inhiba a mTOR (Vander Haar *et al.*, 2007).

Otros factores de crecimiento actúan a través del eje de quinasas Ras-Raf-MAPK/ERK. El último de sus elementos, ERK1/2 también tiene como sustrato a TSC2 que se inactiva al fosforilarse (Ma *et al.*, 2007). El resto del proceso es igual al descrito en el caso de la fosforilación a través de Akt, aunque los sitios de fosforilación de estas quinasas en TSC2 son distintos.

La actuación de todos estos factores de crecimiento queda resumida en la Figura 3.4.

+ Balance energético y estrés

El uso de inhibidores químicos de la glucólisis y de la función mitocondrial originan una disminución de la actividad de mTOR en la célula poniendo de manifiesto que es sensible al balance energético (Dennis *et al.*, 2001). Esto es realmente relevante ya que mTOR activa procesos celulares que conllevan un importante gasto de energía que no podrían ser soportados por células con un déficit energético.

En definitiva, la relación AMP:ATP pudiera ser responsable de la regulación de mTOR. Si tomamos como ejemplo un tejido que está sometido a una restricción de nutrientes, los niveles de ATP disminuyen rápidamente y la relación AMP:ATP aumenta. Esta situación es detectada por la proteína AMPK (*5'-AMP-activated protein kinase*) que fosforila a TSC2 permitiendo la formación del complejo TSC que a su vez ejerce su acción GTPasa sobre Rheb impidiendo su acción y, por tanto, disminuyendo la señalización a través de mTOR (Xu *et al.*, 2012). Por otra parte,

AMPK también inhibe a mTORC1 por fosforilación de RAPTOR provocando su unión a proteínas 14-3-3 (Gwinn *et al.*, 2008).

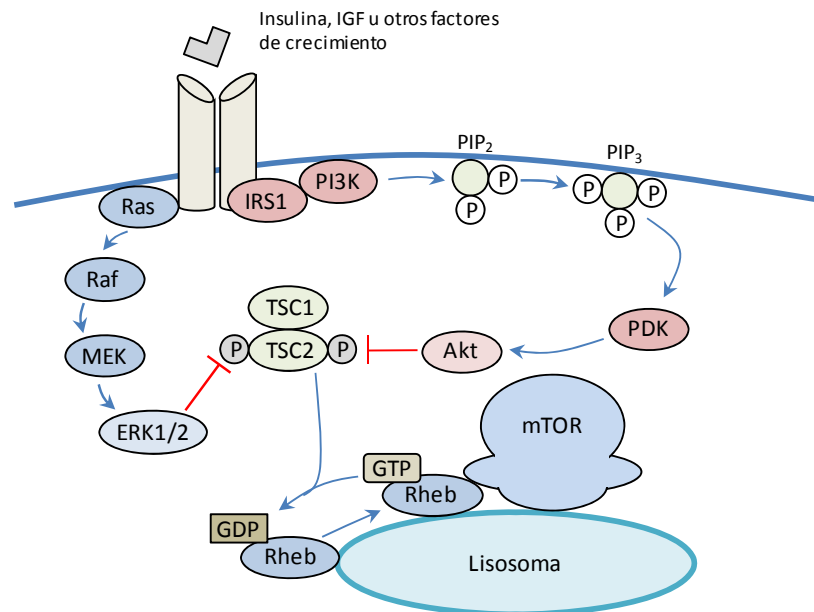


Figura 3.4 mTOR es activado a través de las rutas de señalización de PI3K/Akt y Ras-Raf-MAPK/ERK. ⊕ indica fosforilación activadora y ⊖ con fondo sombreado fosforilación inhibidora. Akt, *RAC-alpha serine/threonine-protein kinase*; ERK, *extracellular signal-regulated kinase*; IRS, *insulin receptor substrate*; MEK, *MAPK/ERK kinase*; mTOR, *mechanistic target of rapamycin*; PDK, *phosphoinositide dependent protein kinase*; PI3K, *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase*; Rheb, *Ras homologen riched in brain*; TSC1/2, *tuberous sclerosis complex 1/2*.

Además, existen diversos agentes estresantes que afectan a los niveles de ATP. Si nos centramos en el caso de la hipoxia, la respiración mitocondrial se ve afectada, disminuyen los niveles de ATP y se desencadenan los efectos comentados anteriormente. Además, la hipoxia puede inhibir a mTOR por un mecanismo independiente de AMPK y es que por mediación de HIF (*hypoxia-inducible factor*) se induce la expresión de REDD1 (*protein regulated in development and DNA damage response 1*) que promueve la formación del complejo TSC que a su vez inhibe a mTOR (Brugarolas *et al.*, 2004).

Por último hablaremos sobre el daño en el DNA. La proteína p53 activa la transcripción de los genes que codifican para Sestrin-1 y Sestrin-2 y que pueden activar a AMPK (Budanov y Karin, 2008).

En la Figura 3.5 se esquematiza cómo el déficit energético, situaciones de hipoxia y el daño en el DNA conducen a la inhibición de mTOR.

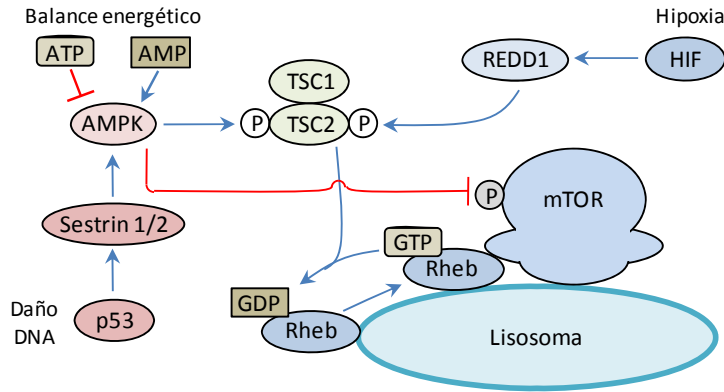


Figura 3.5. Regulación de la actividad de mTOR mediada por el balance energético celular y situaciones de estrés. ⊕ indica fosforilación activadora y ⊖ con fondo sombreado, fosforilación inhibitoria. AMPK, AMP dependent protein kinase; HIF, hipoxia inducible factor; mTOR, mechanistic target of rapamycin; REDD1, protein regulated in development and DNA damage response 1; Rheb, Ras homolog enriched in brain; TSC1/2, tuberous sclerosis complex 1/2.

+ Estímulos “no clásicos” de la ruta de mTOR

Hasta ahora podríamos decir que hemos hablado de los estímulos “clásicos” de la regulación de mTOR sobre los cuales existe una amplia base bibliográfica. Sin embargo, recientemente se ha puesto de manifiesto otra serie de estímulos que podríamos denominar “no clásicos”. Estos actúan a través de las vías de señalización de Hippo y Wnt y están representados de forma esquemática en la Figura 3.6.

- *Hippo*.

Esta ruta de señalización participa en la determinación del tamaño de los órganos al limitar el número de células que forman parte del mismo inhibiendo la proliferación y activando la apoptosis (Zhao *et al.*, 2011). Así pues, se puede decir que modula procesos celulares similares a los de mTOR pero en sentido contrario.

Si se produce la inhibición de la quinasa LATS (*large tumor suppressor homolog*), la proteína YAP (*yes-associated protein*) queda hipofosforilada y puede dirigirse al núcleo donde promueve la transcripción del microRNA miRNA-29 el cual inhibe la traducción del mRNA de PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) que es un inhibidor de la señalización a través de PKB/Akt (Tumaneng *et al.*, 2012). En resumen, si se bloquea la señalización de la ruta Hippo, se impide la síntesis de un inhibidor de Akt y por tanto esta puede desempeñar su función en la activación de mTOR.

- *Wnt*

La ruta de señalización de Wnt está implicada en la activación de genes que participan en la proliferación, diferenciación, polaridad y migración celular (Niehrs, 2012).

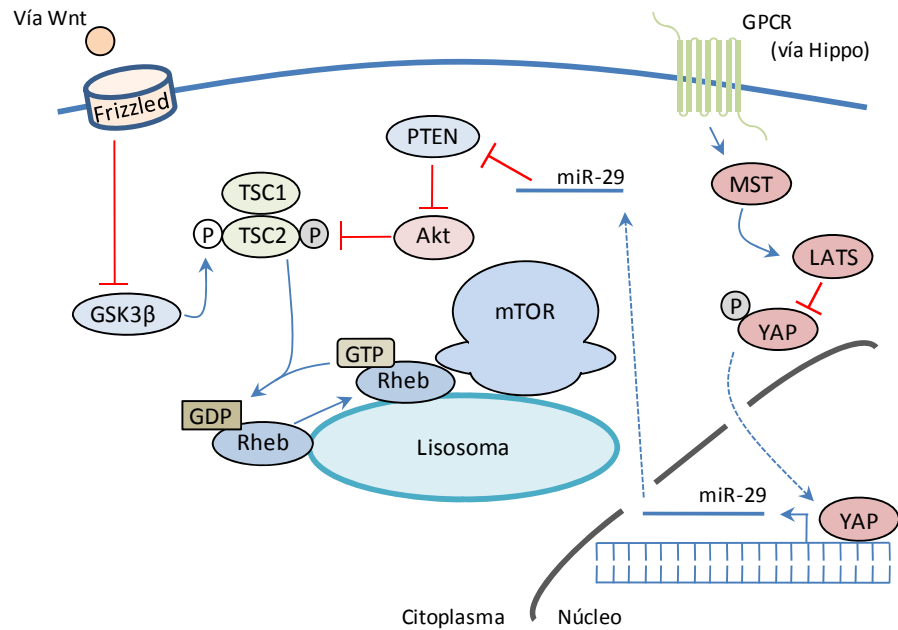


Figura 3.6. Las rutas de señalización Wnt e Hippo modulan la actividad de mTOR. Las flechas discontinuas indican movimientos entre distintas localizaciones intracelulares. © indica fosforilación activadora y Ⓟ con fondo sombreado fosforilación inhibitoria. Akt, *RAC-alpha serine/threonine-protein kinase*; GPCR, *G protein-coupled receptor*; GSK3β, *glycogen synthase kinase-3 beta*; LATS, *large tumor suppressor homolog*; MST, *mammalian STE20-like protein kinase*; mTOR, *mechanistic target of rapamycin*; PTEN, *phosphatase and tensin homolog*; Rheb, *Ras homolog enriched in brain*; TSC1/2, *tuberous sclerosis complex 1/2*; YAP, *yes-associated protein*.

En lo que concierne a mTOR, la unión de Wnt al receptor de membrana Frizzled da lugar a la fosforilación e inactivación de GSK3β. Puesto que GSK3β en su estado desfosforilado tiene un efecto inhibitorio de mTOR por su actividad quínasa sobre TSC2 que permite la formación del complejo TSC, la fosforilación de GSK3β da lugar finalmente al efecto contrario, esto es, la activación de mTOR (Inoki *et al.*, 2006).

3.1.2.2 Degradación de proteínas en músculo esquelético

El sistema ubiquitina-proteasoma y el sistema autofagia-lisosoma constituyen las dos vías más importantes implicadas en la degradación de proteínas en músculo esquelético (Sandri, 2013). En condiciones fisiológicas, estas maquinarias tienen un papel esencial en el mantenimiento de la homeostasis al procurar el equilibrio del recambio proteico. Los problemas aparecen cuando por diversas razones, generalmente patológicas, se produce un incremento en su actividad que no se ve contrarrestado por los mecanismos de síntesis de proteínas descritos anteriormente. En este caso, se origina un desequilibrio en el recambio proteico y aparece la atrofia muscular en sus distintos grados.

En las siguientes páginas estudiaremos el funcionamiento de ambos sistemas de degradación y su regulación, principalmente a través de los factores de transcripción FoxO.

- El sistema ubiquitina-proteasoma

En este sistema, las proteínas que se van a degradar por la actuación del proteasoma 26S son marcadas previamente por la unión covalente de una cadena de moléculas de ubiquitina. Las ligasas de ubiquitina, o ligasas E3, se unen a la proteína diana y catalizan el movimiento de las moléculas de ubiquitina desde las enzimas E2 (proteínas transportadoras de ubiquitina) a su sustrato. Este es el principal punto regulador del proceso ya que las proteínas así marcadas son acopladas al proteasoma 26S para su degradación (Lilienbaum, 2013), a no ser que la cadena de poliubiquitina sea retirada por las llamadas desubiquitininasas (Wing, 2013) (Figura 3.7).

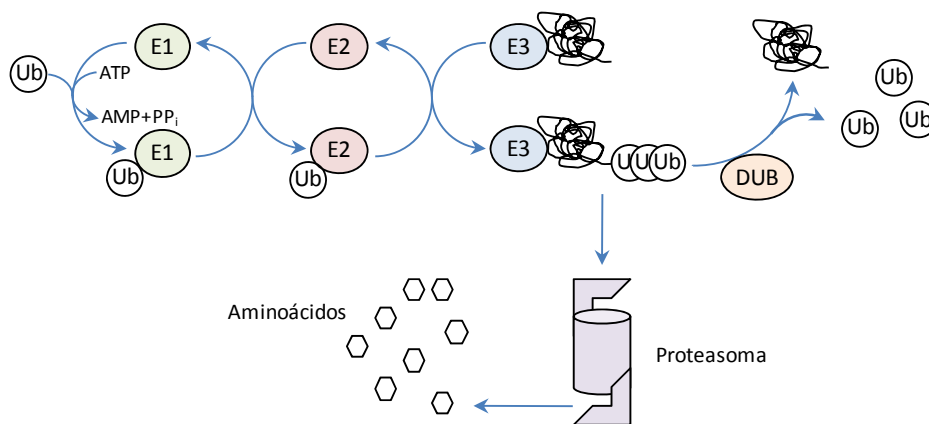


Figura 3.7. Esquema del funcionamiento del sistema ubiquitina-proteasoma. DUB, desubiquitininasas; E1, E2 y E3, ligasas de ubiquitina; Ub, ubiquitina.

Entre las múltiples ligasas E3 existentes, son dos las que presentan una mayor expresión cuando se produce atrofia muscular: Atrogin-1 y MuRF1 (*muscle-specific RING finger protein 1*) (Bodine *et al.*, 2001). Los genes que codifican para este tipo de proteínas relacionadas con la atrofia muscular son denominados genéricamente en inglés *atrogenes*.

Atrogin-1 cataliza la degradación del factor de transcripción miogénico MyoD y del factor de inicio de la traducción eIF3f (Lagirand-Cantaloube *et al.*, 2008; Tintignac *et al.*, 2005). El resultado de su acción es una inhibición de los procesos de transcripción y traducción de determinados genes en músculo y la imposibilidad de reponer las proteínas degradadas. Aunque este es su efecto principal, también se ha observado que atrogin-1 tiene como sustrato proteínas sarcoméricas, enzimas, otros factores de transcripción y elementos del espliceosoma (Lokireddy *et al.*, 2012).

Por otra parte, MLC1/2 (*myosin light chain*) y MyBP-C (*myosin-binding protein C*) se encuentran en los filamentos gruesos de las miofibrillas musculares. Estas proteínas tienen una función estabilizadora de la estructura del músculo y pueden ser marcadas con moléculas de ubiquitina por MuRF1 y degradadas a continuación. Si esta situación se mantiene en el tiempo, las miofibrillas pierden progresivamente su estructura y MuRF1 puede ubiquitinar a MyHC (*myosin heavy chain*) (Cohen *et al.*, 2009).

- El sistema autofagia-lisosoma

La autofagia participa en la renovación de los orgánulos y el recambio de las proteínas de vida media larga, así como en la eliminación de componentes dañados y la degradación de material celular para proporcionar una fuente de energía durante periodos de ayuno y estrés (Klionsky y Codogno, 2013). Fallos en este sistema pueden llevar a situaciones de atrofia muscular.

Existen tres tipos de autofagia: microautofagia, autofagia mediada por chaperonas y macroautofagia. La mayoría de la información que se posee de este proceso en músculo en relación a la degradación de proteínas se refiere a macroautofagia. Para simplificar, de ahora en adelante cuando hablemos de autofagia nos estaremos refiriendo a este último tipo.

Este proceso comienza con la prolongación de membranas especializadas del retículo endoplásmico (fagoforo) que envuelven parte del citoplasma y orgánulos. Al entrar en contacto sus extremos y fusionarse, forman una vesícula de doble membrana llamada autofagosoma. La membrana externa del autofagosoma se fusiona con el lisosoma originando el denominado autolisosoma y los materiales incluidos en el interior de aquel son degradados por hidrolasas lisosomales (Mizushima, 2011) (Figura 3.8).

El fenómeno que acabamos de describir es realmente complejo a nivel molecular y en él participan numerosas proteínas (*Atg proteins*) de entre las cuales destacaremos Atg8 (*autophagy-related protein 8*) de levaduras y su homólogo de mamíferos LC3 (*microtubule-associated protein 1 light chain 3*) que está presente tanto en el fagoforo como en el autofagosoma, lo que permite hacer un seguimiento del proceso de autofagia en el tiempo.

LC3 tiene la capacidad de reclutar una serie de proteínas adaptadoras entre las que destaca p62/SQSTM1 (*sequestosome 1*) que es degradada específicamente por autofagia y actúa como receptor de carga de sustratos ubiquitinados de modo que estos también son degradados por autofagia de forma selectiva (Johansen y Lamark, 2011).

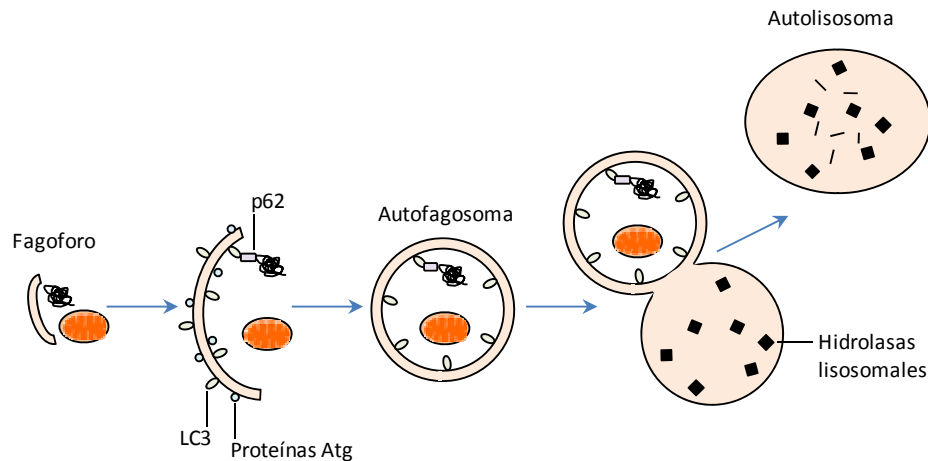


Figura 3.8. Esquema del proceso de autofagia.

Una completa revisión sobre el papel de las proteínas Atg se puede encontrar en Mizushima *et al.* (2011).

- Los factores de transcripción FoxO regulan la degradación de proteínas

La familia de factores de transcripción FoxO activa de forma coordinada la degradación de proteínas tanto a través del proteasoma como por autofagia (Zhao *et al.*, 2007). De hecho, parece ser que su participación es imprescindible para que estas vías funcionen.

Por un lado, FoxO1 y 3 son necesarios para la transcripción de los genes de las ligasas E3 atrogin-1 y MuRF1 del sistema ubiquitina-proteasoma (Mammucari *et al.*, 2007; Waddell *et al.*, 2008). Por otro lado, FoxO3 incrementa la transcripción de numerosos genes relacionados con la autofagia entre los que se encuentra el gen codificante para LC3 (Zhao *et al.*, 2008).

Para concluir, diremos que existen diversos elementos que participan en la regulación de la síntesis de proteínas y que también tienen un papel relevante en la degradación. De entre ellos queremos destacar dos: Akt y AMPK (ver Figura 3.9).

Como ya dijimos en su momento, Akt fosforila y activa mTOR que es el principal elemento regulador de las rutas de síntesis de proteínas; pero además, Akt puede fosforilar a FoxO dando lugar a su inhibición ya que la fosforilación de FoxO provoca su exclusión del núcleo y su retención en el citoplasma por proteínas 14-3-3 (Brunet *et al.*, 1999). De esta manera FoxO no puede llevar a cabo su papel como factor de transcripción.

Por su parte, AMPK que ya vimos que inhibía la síntesis de proteínas por activación del complejo TSC, también fosforila a FoxO dando lugar en esta ocasión a su activación (Greer *et al.*, 2007) y desencadenando todos los procesos descritos anteriormente que favorecen la degradación de proteínas.

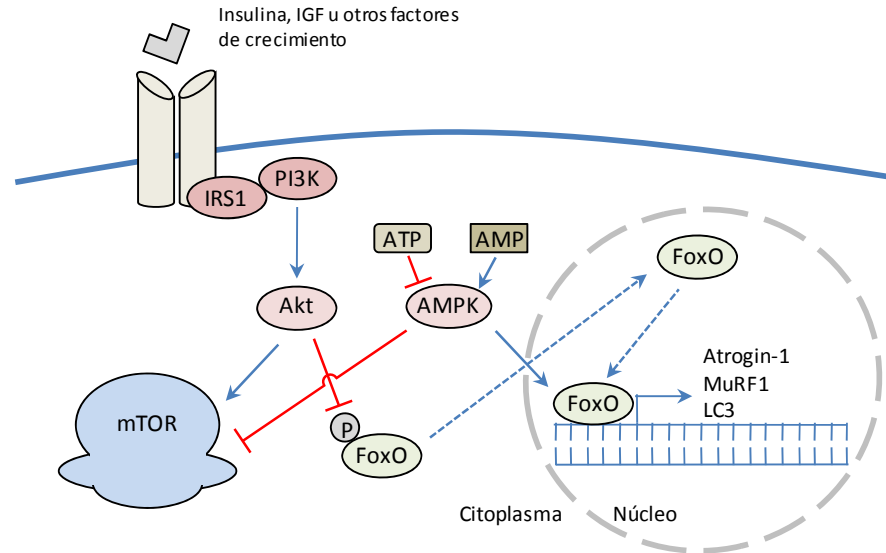


Figura 3.9. FoxO activa la transcripción de genes implicados en la degradación de proteínas. Akt y AMPK pueden fosforilar a los mismos sustratos (mTOR y FoxO), pero sus efectos son antagónicos. Las flechas discontinuas indican movimientos intracelulares. Akt, *RAC-alpha serine/threonine-protein kinase*; AMPK, *AMP dependent protein kinase*; FoxO, *forkhead box protein O*; IRS, *insulin receptor substrate*; mTOR, *mechanistic target of rapamycin*; PI3K, *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase*.

3.2 Neurogénesis y neuroprotección

3.2.1 Neurogénesis

Hasta finales del siglo pasado, la idea de que el sistema nervioso central carecía de la capacidad para la formación de nuevas células nerviosas era mayoritariamente aceptada por la comunidad científica. En este sentido se pensaba que la especialización extrema de las funciones cerebrales en mamíferos era incompatible con la generación de nuevas neuronas en el cerebro adulto. A día de hoy, sin embargo, se conoce que sí existe una producción, aunque limitada, de nuevas neuronas en el sistema nervioso central de vertebrados superiores. Este fenómeno se denomina neurogénesis (Gage y Temple, 2013).

Los primeros experimentos que pusieron de manifiesto la existencia de la neurogénesis fueron realizados por Altman (1962) y en ellos demostraba que células del giro dentado del hipocampo podían incorporar timidina radiactiva, señal de que existía una división celular. Se puede decir que estos resultados fueron ignorados, cuando no duramente criticados, hasta la década de los noventa cuando nuevos experimentos pusieron de manifiesto la existencia de células madre neuronales (Palmer *et al.*, 1995; Palmer *et al.*, 1997; Reynolds y Weiss, 1992). Estas son células que pueden producir nuevas células madre o generar las distintas poblaciones celulares del sistema nervioso: neuronas, oligodendrocitos y glía (Colucci-D'Amato *et al.*, 2006).

En mamíferos, la neurogénesis en adultos se produce fundamentalmente en dos regiones del cerebro: la zona subgranular del giro dentado del hipocampo (Kokoeva *et al.*, 2005) y en la zona subventricular de los ventrículos laterales (Gritti *et al.*, 2002). En ambas localizaciones se generan neuroblastos precursores con capacidad de diferenciación. Este proceso se lleva a cabo en el propio giro dentado en el primer caso y en el bulbo olfatorio en el segundo tras un proceso de migración denominado corriente migratoria rostral. En humanos no se observa la formación de nuevas neuronas en el bulbo olfatorio, quizás debido al menor desarrollo de esa zona del cerebro en comparación con los animales, pero sí en otras regiones como el cuerpo estriado (Ernst *et al.*, 2014).

Todos estos procesos de formación, diferenciación y movilización tienen un alto nivel de regulación y modulación a través de una serie de programas intrínsecos y factores extrínsecos. Una completa revisión sobre este tema se puede encontrar en Lledo *et al.* (2006).

Por otra parte, se conocen o se han sintetizado una serie de compuestos que, adicionados a los medios de cultivo, permiten diferenciar los neuroblastos cultivados en el laboratorio en los distintos linajes celulares. De esta manera se pueden obtener neuronas de tipo dopaminérgico, GABAérgico, glutamatérgico, etc. En la Figura 3.10 se muestra un esquema con los diversos compuestos que se emplean para llevar a cabo la diferenciación así como los marcadores moleculares de diferenciación de cada tipo neuronal.

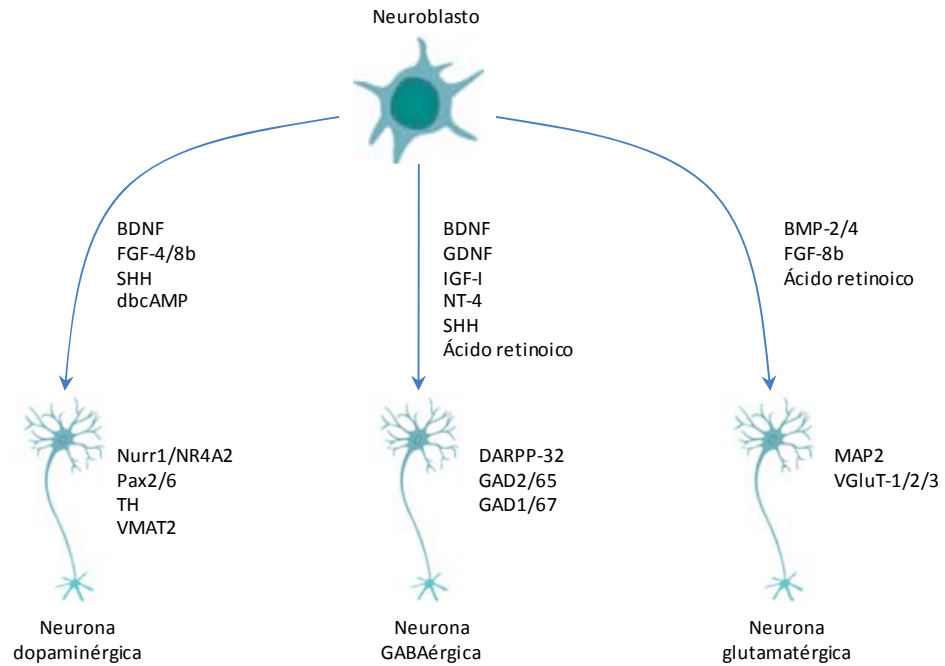


Figura 3.10. Los neuroblastos se pueden diferenciar en distintos tipos de neuronas en función de los componentes del medio de cultivo. Junto a las flechas se indican los componentes que se adicionan al medio en función del linaje celular deseado y junto a la representación de la neurona se indican los distintos marcadores moleculares de diferenciación neuronal. BDNF, *brain-derived neurotrophic factor*; BMP, *bone morphogenetic protein*; DARPP, *dopamine and cAMP regulated neuronal phosphoprotein*; dbcAMP, *dibutyrylcAMP*; FGF, *fibroblast growth factor*; GAD, *glutamate decarboxylase*; GDNF, *glial cell line-derived neurotrophic factor*; IGF, *insulin-like growth factor*; MAP, *microtubule-associated protein*; Nurr1/NR4A2, *nuclear receptor subfamily 4 group A member 2*; NT, *neurotrophin*; Pax, *paired box protein*; SHH, *Sonic hedgehog protein*; TH, *tyrosine hydroxylase*; VGluT, *vesicular glutamate transporter*; VMAT, *vesicular monoamine transporter*.

3.2.2 Estrés oxidativo, enfermedades neurodegenerativas y neuroprotección

El oxígeno es uno de los elementos más abundantes en la Tierra y es esencial para la producción de energía por parte de los organismos aerobios. Sin embargo, es el uso del oxígeno como último aceptor de electrones en la cadena respiratoria una de las principales causas por las que se forman especies reactivas de oxígeno (ROS) en la célula que pueden dañar a estos mismos organismos. Para hacer frente a esta toxicidad, los seres aerobios han desarrollado sistemas antioxidantes.

El estrés oxidativo se presenta cuando hay un desequilibrio entre las ROS y los sistemas antioxidantes en favor de las primeras y está relacionado con la etiología de diversas enfermedades neurodegenerativas y el cáncer.

Diversos estudios ponen de manifiesto que las modificaciones sufridas por macromoléculas como los lípidos, las proteínas y el DNA por la acción de las ROS contribuyen al desarrollo de estas enfermedades (Thanan *et al.*, 2015). Además, en los últimos años también se ha comprobado que el estrés oxidativo puede causar apoptosis y esta, a su vez, parece jugar un papel relevante en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Radi *et al.*, 2014).

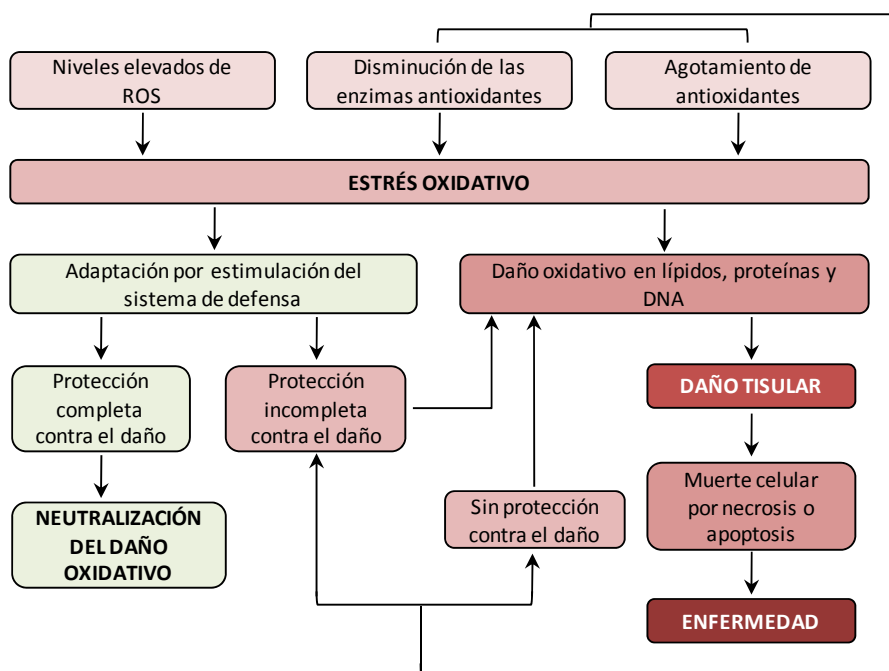


Figura 3.11. Causas y consecuencias del estrés oxidativo en el organismo. Si la agresión de los agentes oxidantes es contrarrestada efectivamente por los agentes antioxidantes, entonces es posible mantener la homeostasis. De lo contrario, se produce un daño en macromoléculas que da lugar a una disfunción del tejido originando la enfermedad.

3.2.2.1 Estrés oxidativo

- Estrés oxidativo y daño en macromoléculas

+ Lípidos: peroxidación

La peroxidación lipídica es una compleja reacción de las ROS sobre los ácidos grasos poliinsaturados que están conjugados con el glicerol de los fosfolípidos de la bicapa lipídica de las membranas biológicas.

Con el ataque de un radical libre de oxígeno sobre los hidrógenos de los grupos metileno de los ácidos grasos poliinsaturados se inicia una reacción en cadena en la que se forman, en primer lugar, intermediarios inestables que pueden llevar a la pérdida de la estabilidad y de las propiedades de la membrana y, posteriormente, productos finales de reacción que pueden interactuar con otras moléculas y causar daños en proteínas y DNA (Reed, 2011).

Los productos finales de la reacción son aldehídos electrofílicos altamente reactivos entre los que destacan la acroleína, su derivado malondialdehído y sobre todo el 4-hidroxi-2-nonenal (HNE). Estos aldehídos tienen la capacidad de unirse covalentemente a proteínas formando aductos estables con los residuos de cisteína, lisina, e histidina a través de una adición de Michael (Esterbauer *et al.*, 1991).

El cerebro, al ser rico en ácidos grasos poliinsaturados y presentar concentraciones de oxígeno del orden de milimolar en sus membranas, reúne todos los ingredientes necesarios para que se produzca la peroxidación lipídica (Subczynski y Hyde, 1983). Varias sustancias antioxidantes junto a diversas enzimas (ver 3.2.2.4) hacen que los productos de la peroxidación lipídica disminuyan significativamente (Kuiper *et al.*, 2011; Montine *et al.*, 2003; Subramaniam *et al.*, 1997).

Cuando los mecanismos de defensa fallan, se produce un daño que, si se prolonga en el tiempo, se asocia a la aparición de enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer (Subbarao *et al.*, 1990), Parkinson (Dexter *et al.*, 1994), esclerosis lateral amiotrófica (Ferrante *et al.*, 1997) y enfermedad de Huntington (Browne *et al.*, 1999).

+ Proteínas

Las modificaciones de proteínas por oxidación pueden ser inducidas de forma directa por la reacción con las ROS o de forma indirecta por la reacción con productos secundarios del estrés oxidativo como HNE (Berlett y Stadtman, 1997).

Los residuos de cisteína y metionina son particularmente propensos a sufrir el ataque directo de las ROS sobre los radicales sulfhidrilos para originar radicales sulfóxido.

Si el estrés oxidativo es severo o se mantiene en el tiempo, entonces se originan proteínas carboniladas. Los mecanismos por los que se generan son diversos:

- a) Oxidación directa de las cadenas laterales de los restos de prolina, arginina, lisina y treonina para originar aldehídos o cetonas (Berlett y Stadtman, 1997).
- b) Rotura oxidativa de la proteína vía α -amidación u oxidación de las cadenas laterales de restos de glutamina (Berlett y Stadtman, 1997).
- c) Reacción con productos generados durante la peroxidación lipídica (HNE, malondialdehído, acroleína) por adición de Michael (Sayre *et al.*, 2006).
- d) Reacción del grupo amino de los residuos de lisina con azúcares reducidos o por la oxidación de sus productos de reacción (glicación) (Stadtman y Levine, 2003).

A modo de apunte diremos que las proteínas carboniladas se consideran un mejor marcador de estrés oxidativo que los productos de la peroxidación lipídica porque son estables y permanecen circulando en sangre durante más tiempo (Pantke *et al.*, 1999).

Las proteínas oxidadas son, en definitiva, proteínas que han sufrido modificaciones en su estructura. Dichas modificaciones pueden dar lugar a una alteración o pérdida de su función y, en consecuencia, dañadas deben ser degradadas.

Se sabe que el proteasoma es el principal encargado de eliminar las proteínas oxidadas (Breusing y Grune, 2008). Cuando el nivel de oxidación es muy elevado tienden a formar agregados como resultado de la formación de nuevas uniones covalentes, interacciones hidrofóbicas y puentes disulfuro. Estos agregados ya no pueden ser degradados por el proteasoma (Grune *et al.*, 2004) y en condiciones normales son retirados por la vía de la autofagia (Knaevelsrud y Simonsen, 2010). Si por alguna razón fisiopatológica esto no es posible, con el paso del tiempo el material se acumula en el interior de la célula y da lugar a una inhibición del proteasoma que no podrá ejercer su función habitual y degradar otros tipos de proteínas (Keck *et al.*, 2003). Los agregados iniciales pueden seguir sufriendo nuevas oxidaciones lo que potencia la formación de nuevos agregados de mayor peso molecular e insolubilidad (Grune *et al.*, 2004). A todo lo dicho debemos añadir que el proteasoma se inhibe en presencia de cantidades elevadas de ROS (Reinheckel *et al.*, 1998).

+ DNA

La exposición crónica de la célula al estrés oxidativo puede dar lugar a cambios permanentes en el genoma (Cooke *et al.*, 2003). La acumulación de lesiones oxidativas del DNA puede inducir la mutagénesis, la pérdida de la homeostasis y la aparición de enfermedades.

Aunque son numerosos los tipos de lesiones que se pueden producir en el DNA por daño oxidativo (modificaciones en las bases y/o los azúcares, formación de aductos, rotura de una o dos hebras), resulta de especial interés la modificación de bases y especialmente la formación de 8-oxo-2'-desoxiguanosina (8-oxodG) por interacción de las bases de guanina con radicales hidroxilo (Sedelnikova *et al.*, 2010). Dicha base modificada se encuentra en equilibrio tautomérico con 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG). En la literatura científica ambas nomenclaturas se usan indistintamente para el mismo compuesto (Valavanidis *et al.*, 2009).

Diversos experimentos han demostrado el potencial mutagénico de 8-OHdG por una pérdida de especificidad de apareamiento de bases, la inserción de un nucleótido de adenina frente a la lesión y el cambio de nucleótidos GC por TA (Cheng *et al.*, 1992; Valavanidis *et al.*, 2009).

La determinación y el análisis de 8-OHdG se puede realizar en muestras biológicas (orina, tejidos, DNA leucocitario) y constituye un valioso marcador de daño por estrés oxidativo (Lin *et al.*, 2004).

3.2.2.2 Estrés oxidativo y apoptosis

La apoptosis es un tipo de muerte celular regulada por una serie de complejas rutas de señalización. Juega un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis de los distintos tejidos y durante el desarrollo embrionario. Una completa revisión de este proceso se puede encontrar en Elmore (2007). En este apartado nos centraremos en cómo influyen las ROS sobre la apoptosis.

- ASK1

Dentro de la compleja cascada de señales que regulan la apoptosis se encuentra ASK1 (*apoptosis signal-regulating kinase 1*), una proteína perteneciente a la familia de las MAP3K que se comporta como un sensor redox y puede determinar el grado y duración del estrés oxidativo de manera que, si son excesivos, se activarán los mecanismos celulares necesarios para desencadenar la apoptosis (Shiizaki *et al.*, 2013).

ASK1 forma homo-oligómeros por interacción de dos monómeros por su extremo carboxilo (Noguchi *et al.*, 2005). En condiciones basales, se une Trx (*thioredoxin*) al extremo amino de ASK1 e impide su activación (Fujino *et al.*, 2007). La proteína Trx presenta dos restos de cisteína próximos entre sí (C32 y C35) que en presencia de ROS se oxidan y forman un puente disulfuro. Cuando esto ocurre, Trx se separa de ASK1 permitiendo la interacción de los monómeros también por su extremo amino. Este proceso es facilitado por las proteínas TRAF2/6 (*tumor necrosis factor receptor-associated factor*). En estas condiciones se produce la autofosforilación de ASK1 en T838 dando lugar a la forma activa de la proteína (Tobiume *et al.*, 2002).

- JNK

En la situación descrita en el apartado anterior en que se ha formado el heterodímero activo ASK1, se activan a su vez una serie de MAPK que acaban fosforilando a JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) que tiene la capacidad de inducir la apoptosis a través de dos mecanismos:

- a) Un mecanismo directo por modulación mediante fosforilación de la actividad de proteínas antiapoptóticas como Bcl2 (Yamamoto *et al.*, 1999) y proapoptóticas como BID (*BH3-interacting domain death agonist*) (Prakasam *et al.*, 2014), BIM, BAD (*Bcl2-associated agonist of celldeath*) y BMF (*Bcl-2-modifying factor*) (Lei y Davis, 2003).
- b) Un mecanismo indirecto por translocación de JNK al núcleo y activación por fosforilación de c-Jun para permitir su dimerización con c-Fos dando lugar al factor de transcripción AP-1 que induce la transcripción de genes que codifican proteínas proapoptóticas como TNF α (*tumor necrosis factor α*), Fas-L (*Fas Ligand*) y Bak (*Bcl-2 homologous antagonist/killer*).

3.2.2.3 Enfermedades neurodegenerativas

- Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer es la enfermedad neurodegenerativa más común ya que afecta al 1-2% de la población mayor de sesenta y cinco años y hasta el 50% de los sujetos mayores de ochenta y cinco. Además, es la causa más común de demencia (60-80% de los casos) (Espinete *et al.*, 2015).

Esta enfermedad se caracteriza por la degeneración progresiva y masiva de neuronas y sinapsis en zonas específicas del cerebro como el hipocampo y la corteza que, en última instancia, dan lugar al deterioro cognitivo y a la pérdida de la memoria.

A nivel histológico, la enfermedad se caracteriza por la aparición de las placas seniles formadas por agregados de péptido β -amiloide y los ovillos neurofibrilares constituidos por proteína tau hiperfosforilada (Metsaars *et al.*, 2003).

El péptido β -amiloide favorece la conjugación de HNE con el transportador de glutamato impidiendo la retirada del neurotransmisor de la hendidura sináptica lo cual tiene un efecto neurotóxico que se relaciona con la aparición de la enfermedad de Alzheimer (Lauderback *et al.*, 2001).

La proteína tau actúa estabilizando los microtúbulos. Una vez que se hiperfosforila ya no puede sostener el ensamblaje de los microtúbulos dando lugar a la desintegración de la estructura y finalmente a la muerte celular. La acroleína parece jugar un papel relevante en la inactivación de la proteína tau (Kuhla *et al.*, 2007).

Además, se han observado niveles elevados de proteínas carboniladas en las cortezas frontal y parietal así como el hipocampo, pero no en el cerebelo donde la enfermedad de Alzheimer no se manifiesta (Ansari y Scheff, 2010).

Por otra parte, UCH-L1 (*ubiquitin carboxyl terminal hydrolase L1*) es una enzima que hidroliza cadenas de poliubiquitina para generar monómeros de ubiquitina. En condiciones de estrés oxidativo, UCH-L1 es modificada por oxidación y su actividad es inhibida. De este modo disminuyen las unidades de ubiquitina disponibles para marcar proteínas que deben ser degradadas por el proteasoma, de manera que no se degradan y, en consecuencia, se favorece la formación de agregados (Choi *et al.*, 2004).

Finalmente, la determinación de 8-OHdG en el líquido cefalorraquídeo y en los cerebros de sujetos que sufrieron la enfermedad arrojó valores más altos que en los correspondientes controles (Lovell *et al.*, 1999; Mecocci *et al.*, 1994).

- Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente. Se caracteriza por una disminución en la función motora en forma de temblor en reposo, rigidez muscular, acinesia y bradicinesia.

Esta enfermedad se atribuye a la formación de agregados de α -sinucleína, una proteína que participa en la función mitocondrial y en la formación de las vesículas sinápticas (Bonini y Giasson, 2005; Chinta *et al.*, 2010). Dichos agregados son el principal componente de los cuerpos de Lewy que se localizan principalmente en el putamen y la sustancia negra; ambas regiones relacionadas con el movimiento. Además, la dopamina, el principal neurotransmisor implicado en la función motora, disminuye radicalmente en las neuronas.

Por una parte, la acroleína puede modificar la α -sinucleína en neuronas dopaminérgicas originando una disfunción mitocondrial (Shamoto-Nagai *et al.*, 2007). Por otra parte, se ha observado la formación de aductos de HNE y malondialdehído en los cuerpos de Lewy (Dalfó y Ferrer, 2008). También se ha comprobado que HNE altera el transporte de dopamina (Morel *et al.*, 1998).

Además, se han encontrado niveles de malondialdehído hasta diez veces mayores en la sustancia negra de cerebros *post mortem* de pacientes con enfermedad de Parkinson que en otras regiones del cerebro y en los correspondientes controles (Dexter *et al.*, 1989).

En relación a las proteínas carboniladas, se ha comprobado que sus niveles son superiores en los cerebros de enfermos de Parkinson que en los de individuos sanos (Alam *et al.*, 1997a), pero aparecen en las regiones afectadas por la enfermedad y también en otras. Puesto que la mayoría de los pacientes son tratados con L-DOPA se ha propuesto que esta contribuye al proceso de carbonilación dado que ha mostrado tener propiedades prooxidantes *in vitro* (Ogata *et al.*, 2005).

Lo referido en el apartado anterior a la oxidación de UCH-L1 y la disminución de monómeros de ubiquitina disponibles para el marcaje de proteínas que deben ser degradadas también es aplicable a la enfermedad de Parkinson y la formación de agregados de proteínas.

Por último, diremos que los niveles de 8-OHdG en diversas zonas del cerebro de individuos que padecían la enfermedad se encontraban elevados respecto a los sujetos control, especialmente en la sustancia negra (Alam *et al.*, 1997b). Otros estudios pusieron de manifiesto un incremento similar en el líquido cefalorraquídeo (Isobe *et al.*, 2010).

- Enfermedad de Huntington

La enfermedad de Huntington se produce por un número anormalmente alto de repeticiones de glutamina en la proteína huntingtina. Mientras que en los individuos sanos se encuentran entre seis y treinta y una repeticiones, los enfermos cuentan con entre treinta y seis y ochenta y dos repeticiones. Esta proteína parece estar involucrada en la señalización celular y el transporte vesicular (Truant *et al.*, 2006). Los individuos que padecen esta enfermedad suelen presentar cambios de comportamiento en un principio y más adelante movimientos anormales y demencia que empeora lentamente.

Se han observado incrementos significativos de HNE en zonas del cerebro con inclusiones de huntingtina (Sorolla *et al.*, 2008) así como niveles elevados de malondialdehído (Browne *et al.*, 1999). Por su parte, los niveles de proteínas carboniladas y de 8-OHdG se encuentran elevados en plasma (Mitsumoto *et al.*, 2008; Tunez *et al.*, 2011).

- Esclerosis lateral amiotrófica (ELA)

La ELA es una enfermedad neurodegenerativa crónica y progresiva en la que las neuronas motoras van muriendo dando lugar a debilidad muscular, atrofia y espasticidad (Cleveland y Rothstein, 2001). Finalmente, se origina una pérdida total de los movimientos voluntarios en un periodo de uno a cinco años.

Existen dos variantes: hereditaria y esporádica. El primer grupo constituye aproximadamente el 10% de los enfermos. De ellos, uno de cada cinco presenta una mutación en la secuencia codificante de la superóxido dismutasa que reduce su capacidad para eliminar radicales libres lo que favorece la peroxidación lipídica (Gurney *et al.*, 1994).

Sorprendentemente, los niveles de proteínas carboniladas en plasma no difieren entre individuos con la enfermedad e individuos sanos, pero sí se ha encontrado una mayor concentración de 8-OHdG en orina (Mitsumoto *et al.*, 2008).

3.2.2.4 Sistemas de defensa frente al estrés oxidativo

Como hemos podido ver, son numerosos los efectos negativos del estrés oxidativo sobre el organismo en general y sobre el cerebro en particular. En condiciones fisiológicas, para evitar dichos efectos nocivos, los seres vivos han desarrollado diversas estrategias como la prevención del daño, los mecanismos de reparación y los sistemas de defensa antioxidante. Estos últimos están constituidos por una red de moléculas, tanto de tipo enzimático como no enzimático, que se distribuyen entre el citoplasma y diversos orgánulos (Durackova, 2010).

En los eucariotas, encontramos un primer grupo de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa, catalasa, glutatión reductasa y diversas peroxidasas que catalizan una compleja cascada de reacciones que convierten los radicales libres de oxígeno en moléculas más estables como H_2O y O_2 .

Existe un segundo grupo de enzimas que participan junto a determinadas sustancias antioxidantes de bajo peso molecular en una serie de reacciones de óxido-reducción cuyo producto son los cofactores que dan soporte a la actuación del primer grupo de enzimas.

Por otra parte, encontramos una serie de antioxidantes de tipo no enzimático como glutatión, NADPH, vitaminas E y C, tiorredoxina y algunos metales como selenio que actúan bloqueando directamente a los radicales libres de oxígeno (Rahal *et al.*, 2014).

En conjunto, todas estas moléculas son necesarias para el mantenimiento del equilibrio redox en el interior de la célula y evitar los efectos nocivos del estrés oxidativo (ver Figura 3.11).

4 OBJETIVOS

Las rutas de señalización Ras-Raf-MAPK/ERK y PI3K/Akt participan en importantes procesos relacionados con el mantenimiento de la homeostasis en los tejidos y la supervivencia celular. En concreto, son numerosos los estudios que demuestran que, en músculo esquelético y en cerebro, estas rutas están implicadas en procesos de diferenciación celular (miogénesis y neurogénesis), regulación del metabolismo proteico y control de la apoptosis. La alteración de estos procesos está asociada a enfermedades que acaban dando lugar a sarcopenia en el caso del músculo y trastornos neurodegenerativos en el caso del cerebro.

Por otra parte, experimentos previos realizados en nuestro laboratorio, han puesto de manifiesto que el tungstato sódico, un compuesto descrito como antidiabético oral, tiene la capacidad de incrementar los niveles de GLUT4 en miotubos L6 de rata a través de un mecanismo asociado a ERK1/2 y MEF2D (Giron *et al.*, 2008).

Tomando como punto de partida la relación existente entre el tungstato sódico, la activación de ERK1/2 y la inducción de la expresión de MEF2D, nos planteamos como objetivo general de este trabajo conocer los efectos del tungstato sódico sobre los procesos de diferenciación celular, así como evaluar sus efectos frente a situaciones de estrés que originan alteraciones en el metabolismo proteico e inducen la apoptosis.

Para ello, nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

1. **Analizar el efecto del tungstato sódico sobre la diferenciación celular.** Para ello procederemos a realizar cultivos de las líneas celulares L6 (muscular) y Neuro2a (neuronal) y estudiaremos si se producen cambios en el proceso de diferenciación al suplementar los medios de cultivo con tungstato sódico.
2. **Estudiar el efecto del tungstato sódico sobre el recambio proteico.** La activación de las rutas de ERK1/2 y Akt dan lugar a la activación de mTOR que culmina en un incremento de la síntesis de proteínas. Examinaremos la acción del tungstato sódico sobre estas quinasa en ausencia y presencia de corticoides que inducen la degradación de proteínas.
3. **Comprobar el efecto del tungstato sódico frente a la inducción de apoptosis por estrés oxidativo.** Puesto que la quinasa ERK1/2 juega un papel relevante en el control de la apoptosis mediada por estrés oxidativo, analizaremos el papel del tungstato sódico en este tipo de muerte celular.

5 MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Material

5.1.1 Instrumentación.

Para el cultivo y manipulación de bacterias se han usado los siguientes equipos:

- Campana de flujo laminar horizontal *Micro-V* de Telstar.
- Incubador Gallenkamp con termostato y agitación orbital.

Por otra parte, para el cultivo y observación de células eucariotas se emplearon los dispositivos siguientes:

- 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.
- Microscopio confocal Leica DMI 6000.
- Cámara digital refrigerada CCD Olympus XC30.

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

- Cubetas *Mini-Sub* para electroforesis horizontal de Bio-Rad.
- Transiluminador de luz ultravioleta New Brunswick Scientific.
- Termociclador Perkin-Elmer 9700.
- Sistema *MiniOpticon* para PCR a tiempo real de Bio-Rad.
- Cámara fotográfica Kodak DC-120 combinada con el *1D Image Analysis Software* de Kodak.

El análisis de proteínas procedentes de cultivos celulares se llevó a cabo con la instrumentación que se detalla a continuación:

- Cubeta para electroforesis vertical *Mini-PROTEAN Tetra Cell* de Bio-Rad.
- Dispositivo para transferencia *Trans-Blot Turbo Transfer System* de Bio-Rad.
- Sistema de detección de quimioluminiscencia *ChemiDoc-It 810 Imager* de UVP.

Otros dispositivos empleados para la obtención de datos a partir de los experimentos realizados fueron:

- Luminómetro *Sirius L Tube Luminometer* de Berthold Detection Systems.
- Contador multicanal de centelleo líquido LS 6000 de Beckman.

- Fluorímetro Shimadzu RF-5301 PC.
- Citómetro de flujo *BD FACS Calibur* de BD Biosciences.
- Secuenciador de DNA *373 Strect* de Applied Biosystems.

Finalmente, se enumeran otros aparatos de uso general en el laboratorio que fueron empleados durante el desarrollo de los experimentos que se describen más adelante:

- Autoclave Selecta.
- Estufa con termostato Memmert 500.
- Baño de agua con termostato *Precistern* de Selecta.
- Termobloque *Multiplaces* de Selecta.
- Espectrofotómetro Beckman DU 640.
- Lector de placas *Sunrise* de Tecan.
- pHmetro XS Instruments modelo pH 510.
- Centrífuga de sobremesa Eppendorf modelo 5415 D.
- Centrífuga de sobremesa refrigerada Eppendorf modelo 5415 R.
- Centrífuga de sobremesa *Heraeus Megafuge 16 R*.
- Centrífuga J2-21 de Beckman.
- Ultracentrífuga M7-80 de Beckman.
- Centrífuga con bomba de vacío *Heraeus Centrivic*.
- 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.
- 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 empleó la cepa XL1-Blue de *Escherichia coli* (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac*[F' *proABlaclqZΔM15 Tn10* (Tetr)]).

Es una cepa de uso habitual en la clonación de plásmidos recombinantes. Presenta mutaciones en los genes *endA1*, *hsdR* y *recA*. Los dos primeros codifican para endonucleasas y el tercero participa en el fenómeno de recombinación de DNA. En su conjunto, garantizan la integridad del plásmido.

Por otra parte, incluye los genes *lacIq* y $\Delta M15$ en el episoma F'. El gen $\Delta M15$ es una mutación del gen *LacZ* que hace que se exprese la enzima β -galactosidasa sin la subunidad α . Este enzima es imprescindible si se desea usar el sistema de selección por α -complementación y rastreo por color azul-blanco de los clones.

5.1.2.2 Líneas celulares eucariotas.

- L6.C11 (ECACC 92102119)

Las células L6 son mioblastos de rata que en las condiciones apropiadas de cultivo (ver 5.1.3.2), tienen la capacidad de fusionarse para formar miotubos multinucleados y fibras estriadas (Mandel y Pearson, 1974).

- Neuro2a (ATCC – CCL-131)

Son neuroblastomas procedentes de la cresta neural de ratón que tienen la capacidad de diferenciarse en neuronas en el transcurso de pocos días cuando son cultivadas en presencia de los efectores adecuados (ver 5.1.3.2) (Olmsted *et al.*, 1970).

- CHO-K1 (ATCC – CCL61)

Se trata de una línea celular epitelial de ovario de hámster muy empleada por la facilidad de cultivo y transfección (Puck *et al.*, 1958).

5.1.3 Material para el cultivo de células

5.1.3.1 Medios de cultivo para bacterias

Los medios de cultivo empleados para el crecimiento de bacterias se esterilizaron antes de su utilización por calor húmedo a 120 °C y 1 bar de presión durante treinta minutos.

El medio que se utilizó habitualmente para el crecimiento de la cepa *XL1-blue* de *E. coli* fue el medio Luria Bertani (LB) (Sambrook, 1989), cuya composición por litro es la siguiente: 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de cloruro sódico. Para la preparación de medio sólido LB se añadió a la mezcla agar bacteriológico hasta alcanzar una concentración final de 1,5% (p/v). Los distintos componentes del medio fueron proporcionados por Scharlau Microbiology y Panreac.

Además, cuando fue necesario seleccionar bacterias portadoras de genes de resistencia a antibióticos, se prepararon soluciones madre de diversos antibióticos

que posteriormente se adicionaron al medio de cultivo en una proporción 1:1000. La ampicilina (50 mg/mL, Sigma) y la kanamicina (25 mg/mL, Sigma) se prepararon en agua destilada y fueron esterilizadas por filtración; mientras que la tetraciclina (15 mg/mL, Amresco) se disolvió en metanol. En todos los casos, las soluciones se almacenaron a -20 °C.

Por último, en el proceso de preparación de células competentes (ver 5.2.1.2), fueron necesarias las soluciones que se detallan a continuación:

“Medio A”:	Medio LB.....	49 mL
	20% (p/v) glucosa	500 µL
	1M MgSO ₄	500 µL

“Solución B”: Se disuelven en Medio LB los siguientes componentes en las proporciones indicadas: 36% (v/v) glicerol, 12% (p/v) PEG 7500, 12 mM MgSO₄.

5.1.3.2 Medios de cultivo para líneas celulares eucariotas

Se empleó como medio de cultivo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado con 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomina, 2 mM L-glutamina y 10% (v/v) de suero bovino fetal. Todos estos medios y suplementos proceden de Sigma.

Para la diferenciación de los mioblastos L6 en miotubos se usó el mismo medio base, pero con una concentración de suero bovino fetal del 2% (v/v).

En el caso de la diferenciación de las células Neuro2a en neuronas, se redujo la concentración de suero bovino fetal al 0,5 % (v/v) y se añadieron los efectores que se indican en el apartado correspondiente de “Resultados”.

Para la transfección de células eucariotas se utilizó DMEM suplementado con 2mM L-glutamina y el lípido catiónico *Lipofectamine 2000* (Invitrogen).

El material fungible empleado (placas, pipetas) fue suministrado por Cultek y VWR.

5.1.4 Material para la manipulación de ácidos nucleicos

5.1.4.1 Plásmidos comerciales

- pJet 1.2/blunt de ThermoScientific

Se trata de un vector de clonación linealizado con los extremos romos que acepta insertos desde 6 bp hasta 10 Kb. Los productos de PCR con extremos romos obtenidos con polimerasas de alta fidelidad como la *Pfu* polimerasa pueden ser ligados directamente. Los fragmentos de DNA obtenidos con *Taq* polimerasa, que

incluyen un nucleótido de adenina extra en el extremo 3', requieren un tratamiento previo para la eliminación de dicho nucleótido.

El vector incluye la secuencia de un gen letal para las bacterias que es interrumpido por la ligación del inserto de DNA en el sitio de clonación. De esta manera, solo las bacterias con el plásmido recombinante podrán multiplicarse.

Otro elemento de interés que incluye el vector es la secuencia del gen *bla*(Ap^R) que codifica para la β -lactamasa y confiere resistencia a ampicilina.

Un esquema de la estructura del vector se puede ver en la Figura 5.1.

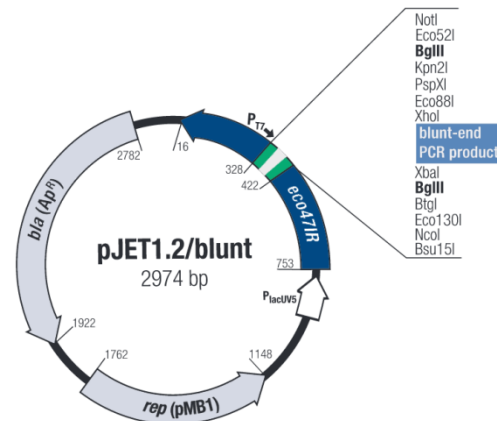


Figura 5.1. pJET1.2/blunt. En la figura se pueden apreciar las enzimas de restricción que pueden cortar en el sitio múltiple de clonación.

- pEGFP-N2 de Clontech

Es una de las tres variantes en función de la pauta de lectura del vector pEGFP-N. Estos vectores permiten la expresión de fragmentos de DNA en células de mamífero fusionados en el extremo amino de la proteína fluorescente verde. La expresión de la proteína está bajo el control de un promotor de citomegalovirus que permite su expresión constitutiva en células eucariotas de mamíferos. Además, en el extremo 3' se incluyen secuencias de poliadenilación de SV-40 que promueven el adecuado procesamiento del mRNA. Por último, decir que el vector incluye genes de resistencia a kanamicina y neomicina (ver Figura 5.2).

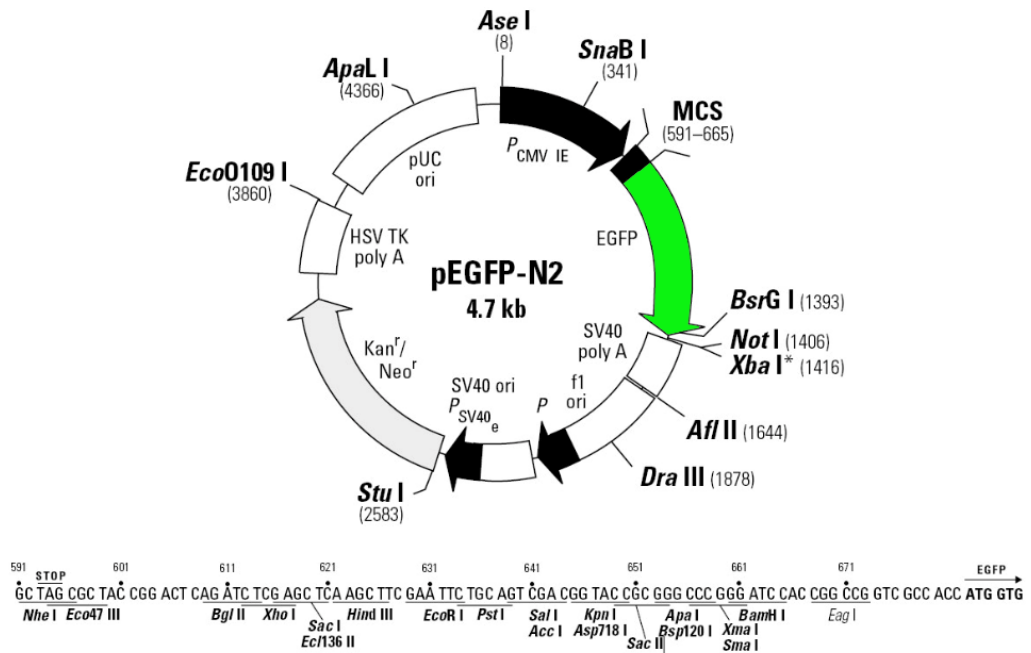


Figura 5.2. pEGFP-N2. Se incluyen los enzimas de restricción del sitio múltiple de clonación.

- pGL3-Basic, pGL3-Control y pRL-TK de Promega

El vector reportero pGL3-Basic permite analizar de forma cuantitativa regiones de DNA que potencialmente puedan regular la expresión génica. Este vector contiene el sitio múltiple de clonación delante del gen de la luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*), de forma que la expresión de la luciferasa estará regulada por la región promotora clonada en dicho sitio. La familia de vectores pGL3 presenta en 3' secuencias potenciadoras de SV-40 para favorecer la transcripción de la luciferasa, mientras que el vector pGL3-Basic carece de ellas.

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

Para normalizar la eficiencia de transfección de los derivados de pGL3-basic se ha utilizado el vector pRL-TK. Este vector codifica para una luciferasa de *Renilla* (*Renilla reniformis*) bajo el control del promotor de la timidina quinasa del virus *Herpes simplex* (HSV-TK). Este promotor produce un elevado nivel de expresión de la luciferasa de *Renilla*, que se caracteriza por poder ser medida de una forma independiente a la luciferasa de luciérnaga. Por tanto, este método permite la utilización de un sistema dual de ensayo en el que en un mismo cultivo celular se determinan las actividades de ambas luciferasas de manera secuencial y permite una fácil normalización de los resultados.

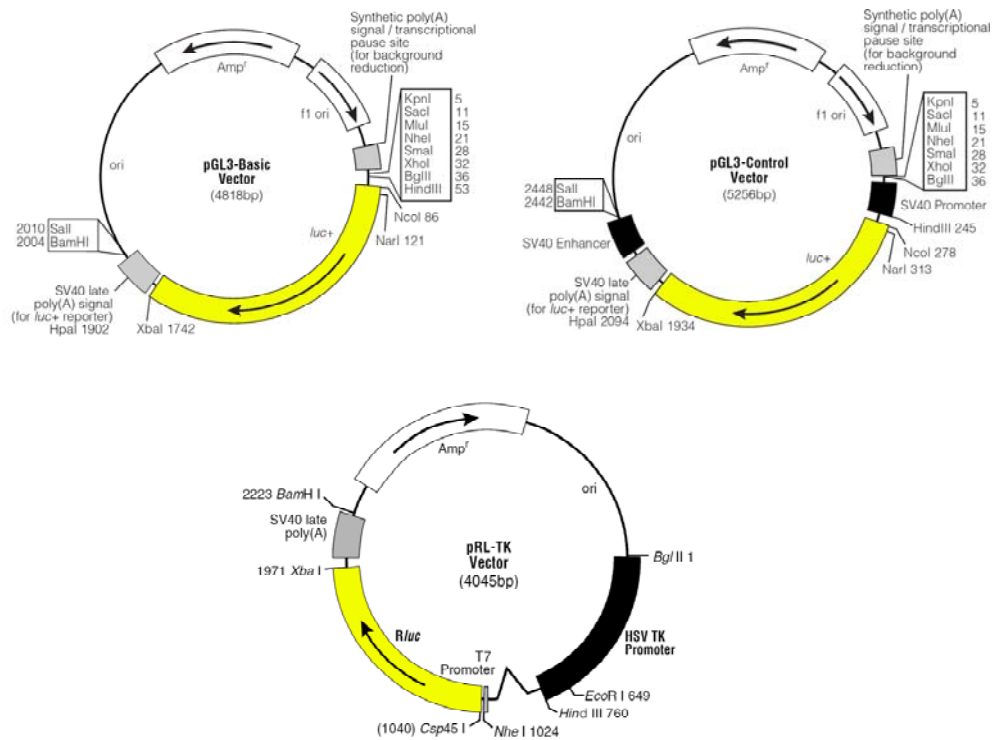


Figura 5.3. Plásmidos pGL3-Basic, pGL3-Control y pRL-TK.

- pCMV-BD y pFR-Luc

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

pCMV-BD contienen la secuencia codificante para el dominio de unión a DNA del factor de transcripción de levaduras GAL4. Fusionado a esta debe clonarse la secuencia codificante de la proteína que se desea estudiar.

Por su parte, 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*). Su expresión dependerá únicamente de los niveles de expresión de la proteína quimérica originada a partir de la secuencia clonada en pCMV-BD.

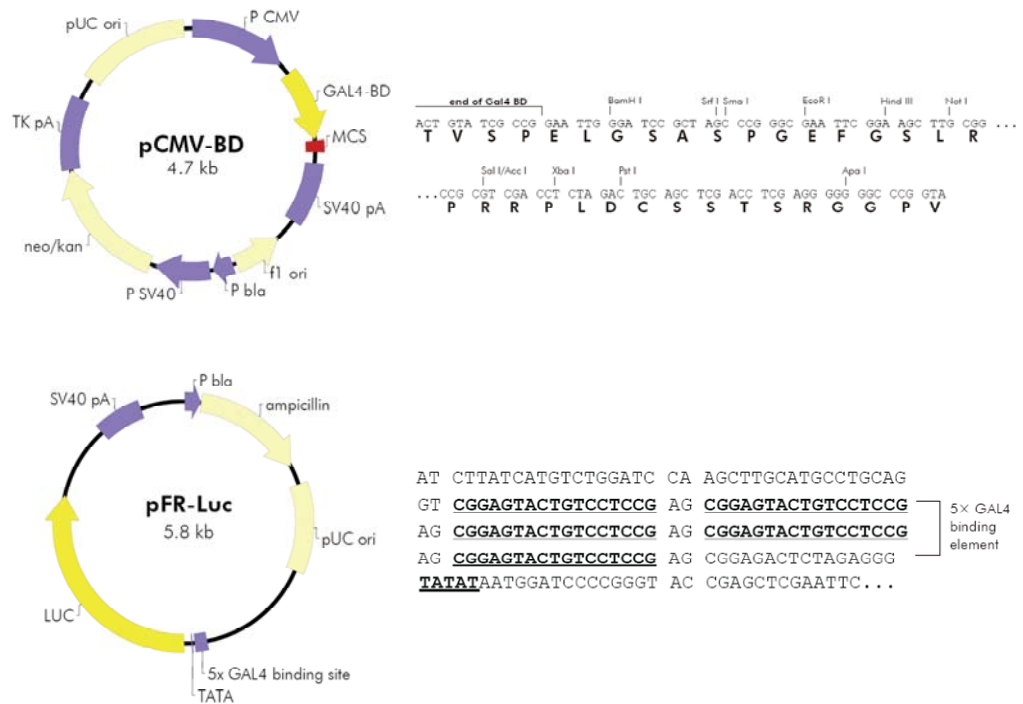


Figura 5.4. Plásmidos pCMV-BD y pFR-Luc. Junto al mapa de pCMV-BD se muestra la secuencia del sitio múltiple de clonación y junto al de pFR-Luc se encuentra la secuencia de los elementos de unión GAL4.

5.1.4.2 Construcciones realizadas en plásmidos de DNA

A continuación se detallan las distintas construcciones que se han transfectedo en células eucariotas para la realización de los experimentos de esta tesis, indicando el nombre, descripción y referencia (Tabla 5.1).

Tabla 5.1. Construcciones realizadas en plásmidos de DNA

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 este factor de transcripción.	Este laboratorio
pCMV-GAL MEF2D K439R pCMV-GAL MEF2D S444A pCMV-GAL MEF2D S444D	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
pGFP-LC3	Permite estudiar la formación de autofagosomas mediante microscopía de fluorescencia.	Kabeya <i>et al.</i> (2000)

Nombre	Descripción	Referencia
pGL3-mCK1-3	Permite estudiar la actividad del promotor de creatina quinasa y el efecto de deleciones realizadas en él (mCK2 y 3).	Este laboratorio
FHRE-Luc	Permite estudiar la actividad transcripcional mediada por Foxo3a mediante genes reporteros.	Brunet <i>et al.</i> (1999)
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.	Khiem <i>et al.</i> (2008)
pMEF2D	Expresa la forma silvestre de MEF2D	Este laboratorio
pMEF2D S121A pMEF2D S190A pMEF2D S121A/S190A	Expresa formas mutadas en los sitios de fosforilación para PKA de MEF2D. Permite estudiar actividad transcripcional mediada por MEF2D regulada por cAMP.	Este laboratorio

5.1.4.3 Oligonucleótidos.

En la tabla que se muestra a continuación (Tabla 5.2) se detallan los oligonucleótidos empleados en los experimentos de PCR a tiempo real.

Tabla 5.2. Oligonucleótidos empleados en los experimentos de qPCR

Gen	Especie	Nombre	Sentido	Secuencia 5'→3'
Actina	Ratón	FM1_Actb	Sentido	GATGTATGAAGGCTTTGGTC
		RM1_Actb	Antisentido	TGTGCACTTTTATTGGTCTC
Actina	Rata	FR1_Actb	Sentido	AAGACCTCTATGCCAACAC
		RR1_Actb	Antisentido	TGATCTTCATGGTGCTAGG
Atrogina-1	Rata	FR1_Fbxo32	Sentido	TACAACTGAACATCATGCAG
		RR1_Fbxo32	Antisentido	GTACATCTTCTTCCAATCCAG
Bnip3	Rata	FR1_Bnip3	Sentido	CTACTCTCAGCATGAGAAAC
		RR1_Bnip3	Antisentido	TCCAATGTAGATCCCCAATC
Colina O-acetil transferasa	Ratón	FM1_Chat	Sentido	TCCTCTAAAAGACTCCACC
		RM1_Chat	Antisentido	GACTTGTCATACCAACGATTC
Nurr1	Ratón	FM1_Nurr1	Sentido	CTATGGTCACAGAGAGACAC
		RM1_Nurr1	Antisentido	CAACAGTTTAGACAGGTAGTTG
MurF1	Rata	FR1_Trim63	Sentido	GCTTTGAGAACATGGACTAC
		RR1_Trim63	Antisentido	TCCTCTCAGTAAACTCCTC
Tirosina hidroxilasa	Ratón	FM1_Th	Sentido	ATGGAAATGCTGTTCTCAAC
		FM1_Th	Antisentido	GTCTCTAAGTGGTGGATTTG

5.1.4.4 Reactivos

Los siguientes reactivos fueron proporcionados por la casa comercial Thermo 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*, kit de retrotranscripción para la obtención de cDNA a partir de mRNA *Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR*.

La mezcla de oligonucleótidos, polimerasa, *SYBR Green* y tampón para las qPCR *iTaq Universal SYBR Green Supermix* procede de Bio-Rad.

Otros productos y reactivos que se emplearon para el análisis de ácidos nucleicos fueron los siguientes: acetato potásico, ácido acético, ácido clorhídrico, agarosa, alcohol isoamílico, bromuro de etidio, cloroformo, cloruro de litio, cloruro sódico, DEPC, EDTA, etanol, fenol, hidróxido sódico, Hoechst 33258, isopropanol, 2-mercaptoetanol, PEG 8000, SDS, y Tris. Todos ellos fueron proporcionados por las siguientes casas comerciales: Invitrogen, Amresco, Bio-Rad, Fluka, Lonza, Merck, Panreac, Scharlau y Sigma.

5.1.5 Material para la manipulación de proteínas

Para la electroforesis de proteínas en geles desnaturizantes de acrilamida y su tinción posterior se emplearon los siguientes reactivos: acrilamida, TEMED, persulfato amónico, SDS, Tris (Sigma), ácido clorhídrico (VWR), glicerol (Panreac), β -mercaptoetanol (Merk), azul de bromofenol (Beckman), *Coomassie Brilliant Blue G-250* (Fluka), ácido acético (Scharlau), metanol (VWR) y marcadores de peso molecular (Thermo Scientific).

En la realización de los *Western Blots* se utilizaron membranas de nitrocelulosa y PVDF (GE Healthcare), BSA, luminol, ácido p-cumárico, DMSO, Tris, glicina, metanol, NaCl, Tween-20, H₂O₂ (Sigma), ácido clorhídrico (VWR), anticuerpos anti-IgG de ratón, conejo y cabra conjugados a peroxidasa (Bio-Rad), leche desnatada en polvo y los anticuerpos que se indican en la Tabla 5.3.

En los experimentos de síntesis y degradación de proteínas se usó L-(ring-3,5-³H)-Tyr (Perkin Elmer), NaOH (Panreac), desoxicolato sódico, ácido tricloroacético, L-tirosina, BSA, dexametasona (Sigma), ácido clorhídrico (VWR) y líquido de centelleo *Ready Safe* (Beckman Coulter).

Para la determinación de la actividad promotora a través de la expresión de luciferasas 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, PMSF, fluoruro sódico, pirofosfato sódico, ortovanadato sódico, EGTA, ácido okadaico, aprotinina, leupeptina, pepstatina, cloruro potásico, HEPES y DTT.

Estos productos procedieron de las siguientes casas comerciales: Amresco, Bio-Rad, Fluka, Merck, Panreac, Scharlau y Sigma.

Tabla 5.3. Anticuerpos utilizados en la elaboración de este trabajo

Nombre	Casa comercial y referencia
4E-BP1	Cell Signaling #9452
Acetilcolinesterasa	Santa Cruz Biotechnology sc-6430
Actina	Developmental Studies Hybridoma Bank JLA20
Akt	Santa Cruz Biotechnology sc-8312
pAkt (Ser 473)	Santa Cruz Biotechnology sc-33437
Atrogina-1	Acris Antibodies AP16900PU-N
Caspasa-3	Santa Cruz Biotechnology sc-718
eIF4E	Signalway Antibody #11233-1
p-eIF4E (Ser 209)	Signalway Antibody #21226-1
ERK1/2	Santa Cruz Biotechnology sc-292838
p-ERK1/2	Santa Cruz Biotechnologysc-16982
FoxO3a	Santa Cruz Biotechnology sc-11351
p-FoxO3a (Thr32)	Santa Cruz Biotechnology sc-12357
Histona H3	Epitomics #1326-1
HPPD	Santa Cruz Biotechnology sc-98596
LC3	Nanotools 0231-100/LC3-5F10
MEF2	Santa Cruz Biotechnology sc-313
MEF2C	Santa Cruz Biotechnology sc-13266
MEF2D	BD Transduction Laboratories 610774
mTOR	Santa Cruz Biotechnology sc-8319
p-mTOR	Santa Cruz Biotechnology sc-101738
MuRF1	Santa Cruz Biotechnology sc-134397
Myf-5	Santa Cruz Biotechnology sc-302
p62/SQSTM1	Santa Cruz Biotechnology sc-25575
Pax-7	Sigma SAB2103961
S6K1	Cell Signaling #9202
p-S6K1	Cell Signaling #9205
Tuberina	Santa Cruz Biotechnology sc-893
p-Tuberina (Ser664)	Abcam ab133465

5.1.6 Aplicaciones informáticas

El desarrollo de este trabajo se ha apoyado en el uso de las siguientes aplicaciones informáticas:

- *CFX Manager* 3.1 (Bio-Rad) para la gestión de los datos obtenidos por qPCR.

- *Chromas Lite* 2.01 (Technelysium) para la lectura de los archivos procedentes de la secuenciación de fragmentos de DNA.
- *Endnote X7* (Thomsom Reuters) para la administración de las referencias bibliográficas.
- *Kodak Digital Science 1D*. Programa para el procesamiento de las imágenes de electroforesis de ácidos nucleicos obtenidas con la cámara fotográfica Kodak DC-120.
- *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.
- *LAS AF Lite* 2.6.0
- *ImageJ* 1.47 (National Institutes of Health, USA) para la cuantificación de la intensidad de las bandas de los *Western blots* y el recuento de neuritas en células diferenciadas.
- *GraphPad Prism* 5.03 (GraphPad Software) para la elaboración de las gráficas de esta memoria.

5.2 Métodos

5.2.1 Métodos de cultivo y manipulación de bacterias

5.2.1.1 Preparación de células competentes

Seguimos el procedimiento descrito por Nishimura *et al.* (1990). Se parte de 50 mL de “Medio A” (ver 5.1.3.1), del cual se reserva 1 mL para su uso posterior. Al resto se adiciona 0,5 mL de medio LB en el que se había sembrado el día anterior la cepa a partir de la cual se pretenden preparar las células competentes, en nuestro caso *XL1-Blue* de *E. coli*. A continuación se incuba a 37°C con agitación hasta alcanzar una densidad óptica de 0,6 a una longitud de onda de 600 nm. Tras incubar en hielo durante diez minutos, se centrifuga a 1.500 *xg* durante diez minutos manteniendo la temperatura a 4°C. El precipitado bacteriano se resuspende en 250 µL de “Medio A” que se reservó al comienzo y en 1,25 mL de “Solución B” (ver 5.1.3.1). La suspensión se divide en alícuotas de 100 µL y se conserva en el congelador a -80°C.

Todo el proceso se debe llevar a cabo manteniendo las bacterias en frío. Antes de su utilización, es necesario que permanezcan al menos cuatro horas a la temperatura de -80°C.

5.2.1.2 Transformación por choque térmico

Para la introducción de DNA plasmídico en las bacterias se ha seguido el método descrito por Hanahan (1983).

Las células competentes deben pasarse rápidamente de -80°C a hielo donde permanecerán hasta su completa descongelación. Acabado este proceso, se incorporan al tubo de la ligación (ver 5.2.3.5), se mezcla pipeteando suavemente y se deja en hielo durante una hora. Pasado este tiempo, se lleva a cabo el choque térmico que consiste en transferir las células competentes del hielo a un baño con una temperatura de 42°C durante dos minutos. Acto seguido se devuelve el tubo al hielo donde se incuba diez minutos. A continuación se añaden 900 µL de medio LB líquido y se incuban nuevamente, en esta ocasión, durante una hora a 37°C.

Por otra parte, se preparan placas de cultivo de bacterias con medio LB-agar y los antibióticos de selección adecuados en función de los genes de resistencia a antibióticos presentes en el plásmido que se pretende introducir en las bacterias. En las placas se siembran alícuotas de 250 µL del producto de la transformación. Dichas placas se incuban 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 procesos que se describen a continuación se llevaron a cabo en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar y usando material fungible estéril así como también lo eran las diversas soluciones y medios de cultivo empleados.

El cultivo de las células se realizó en el medio apropiado para cada línea celular a 37 °C en un incubador con una atmósfera al 5% CO₂.

5.2.2.2 Tripsinización

Es el proceso por el cual se consigue separar las células adheridas a las placas de cultivo para su posterior recuento, subcultivo o almacenamiento.

En una placa con células entre el 70% y el 90% de confluencia se retira el medio de cultivo y se procede a lavar dos veces con PBS. De esta manera se eliminan los restos que pudieran quedar de suero bovino fetal que tiene la capacidad de inhibir a la tripsina.

A continuación, se añade una cantidad suficiente que permita cubrir la superficie de la placa de la solución de 0,25% tripsina-EDTA. Se deja actuar la solución a temperatura ambiente el tiempo necesario para que la enzima lleve a cabo su acción. Se puede comprobar *de visu* cómo las células se separan de la placa.

5.2.2.3 Recuento de células

Después del proceso de tripsinización descrito anteriormente (ver 5.2.2.2), se puede calcular el número de células por unidad de volumen con ayuda de la cámara de Neubauer. Para ello se realiza una dilución del producto de la tripsinización en PBS o medio de cultivo (1:10 o 1:5, por ejemplo). A continuación se monta la cámara de Neubauer y se carga el volumen adecuado de las células en suspensión. Para evitar la formación de aglomerados se puede pipetear suavemente o realizar una agitación ligera. El siguiente paso es contar el número de células que se encuentran en las cuatro esquinas de cada zona de recuento (zonas sombreadas en la Figura 5.5).

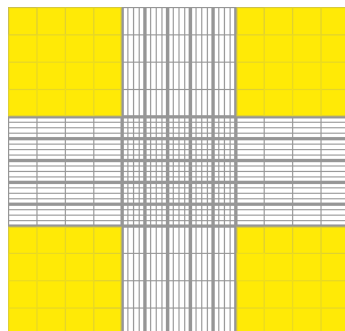


Figura 5.5. Esquema de la zona de recuento de la cámara de Neubauer.

El número de células por mL se calcula aplicando la siguiente expresión:

$$\text{Concentración de células} = \frac{\text{Total de células contadas} \times 10.000}{\text{Número de cuadros contados (4)}}$$

5.2.2.4 Congelación y almacenamiento de líneas celulares

Tras el proceso de tripsinización, se mezclan en un vial de congelación 0,5 mL de células en suspensión y 1 mL de solución de congelación que está constituida por 20% (v/v) DMSO en suero bovino fetal.

Los viales se introducen en un contenedor de congelación y este se lleva al congelador de -80 °C. En nuestro caso usamos contenedores *CoolCell* (Biocision) en cuyo interior la temperatura baja de forma controlada del orden de 1 °C/min, con la ventaja de hacerlo en ausencia de alcoholes o cualquier otro tipo de fluido.

Pasadas 48 horas, los viales congelados pueden ser transferidos a un contenedor donde se almacenan en atmósfera de nitrógeno líquido (T=-195 °C) pudiendo ser mantenidas durante mucho más tiempo que en el congelador de -80 °C, garantizando así su posterior viabilidad.

5.2.2.5 Transfección eucariota

Consiste en la introducción de DNA en células en cultivo que, como consecuencia, modifican su fenotipo por la expresión de los genes transfectados.

Existen diversos medios para realizar la transfección. En nuestro caso se ha empleado el reactivo *Lipofectamine 2000* (Thermo Scientific). Está constituido por liposomas cuya superficie está cargada positivamente. Estos son atraídos electrostáticamente por los restos fosfato que quedan en el exterior de la doble hélice de DNA y también por la superficie de las membranas celulares, las cuales poseen carga negativa.

Para una transfección típica de células eucariotas en placas de cuarenta y ocho pocillos, el proceso seguido es el descrito a continuación:

El día anterior a la transfección, se separan las células de una placa P100 con un porcentaje de confluencia elevado (superior al 80%). Se realiza un recuento como se describe en el apartado 5.2.2.3 y se siembra el número de células adecuadas (entre $1,7 \cdot 10^4$ y $2,2 \cdot 10^4$ según el tipo celular) en los pocillos de la nueva placa. A las veinticuatro horas, el porcentaje de confluencia de las células debe encontrarse entre el 60% y 80%.

En este momento se preparan dos medios para cada pocillo: el primero está constituido por 30 μ L de DMEM con 2 mM L-glutamina y 0,7 μ L de lípido catiónico; el

segundo comprende el volumen necesario de muestra que contenga 0,3 µg de DNA y, además, DMEM con 2 mM L-glutamina hasta completar 30 µL. Hay que destacar que los medios carecen de antibióticos y de suero porque éstos pueden interferir negativamente en el proceso de transfección. Transcurridos cinco minutos se mezclan ambos medios y se dejan incubar a temperatura ambiente durante veinte minutos.

Por otra parte, se retira el medio de cultivo en el que han estado creciendo las células desde la víspera. Se realiza un lavado con DMEM con 2 mM L-glutamina y se disponen 0,3 mL de este mismo medio en cada uno de los pocillos. Pasados los veinte minutos, se adiciona la mezcla preparada anteriormente para cada uno de los pocillos.

Las células se incuban en este estado a 37 °C y una atmósfera al 5% CO₂ entre cuatro y seis horas. Pasado este tiempo se retira el medio y se añade uno nuevo y completo (incluye suero bovino fetal y antibióticos).

Las cantidades de DNA, reactivo de transfección y medio de cultivo deben ser ajustadas convenientemente para el tamaño de pocillo o placa que se vaya a emplear.

5.2.2.6 Microscopía de fluorescencia

Una vez transcurridas al menos 24 h desde la transfección con vectores que contienen la secuencia codificante para la proteína verde fluorescente, las células se han observado en un microscopio de fluorescencia Olympus CKX41 y se han tomado imágenes con la cámara digital Olympus XC-30. En cada una de las sesiones se fijaron los valores de tiempo de exposición y sensibilidad para poder comparar posteriormente los valores de fluorescencia.

5.2.2.7 Microscopía confocal de fluorescencia

Para poder observar las células en el microscopio confocal, es necesario sembrarlas en cubreobjetos de cristal estériles. Una vez que han crecido y han sido sometidas a los tratamientos pertinentes, se retira el medio de cultivo y se lava tres veces con PBS. A continuación se incuba a temperatura ambiente en una disolución de 2% (p/v) paraformaldehído en PBS. De nuevo se lava tres veces con PBS y los cubreobjetos se montan sobre un portaobjetos en el que previamente se ha depositado una gota de líquido de montaje (*Vectashield mounting media*, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA).

La microscopía confocal se realizó en un microscopio confocal espectral de alta velocidad y multifotón LeicaTCS-SP5 II. La proteína eGFP se excitó a 488 nm usando un láser de kriptón/argón y la fluorescencia emitida fue detectada en un canal entre 504-562 nm. Todas las muestras se expusieron a los láseres por un tiempo inferior a 5 minutos para evitar photobleaching. El láser fue utilizado a la mínima potencia necesaria para producir una señal fluorescente. Para ello, se

utilizaron los fotomultiplicadores al máximo voltaje posible. Se usó *A pinhole of 1 Airyunit*. Las imágenes se adquirieron a una resolución de 1024 x 1024 y las series en modo xyz. Los datos se procesaron usando el software de Leica *LAS AF*.

5.2.2.8 *Ensayo de autofagia mediante microscopía confocal*

Una breve revisión del proceso general de autofagia se puede encontrar en el apartado 3.1.2.2.

Las células son transfectadas (ver 5.2.2.5) con un vector de expresión que contiene la secuencia codificante de LC3 fusionada al extremo carboxilo de la proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein, GFP*). Se puede conocer la localización de la proteína quimérica mediante microscopía confocal de fluorescencia (ver 5.2.2.7). Habitualmente se encuentra dispersa en el citoplasma pero en presencia de diversos estímulos (ayuno, glucocorticoides) esta proteína es cortada y conjugada a fosfatidiletanolamina y pasa a formar parte de los autofagosomas (Mizushima *et al.*, 2010). En este caso, se observa un punteado en el interior celular. La cuantificación de los puntos es representativa del nivel de autofagia para cada tratamiento.

En nuestros experimentos, las células fueron incubadas con bafilomicina A1 durante 30 min antes de adicionarse los compuestos a ensayar. La bafilomicina A1 impide la unión del autofagosoma con el lisosoma de forma que los autofagosomas que se forman se acumulan en el citosol sin convertirse en autolisosomas y evitándose así la degradación de la proteína LC3-GFP (Mizushima *et al.*, 2010). Pasado el tiempo indicado, se incubaron las células durante otros 30 min en presencia de los distintos compuestos (junto a bafilomicina A1). Finalmente las muestras fueron procesadas para ser observadas mediante microscopía confocal de fluorescencia (ver 5.2.2.7).

5.2.2.9 *Ensayos de viabilidad y proliferación celular basados en MTT*

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

Las células vivas con un metabolismo activo tienen la capacidad de convertir el MTT en un compuesto coloreado morado (formazán) que presenta un máximo de absorbancia a 570 nm. Las células muertas no llevan a cabo la reacción de modo que la formación de color es un indicador adecuado para la detección de células viables.

Para llevar a cabo el ensayo, se lavan las células con PBS y se incuban en DMEM sin FBS suplementado con 0,5 mg/mL MTT a 37 °C durante 1-4 h (según el tipo celular). Pasado este tiempo, se retira el medio, se lava con PBS y se adiciona una solución 40 mM HCl en isopropanol para la extracción del compuesto coloreado del interior de la célula. Finalmente se mide la densidad óptica de la solución coloreada a 570 nm.

La intensidad de la señal generada es dependiente de varios parámetros entre los que se encuentran la concentración de MTT, el tiempo de incubación, el número de células viables y su actividad metabólica. Todos estos parámetros deben tenerse en cuenta para la optimización del ensayo.

5.2.2.10 Recuento de formación de neuritas

La formación de neuritas en células Neuro2a es indicativa de la diferenciación de neuroblastos en neuronas. El recuento se realizó en un microscopio óptico invertido Olympus CKX41. Se tomaron fotografías y el número de células no diferenciadas y de neuritas se contó usando el programa *ImageJ* (*National Institutes of Health, USA*). Se consideraron neuritas aquellas extensiones celulares con una longitud igual o superior al diámetro del cuerpo celular. El porcentaje de células diferenciadas se calculó como el número de células con neuritas sobre el número total de células.

5.2.2.11 Ensayo de detección de especies reactivas de oxígeno en cultivos celulares

En este ensayo se emplea 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFDA) que es un reactivo que permite medir la actividad de radicales hidroxilo, peroxilo y otras especies reactivas de oxígeno (ROS) dentro de la célula. Tras difundir hacia el interior de la misma, el DCFDA es desacetilado por las esterasas celulares dando lugar a un compuesto no fluorescente que es posteriormente oxidado por las ROS para dar 2',7'-diclorofluoresceína. Este es altamente fluorescente, presenta un máximo de excitación a 495 nm y de emisión a 529 nm y puede ser detectado por espectrometría de fluorescencia o citometría de flujo.

Cuando las células alcanzan un porcentaje de confluencia apropiado (70-90%), se lavan una vez con PBS. A continuación se incuban en PBS suplementado con 10 μ M DCFDA a 37 °C durante 30 min. Transcurrido este tiempo se retira el tampón y se lava una vez con PBS. Seguidamente se incuban las células en DMEM sin FBS y suplementado con los efectores que se desean ensayar a 37 °C durante un tiempo que puede oscilar entre 5 min y 1 h. Se retira el medio, se lava con PBS y se añade tripsina. Cuando las células se separan de la placa, se transfieren a un tubo de 1,5 mL en hielo hasta que son procesadas en el citómetro de flujo en el canal FL-1.

5.2.2.12 Estudio de la apoptosis por citometría de flujo usando yoduro de propidio

Se puede estudiar la etapa del ciclo celular en la que se encuentra una población de células empleando yoduro de propidio. Este es un colorante fluorescente que se une de forma estequiométrica a los ácidos nucleicos dando lugar a una emisión fluorescente proporcional al contenido de DNA de la célula.

Las células en estado quiescente o en fase G1 presentan dos copias de cada cromosoma; las células mitóticas o en fase G2/M presentan el doble de la cantidad de DNA que las células G1 y dan lugar al doble de fluorescencia. Las células que se encuentran sintetizando DNA entre una y otra fase (fase S) arrojan valores de fluorescencia intermedios.

Durante la apoptosis, se generan fragmentos pequeños de DNA que no se retienen en el interior celular tras la fijación de las células en etanol y los posteriores pasos de lavado. Por esta razón, las células apoptóticas (fase sub-G1) emiten menos fluorescencia que las células en fase G1. Esta característica permite que sean identificadas observando el histograma obtenido al analizarlas por citometría de flujo.

En esencia, el procedimiento consiste en recoger el medio de cultivo (puesto que en él se encuentran gran parte de las células muertas por apoptosis) y tripsinizar las células adheridas. El medio de cultivo y el producto de la tripsinización se reúnen en un tubo de 1,5 mL y se centrifuga a 400xg durante 5 min. Se lava una vez con PBS y se centrifuga nuevamente a 400xg durante 1 min. Se resuspenden las células en 70% (v/v) etanol frío y se incuban a -20 °C durante al menos 1 h. A continuación se centrifuga a 2.500 xg durante 5 min y se retira el etanol. El sedimento se resuspende en tampón de lavado (200 mM Na₂HPO₄, 100 mM ácido cítrico) y se centrifuga a 2.500 xg durante 1 min. Por último, se resuspenden en PBS suplementado con 10 µg/mL yoduro de propidio y 100 µg/mL RNasa y se incuban durante 30 min a temperatura ambiente. Sin necesidad de lavados posteriores, las células están listas para ser procesadas por citometría de flujo en el canal FL-2 teniendo la precaución de hacer la medida en escala lineal.

5.2.2.13 Cuantificación de los niveles de cAMP

Con este fin se ha empleado el kit *cAMP Biotrak EIA* (GE Healthcare Life Sciences) siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante.

En esencia consiste en un enzoinmunoensayo basado en la competencia entre cAMP no marcado (el presente en la muestra) y una cantidad fija de cAMP marcado con peroxidasa (*standard*) por la unión a un número limitado de sitios sobre un anticuerpo específico frente a cAMP.

5.2.3 Técnicas para el análisis de ácidos nucleicos

5.2.3.1 Aislamiento y purificación de DNA plasmídico

Se han empleado técnicas distintas en función de dos parámetros que son la cantidad de DNA y la pureza requerida. El método de la lisis alcalina es rápido, sencillo y útil para muchas aplicaciones en las que no se necesita una gran pureza. Por esta razón, se usó de forma general para la identificación de las colonias portadoras de plásmidos con los insertos de interés.

- Método de la lisis alcalina

Después de incubar en medio LB líquido a 37 °C durante toda la noche la colonia que contiene el plásmido de interés, se transfieren 1,5 mL de dicho medio a un tubo de 1,5 mL y se centrifuga a 16.000 *xg* durante tres minutos. Se descarta el sobrenadante y el sedimento se resuspende en 200 µL de solución P1 (25 mM Tris-HCl, pH 8; 10 mM EDTA; dH₂O hasta 200 µL). Se adicionan 200 µL de solución de lisis P2 (0,4 M NaOH; 0,1% (p/v) SDS; dH₂O hasta 200 µL), se mezcla suavemente por inversión y se dejan los tubos durante dos minutos a temperatura ambiente.

A continuación se añaden 200 µL de solución de neutralización P3 (3M acetato potásico, pH 5) y de nuevo se mezcla suavemente por inversión. Se dejan las muestras durante diez minutos en hielo y pasado este tiempo se centrifugan a 16.000 *xg* durante quince minutos.

El sedimento se descarta y el sobrenadante se transvasa a un nuevo tubo de 1,5 mL al que se adicionan 500 µL de una mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico a pH 8 en una proporción 25:24:1. Se agita vigorosamente y se centrifuga a 12.000 *xg* durante tres minutos.

En el tubo aparecen tres fases: una superior acuosa, una intermedia de proteínas y una inferior orgánica. Se recoge la fase acuosa y se transfiere a un nuevo tubo al que se añaden 500 µL de una mezcla cloroformo:alcohol isoamílico en proporción 24:1. De nuevo se agita vigorosamente y se centrifuga a 12.000 *xg* durante tres minutos.

La fase acuosa se transfiere a otro tubo y se añaden 400 µL de isopropanol frío (-20°C) dejándose las muestras durante quince minutos a esa temperatura, lo que favorece la precipitación del DNA. A continuación se centrifuga a 16.000 *xg* durante veinte minutos a 4 °C.

El sedimento de DNA se lava con 800 µL de etanol al 70% (v/v) a -20 °C y se procede a una nueva centrifugación a 16.000 *xg* durante quince minutos a 4 °C. El sobrenadante se retira por aspiración y se deja secar el sedimento antes de resuspenderlo en 30 µL de agua destilada o tampón TE.

- Método *GeneJET Plasmid Miniprep Kit*

Se ha usado este método cuando se ha necesitado un DNA plasmídico de mayor pureza que el obtenido por el método de la lisis alcalina y libre de RNA. En resumen, después de centrifugar 2-3 mL de cultivo bacteriano, se procede a la resuspensión del sedimento de bacterias y posterior lisis y neutralización. De nuevo se centrifuga y el sobrenadante se transfiere a una columna de sílica donde el DNA plasmídico queda unido. Tras varios pasos de lavado para la eliminación de sales, metabolitos y otros componentes celulares, el DNA plasmídico es arrastrado de la columna por adición de un tampón con baja fuerza iónica.

- *Midipreps*

Con este método se consiguen importantes cantidades de DNA plasmídico de una gran pureza y libre de endotoxinas. De forma resumida, diremos que una pequeña alícuota de un cultivo saturado de la cepa que contiene el plásmido de interés se adiciona a 500 mL de medio LB líquido con los antibióticos de selección pertinentes. Se deja en agitación durante toda la noche a 37 °C y se procede a la centrifugación del cultivo para obtener un sedimento de bacterias con el que se actúa de un modo similar a como se describe en el “método de la lisis alcalina” pero empleando volúmenes mayores. Las diferencias esenciales son las siguientes:

- a) Precipitación adicional del RNA con 5M LiCl.
- b) Incubación con RNasa para la eliminación del RNA residual presente en la muestra.
- c) Precipitación del DNA con PEG 8.000 en presencia de NaCl.
- d) Mayor número de extracciones con la mezcla fenol:cloroformo.
- e) Precipitación definitiva del DNA plasmídico con etanol en presencia de la concentración adecuada de sales.

5.2.3.2 *Cuantificación de DNA*

- Método fluorimétrico

Se basa en el uso del reactivo comercial Hoechst 33258 que tiene la capacidad de intercalarse en la doble hebra de DNA y emitir fluorescencia. Dicha fluorescencia es proporcional a la cantidad de DNA presente en la muestra.

En primer lugar se prepara una recta patrón con cantidades crecientes y conocidas de DNA de esperma de salmón con valores situados entre cero y cinco $\mu\text{g/mL}$. El DNA se mezcla con reactivo de Hoechst y tampón TNE (0,2 M NaCl; 10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA, pH 7,4). A continuación se mide fluorescencia a una longitud de onda de 365 nm de excitación y 460 nm de emisión.

El procedimiento se repite con cada una de las muestras problema. Se calcula la concentración de DNA de estas por interpolación de los valores de fluorescencia obtenidos en la recta patrón construida como se ha descrito anteriormente.

- Cuantificación espectrofotométrica de DNA en dispositivo tipo *NanoDrop*

Se dispone en el laboratorio de un espectrofotómetro *NanoVue Plus* (GE Healthcare) que permite hacer medidas directas de la concentración de ácidos nucleicos depositando una pequeña gota de la muestra (habitualmente 2 μL) en la zona de lectura mediante la determinación de su densidad óptica a 260 nm. Previamente hay que hacer una doble medida con agua destilada como blanco para establecer el valor cero.

5.2.3.3 Digestión con endonucleasas de restricción

Las endonucleasas de restricción tienen la capacidad de reconocer y cortar secuencias específicas del DNA generando una serie de fragmentos más pequeños. Se encuentran en una amplia gama de especies bacterianas y su función biológica es reconocer y cortar DNA no perteneciente a la bacteria en cuestión como, por ejemplo, el DNA de un bacteriófago. Muchas endonucleasas de restricción han sido aisladas y purificadas constituyendo así una importante herramienta de trabajo en biotecnología.

Durante el desarrollo de este trabajo, se emplearon fundamentalmente para comprobar si una reacción de ligación se había llevado a cabo con éxito y para la subclonación de fragmentos de DNA en vectores con sitios de restricción compatibles.

Las digestiones se realizaron conforme a las instrucciones facilitadas por la casa comercial manteniendo las proporciones de enzima, tampón específico y DNA. El tiempo y la temperatura de incubación habituales fueron de 1 h y 37 ° C.

5.2.3.4 Electroforesis de DNA en geles horizontales de agarosa

Este método permite la separación y visualización de moléculas de DNA de tamaños diversos.

Se prepara un gel de agarosa en tampón TAE (40 mM Tris-base; 0,11 % (v/v) ácido acético glacial, 1 mM EDTA- Na_2 pH 8) cuyo porcentaje de agarosa es variable en función del tamaño de los fragmentos que se van a separar y la resolución que se desea obtener. En general, para la elaboración de este trabajo, se empleó un rango del 0,8% al 2% (p/v) de agarosa.

El gel se sumerge en tampón TAE y se cargan las muestras con ayuda de un tampón de carga (40% (v/v) glicerol, 60% (v/v) dH_2O y cantidad suficiente de azul de bromofenol) en proporción 4:1. A continuación se aplica un voltaje entre 70 y 100 V.

Para visualizar los fragmentos de DNA, el gel se deja inmerso diez minutos en una disolución de bromuro de etidio en tampón TAE a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El bromuro de etidio se intercala en la doble hélice de DNA originando un complejo coloreado al exponer el gel a luz ultravioleta. En estas condiciones, el gel puede ser fotografiado.

El tamaño de los fragmentos se puede determinar, de forma aproximada, con la utilización de marcadores de peso molecular.

5.2.3.5 Ligación de DNA

La reacción de ligación se preparó con todos sus componentes en hielo. Los fragmentos obtenidos por digestión con endonucleasas de restricción (ver 5.2.3.3) o como producto de una reacción de PCR (ver 5.2.3.6), se mezclaron con vectores

linealizados y extremos compatibles en una proporción molar 3:1. Se añadieron cinco unidades de T4 DNA ligasa y 10 µL de 2x Reaction Buffer (tampón para la ligación de Thermo Scientific). La mezcla se llevó usualmente a un volumen final de 20 µL con agua destilada y se incubó a 10°C durante toda la noche. Transcurrido este tiempo la mezcla se empleó directamente para la transformación de células competentes (ver 5.2.1.2), o bien se almacenó a -20 °C para un uso posterior.

5.2.3.6 *Reacción en cadena de la polimerasa*

Este método permite amplificar de forma exponencial DNA de cadena doble. En este proceso intervienen una pareja de oligonucleótidos que hibridan específicamente en dicho DNA, el cual actúa como molde, y una polimerasa termorresistente que adiciona desoxirribonucleótidos libres, presentes en la mezcla de reacción, a las hebras de nueva síntesis.

En nuestro caso, se empleó un termociclador Perkin Elmer 9700. Habitualmente, las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 50 µL que incluía los oligonucleótidos a una concentración final 0,1 pM, los desoxirribonucleótidos a 100 µM y 1,25 unidades de *Pfu* polimerasa, además del tampón apropiado para la enzima.

En general, la reacción se ha realizado como se indica a continuación: un ciclo inicial de desnaturalización de cinco minutos a 94 °C; un número variable de ciclos (entre veinte y treinta y cinco), cada uno de ellos con tres fases: una de desnaturalización a 94 °C durante 20 s, una de hibridación durante 30 s y una de amplificación a 72 °C. La última de estas fases tuvo una duración variable en función del tamaño final del fragmento a amplificar aplicándose el criterio de un minuto por kilobase. Finalmente un último ciclo de amplificación de siete minutos a 72 °C para asegurar que se acabaran de sintetizar todos los fragmentos iniciados. Por último, decir que la temperatura de la fase de hibridación de los oligonucleótidos se calculó con el apoyo del programa informático *Serial Cloner 2.6.1*.

5.2.3.7 *Secuenciación de DNA*

La secuenciación de DNA se llevó a cabo en el Servicio de Secuenciación Automática del Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra del CSIC de Granada, utilizando un secuenciador modelo 373 STRECHT (Applied Biosystems). El método de secuenciación fue el comercializado por Perkin-Elmer, *ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* que utiliza en la reacción de extensión la enzima *AmpliTaq® FS DNA* polimerasa y emplea didesoxinucleótidos marcados diferencialmente con cromóforos fluorescentes. En cada reacción de secuenciación se emplearon 300-500 ng de DNA puro y 6,4 pmol de oligonucleótido en un volumen final de 12 µL.

5.2.3.8 Extracción de RNA

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

Las muestras se lisan y homogenizan en un tampón que incluye tiocianato de guanidinio, el cual limita la acción de las RNasas endógenas. El lisado se mezcla con etanol y se carga en una columna de purificación. La mezcla de tiocianato de guanidinio y el etanol permite la unión del RNA a una membrana de sílica presente en la columna cuando se hace pasar el lisado a través de ella. Las impurezas que quedan presentes se eliminan con varios lavados y el RNA puro es recogido finalmente bajo condiciones de baja fuerza iónica con agua destilada libre de nucleasas.

5.2.3.9 Cuantificación de RNA

Se procedió tal y como se describe en la sección “Cuantificación espectrofotométrica de DNA en dispositivo tipo *NanoDrop*” del apartado 5.2.3.2.

Para la determinación de la pureza de la muestra se realizan medidas de densidad óptica a longitudes de onda de 260 y 280 nm. A continuación se establece la relación A_{260}/A_{280} . Un valor por debajo de 1,6 es indicativo de contaminación con proteínas, mientras que si los valores son superiores a 1,8 se considera que la pureza de la muestra es adecuada. En nuestro caso, la relación A_{260}/A_{280} siempre arrojó valores en torno a 2,0.

5.2.3.10 Electroforesis de RNA en geles horizontales de agarosa

Los métodos espectrofotométricos pueden dar información sobre la pureza de la muestra pero no sobre su integridad. Para ello resulta necesario realizar una electroforesis y comprobar la relación entre las bandas 28S y 18S de RNA ribosomal. Cuando la intensidad de la banda de 28S es doble de la de 18S se considera que el RNA está íntegro. En cualquier caso, valores de dicha relación inferiores a dos también se pueden considerar válidos en función de los experimentos que se vayan a realizar (Skrypina *et al.*, 2003).

Las electroforesis se realizaron siguiendo el protocolo descrito por Aranda *et al.* (2012). Se basa en la adición de pequeñas cantidades de lejía comercial al gel de agarosa durante su preparación. El hipoclorito sódico actúa como agente desnaturante del RNA y destruye las RNasas que pudiera haber en el gel.

Así pues, nosotros preparamos geles de agarosa al 1% (p/v) en TAE con un 2% (v/v) de lejía comercial (<5% de hipoclorito sódico) y 0,25 µg/mL de bromuro de etidio. Las muestras se prepararon adicionando al volumen que contenía 500 ng de RNA un volumen igual de tampón de carga constituido por glicerol y agua destilada en proporción 1:1.

Las electroforesis se realizaron a 100 V durante 30 min en tampón TAE y el resultado se observó por exposición del gel en el transiluminador de luz ultravioleta.

5.2.3.11 Transcripción inversa o retrotranscripción (RT) de RNA

Consiste en la obtención de DNA complementario (cDNA) a partir de RNA de una muestra. Para ello se utiliza una enzima derivada de la transcriptasa inversa de M-MuLV () y oligonucleótidos que hibriden en la secuencia del RNA.

En el caso de los organismos eucariotas, el mRNA presenta en el extremo 3' colas de poliadenina (poliA) que pueden hibridar con un oligonucleótido rico en nucleótidos de timina (oligo (dT)) y, por mediación de la transcriptasa inversa, originar copias de todas las moléculas de mRNA presentes en la muestra. También pueden emplearse oligonucleótidos que hibriden específicamente con el mRNA producido a partir de un único gen dando lugar así a una transcripción inversa específica. Una tercera opción es el uso de una mezcla de oligonucleótidos cortos con secuencias aleatorias (*random primers*) que garantizan su hibridación con múltiples zonas de los mRNA.

Esta técnica se llevó a cabo siguiendo las instrucciones que acompañan al kit *Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR* (Thermo Scientific). Este incluye en el tampón de la reacción tanto oligo (dT)₁₈ como una mezcla de oligonucleótidos cortos (hexámeros) de secuencia aleatoria.

5.2.3.12 PCR cuantitativa (qPCR) o PCR en tiempo real

Con la qPCR lo que se pretende es distinguir y medir la cantidad de determinadas secuencias de ácidos nucleicos presentes en una muestra. Para ello se amplifica una secuencia diana tal como se haría en un PCR convencional (ver 5.2.3.6) pero monitorizando el progreso de la amplificación usando una sonda fluorescente. La velocidad con que se alcanza un determinado valor umbral de fluorescencia se correlaciona con la cantidad original de la secuencia de interés en la muestra.

Además, el producto final se puede caracterizar sometándolo a un incremento progresivo de temperatura. Esto permite construir las llamadas curvas de disociación (*melting curves*) que presentan un perfil de desnaturalización específico que depende de la longitud del producto y de la secuencia de nucleótidos que lo componen (Wong y Medrano, 2005).

En nuestros experimentos, las reacciones se llevaron a cabo en un dispositivo *MiniOpticon* para PCR a tiempo real de Bio-Rad con detección de señal fluorescente (*SYBR Green*) después de cada ciclo de amplificación. Se usó como molde cDNA obtenido como se describe en 5.2.3.11 en un volumen final de reacción de 10 µL que incluía 5 µL de *2x iTaq Universal SYBR Green Supermix* (Bio-Rad) y 500 nM de cada oligonucleótido (ver Tabla 5.2).

La qPCR comenzaba a 95 °C durante 2 min seguido de cuarenta ciclos con dos fases (95 °C x 15 s, 53-57 °C x 30 s) y finalizaba con una curva de disociación: incremento progresivo de la temperatura del orden de 0,1 °C/s entre 60 °C y 95 °C, con medida de la fluorescencia cada 0,5 °C.

Cada una de las muestras se midió por triplicado y la expresión relativa del gen se calculó usando el método $2^{\Delta Ct}$ empleando β -actina como gen de referencia interno.

5.2.4 Técnicas para el análisis de proteínas

5.2.4.1 Determinación de la síntesis de proteínas

Las células L6 se sembraron en placas de 48 pocillos, se incubaron en medio de diferenciación durante cuatro días (ver 5.1.3.2) y a continuación se incubaron en medio sin suero 16-18 h. Transcurrido este tiempo, se volvió a reponer el medio habitual con 10% (v/v) FBS y se suplementó con 0,8 mM Tyr y los efectores.

El cultivo se mantuvo en estas condiciones durante 2 h y seguidamente se adicionó 1 μ Ci/mL de L-(ring-3,5- 3 H)-Tyr (Perkin Elmer). Pasada una hora la reacción se paró colocando las placas sobre hielo. Posteriormente, los pocillos se lavaron dos veces con PBS frío suplementado con 2mM Tyr (PBS-Tyr).

Las células se lisaron con 0,1 mM NaOH/0,1% (p/v) desoxicolato sódico y se procedió a la precipitación de las proteínas por adición de 20% (v/v) ácido tricloroacético (TCA). La mezcla se transvasó a tubos de 1,5 mL, se incubó a 4 °C durante 15 min y se centrifugó a 16.000 xg durante 10 min.

El sedimento se lavó una vez con 10% (v/v) TCA y se procedió a resuspender las proteínas precipitadas en 0,1 mL de 1 M NaOH. Una alícuota (5 μ L) se destinó a la cuantificación de proteínas (ver 5.2.4.5) y el resto se neutralizó con 1 M HCl y se mezcló con 4 mL de líquido de centelleo *Ready Safe* (Beckman Coulter).

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

5.2.4.2 Determinación de la degradación de proteínas

Después de cuatro días en medio de diferenciación, los miotubos fueron marcados radiactivamente con L-(ring-3,5- 3 H)-Tyr (Perkin Elmer) durante 48 h en DMEM con 10% (v/v) FBS en ausencia o presencia de los efectores que se deseaba ensayar.

Las células se lavaron una vez con PBS-Tyr y se incubaron un periodo de 2 h en DMEM suplementado con 10% (v/v) FBS y 2 mM Tyr (medio de degradación) para permitir la degradación de las proteínas de vida media corta. Se lavó dos veces con

PBS-Tyr y se renovó el medio de degradación en presencia o ausencia de los efectores y 5 μ M dexametasona.

Pasadas 24 h, el medio de cultivo se transvasó a tubos de 1,5 mL que contenían 100 μ L de 10 mg/mL BSA para facilitar la precipitación de proteínas. Esta se llevó a cabo mediante la adición de 20% (v/v) TCA. Se incubó a 4°C durante 1 h y se centrifugó a 16.000 xg durante 10 min. El sobrenadante se mezcló con líquido de centelleo *Ready Safe* (Beckman Coulter) y se midió su radiactividad (fracción soluble). El sedimento se lavó una vez con 10% (v/v) TCA, se resuspendió en 0,1 mL de 1 M NaOH y se equilibró con 1 M HCl; se mezcló con líquido de centelleo y se midió su radiactividad (fracción insoluble).

Por otra parte, las células se lavaron con PBS-Tyr, se lisaron con 0,1 mM NaOH/0,1% (p/v) desoxicolato sódico y se precipitaron con 20% (v/v) TCA. El sedimento se trató igual que se ha descrito en el párrafo anterior para la fracción insoluble y se midió su radiactividad (fracción celular).

El porcentaje de degradación de proteínas para cada muestra corresponde al cociente de la radiactividad de la fracción soluble entre la radiactividad total, esto es, la suma de la radiactividad de las tres fracciones: soluble, insoluble y celular, y multiplicado por cien.

$$\% \text{ degradación} = \frac{\text{radiactividad fracción soluble}}{\text{radiactividad total}} \times 100$$

5.2.4.3 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 determinado promotor, y el vector pRL-TK en una proporción 95:5 (ver 5.1.4.1).

La actividad de las luciferasas de luciérnaga y *Renilla* fueron medidas usando el *Dual Luciferase Assay System* (Promega) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante y usando un luminómetro *Sirius L* (Berthold Technologies).

Los resultados se expresaron en porcentaje como cambios relativos en la actividad de la luciferasa otorgando al grupo control el valor 100%.

5.2.4.4 Preparación de extractos proteicos

- Extractos totales

Las células fueron cultivadas en medio de cultivo completo hasta confluencia. Se retiró el medio de cultivo de la placa y se lavó dos veces con PBS. Se añadieron 50 μ L de tampón de lisis RIPA (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 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), se rasparon y se transfirieron a un tubo de 1,5 mL. Los tubos se incubaron en hielo durante 10 min y se centrifugaron a 10.000 xg durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo.

- Extractos para la detección de proteínas fosforiladas

El medio de cultivo se retiró rápidamente de las placas y estas se congelaron a -80 °C durante 30 min. A continuación se procedió al raspado de las células con tampón de lisis RIPA (ver párrafo anterior) suplementado con inhibidores de fosfatasa (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). El lisado se transvasó a tubos de 1,5 mL, se centrifugó a 10.000 xg durante 10 min y se recogió el sobrenadante en un tubo nuevo.

- Extractos nucleares

En esta ocasión se siguió el protocolo descrito por Young *et al.* (2001) con ligeras modificaciones.

Las células fueron raspadas en 50 μ L de tampón de lisis (50 mM KCl; 0,5% (v/v) Nonidet-P40; 25 mM HEPES, pH 7,8; 1 mM PMSF; 10 mg/mL leupeptina; 20 mg/mL aprotinina; 100 mM DTT) y transferidas a hielo donde permanecieron 5 min. Después de centrifugar a 16.000 xg durante 1 min, el sobrenadante se reservó como extracto citosólico.

El sedimento se lavó una vez con 50 μ L de tampón de lisis sin Nonidet-P40. A continuación se trató con 30 μ L de tampón de extracción (500 mM KCl; 10% (v/v) glicerol; 25 mM HEPES, pH 7,8; 1 mM PMSF; 10 mg/mL leupeptina; 20 mg/mL aprotinina; 100 mM DTT) y se pipeteó arriba y abajo varias veces. Por último se centrifugó a 16.000 xg durante 5 min y el sobrenadante se recogió como extracto de proteínas nucleares.

Cuando se realizaron *Western blots* con este tipo de extractos, se empleó la proteína histona H3 como control de carga dada su localización exclusivamente nuclear.

5.2.4.5 Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas de los distintos extractos fue medida usando el método del ácido bicinonínico (Smith *et al.*, 1985).

Para ello se utilizan 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 prepara una disolución al 1% (p/v) de la sal disódica hidratada del ácido bicinonínico (solución de trabajo).

Por otra parte, en una microplaca de 96 pocillos se pipetea alícuotas de la muestras por duplicado así como volúmenes crecientes de una disolución de BSA de concentración conocida para la elaboración de la recta patrón. A continuación se añaden 150 μL de la solución de trabajo y se incuba a 37 °C durante 30 min.

Finalmente se mide 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.

5.2.4.6 Electroforesis vertical en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La electroforesis de proteínas se realiza generalmente en geles de poliacrilamida que es un polímero entrecruzado el cual permite separar las proteínas en función de su peso molecular. Estos geles están constituidos por dos partes, el gel de resolución y el gel de compactación, cuya composición se detalla en la Tabla 5.4.

Tabla 5.4. Composición de geles de poliacrilamida

	Gel de resolución	Gel de compactación
40% Acrilamida/bisacrilamida	5-10% (p/v)	4% (p/v)
Tris-HCl, pH8,8	0,375 M	---
Tris-HCl, pH6,8	---	0,125 M
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)

Entre sus componentes se encuentra SDS que es un detergente cuyas moléculas presentan carga negativa. El SDS se une a las proteínas en una cantidad aproximadamente proporcional al peso molecular de la macromolécula. El detergente ligado incorpora una gran carga neta negativa, lo que hace que la carga intrínseca de la proteína sea insignificante. Además, la mayoría de las proteínas se desnaturizan cuando se fija el SDS adoptando una forma similar y, por tanto, una razón similar de carga a masa. En estas condiciones, las proteínas se separan en la electroforesis casi exclusivamente en función de su peso molecular.

Para la preparación de las muestras, se toma el 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 cinco minutos. El calentamiento y la composición del tampón de carga favorecen la desnaturización de las proteínas.

El gel se sumerge en tampón de electroforesis 1x TGS pH 8,3 (25 mM Tris; 192 mM glicina; 0,1% (p/v) SDS) y las muestras se cargan en los pocillos del gel de compactación. Se aplica un voltaje de 150 V durante aproximadamente una hora.

Este tiempo variará en función de la concentración de acrilamida en el gel y del tamaño de las proteínas de interés.

Si se va a realizar la transferencia de proteínas a una membrana, esta debe realizarse antes de proceder a la tinción del gel. La solución de tinción está constituida por 0,2% (p/v) *Coomassie Brilliant Blue G-250*, 40% (v/v) metanol y 15% (v/v) ácido acético. El gel se deja en dicha solución durante dos horas en agitación a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, los geles se pasan a la solución de decoloración (40% (v/v) metanol, 15% (v/v) ácido acético) hasta que las bandas coloreadas correspondientes a las proteínas se hacen visibles. Inmediatamente después, los geles son fotografiados.

5.2.4.7 *Western Blot*

Se trata de una técnica que permite la detección de una proteína de interés sobre un soporte físico mediante el uso de anticuerpos.

Después de la separación por electroforesis, las proteínas se transfieren desde el gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa o PVDF. Para ello se utilizó el dispositivo para transferencia *Trans-Blot Turbo Transfer System* de Bio-Rad siguiendo las instrucciones facilitadas por el fabricante. La transferencia se realiza a 25 V/1 A durante 30 min. El tampón de transferencia pH 8,3 contiene 25 mM Tris; 0,2 M glicina; 20% (v/v) metanol.

Terminada la transferencia, comienza el proceso de inmunodetección. La membrana se introduce en un tubo cónico tipo Falcon de 50 mL y se adicionan 5 mL de la solución de bloqueo que puede ser 5% (p/v) leche desnatada en polvo o 5% (p/v) BSA en TBS-Tween (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1% (v/v) Tween 20). El tubo se introduce en el rotador de tubos y se mantiene en él durante una hora. De este modo, se bloquean los sitios de unión inespecíficos.

A continuación se retira la solución de bloqueo y se incorpora el anticuerpo específico (anticuerpo primario) diluido en la proporción adecuada en solución de bloqueo nueva. El tubo con la membrana se mantiene en rotación durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente se procede a lavar la membrana con TBS-Tween tres veces durante diez minutos con rotación continua a temperatura ambiente.

El siguiente paso consiste en poner en contacto la membrana con un anti-anticuerpo (anticuerpo secundario) que tiene la capacidad de unirse al anticuerpo primario y además, en nuestro caso, va ligado a peroxidasa. Así pues, la membrana se sumerge en una disolución adecuada del anticuerpo secundario en solución de bloqueo y se mantiene en rotación durante dos horas a temperatura ambiente. 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 cinco minutos.

Finalmente, la detección se lleva a cabo por quimioluminiscencia empleando para ello un reactivo preparado en el laboratorio (Mruk y Cheng, 2011) y el sistema de detección *ChemiDoc-It 810 Imager* de UVP.

6 RESULTADOS

6.1 Diferenciación celular y metabolismo proteico en células L6

En el apartado “Antecedentes” de esta Tesis Doctoral, se ha puesto de manifiesto la importancia del mantenimiento de la masa muscular para garantizar un estado saludable del individuo. En este sentido, nos propusimos estudiar dos procesos esenciales para la conservación del músculo esquelético como son la diferenciación celular y el recambio proteico. Para ello tomamos como modelo de experimentación *in vitro* las células L6.C11 (de aquí en adelante L6).

Las células L6 son mioblastos de rata que en las condiciones apropiadas de cultivo tienen la capacidad de fusionarse para formar miotubos multinucleados y fibras estriadas. Esta línea celular es usada habitualmente en el estudio de procesos biológicos relacionados con el músculo esquelético.

Por otra parte, el Na_2WO_4 es un compuesto antidiabético oral (Dominguez *et al.*, 2003) que promueve la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática en músculo esquelético (Giron *et al.*, 2003; Giron *et al.*, 2008). A su vez, provoca un incremento en la cantidad total de la proteína GLUT4 que se debe a una estimulación de la actividad transcripcional de su promotor por parte de los factores de transcripción MEF2. Estos factores de transcripción también participan en la regulación de la miogénesis (formación de nuevas células musculares).

Con estos conocimientos previos, decidimos evaluar los posibles efectos del Na_2WO_4 sobre la diferenciación celular y el recambio proteico en mioblastos L6.

6.1.1 El tungstato sódico induce la diferenciación de mioblastos L6.

El proceso de diferenciación celular en músculo esquelético es un mecanismo esencial para la recuperación del tejido tras un daño severo y nosotros quisimos analizar si el Na_2WO_4 presentaba algún efecto sobre dicho proceso.

Para ello, se incubaron células L6 en ausencia o en presencia de Na_2WO_4 o insulina. Esta última se empleó como control positivo pues se conoce que favorece la diferenciación de los mioblastos L6 en miotubos (Ewton y Florini, 1981). Después de cuatro días de incubación, los cultivos incubados en presencia de estos dos efectores presentaban una cantidad de mioblastos fusionados mucho mayor que el grupo control no tratado (Figura 6.1).

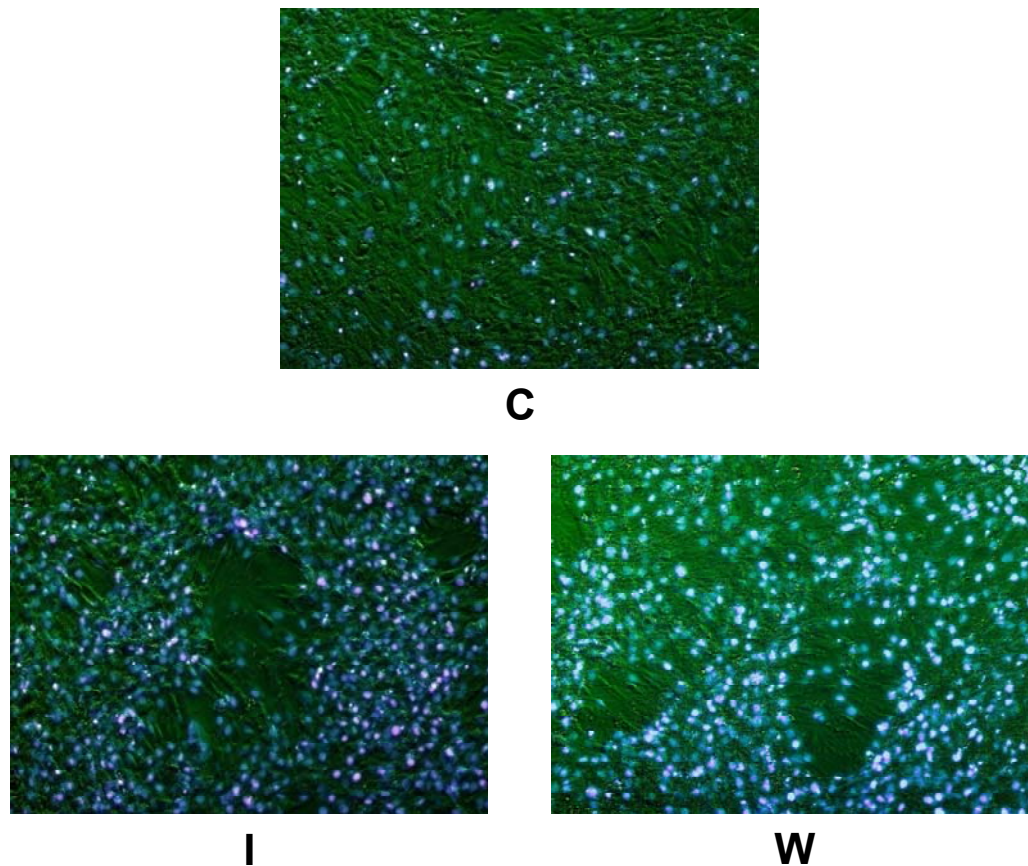


Figura 6.1. El Na_2WO_4 induce la diferenciación de mioblastos L6 en miotubos. Las células fueron cultivadas en DMEM suplementado con 2% (v/v) FBS en ausencia [C] o presencia de 50 nM insulina [I] o 0,5 mM Na_2WO_4 [W] durante cuatro días. Se fijaron, se tiñeron con Hoechst y se observaron en el microscopio de fluorescencia. Se tomaron fotografías para la emisión de Hoechst y se fusionaron con la imagen de campo claro. La figura muestra un ejemplo representativo de los resultados obtenidos.

La diferenciación de mioblastos en miotubos se caracteriza por un incremento en la actividad creatina quinasa (Morris, 1978). En este sentido, decidimos analizar qué ocurría cuando se procedía a diferenciar células L6 en ausencia o presencia de Na_2WO_4 . Así, se determinó la actividad creatina quinasa en los lisados celulares durante cuatro días y se observó que las células que se habían incubado en medio de diferenciación (DMEM suplementado con 2% (v/v) FBS, (ver 5.1.3.2) con Na_2WO_4 presentaban unos niveles significativamente superiores de actividad creatina quinasa a partir del tercer día (Figura 6.2-A).

Seguidamente, se midió la actividad transcripcional dependiente del promotor de creatina quinasa. Esta determinación puso de manifiesto que el incremento en la actividad de la creatina quinasa promovida por el Na_2WO_4 , era debida a un incremento en la transcripción del gen (Figura 6.2-B).

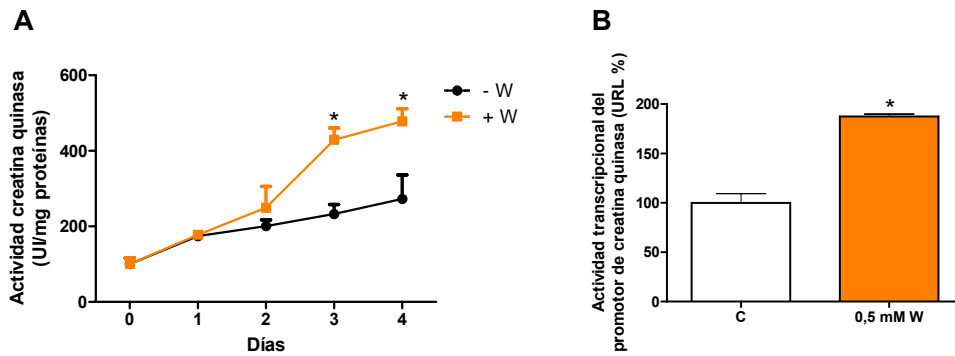


Figura 6.2. El Na_2WO_4 incrementa la actividad del marcador de diferenciación muscular creatina quinasa. Las células L6 se incubaron en medio de diferenciación en ausencia (C) o presencia de 0,5 mM Na_2WO_4 [W] durante cuatro días. (A) Se determinó la actividad creatina quinasa cada 24 h. Los datos se expresan como U/mg proteína. (B) La actividad transcripcional del promotor de creatina quinasa se midió a los cuatro días. Los datos se normalizaron teniendo en cuenta la eficiencia de transfección y se muestran como unidades arbitrarias. Los resultados se expresan como la media \pm S.E.M. ($n=4$). * $p<0,05$ comparado con las células no tratadas para el mismo tiempo.

Posteriormente, abordamos qué factores de transcripción podrían tener un papel relevante en el incremento de la transcripción del gen de creatina quinasa. Analizando la secuencia del promotor, encontramos que existían sitios putativos de reconocimiento de los factores de transcripción MEF2 y MyoD. Como se aprecia en el esquema de la Figura 6.3-A, el promotor de creatina quinasa presenta al menos dos lugares de unión para MEF2 y otros tantos para MyoD (mCK1, ver Figura 6.3-A). Procedimos a realizar deleciones en la secuencia de dicho promotor y estudiamos cómo variaba la actividad transcripcional del mismo con la ayuda de genes reporteros.

La primera deleción que se realizó (mCK2, ver Figura 6.3-A) afectaba a una amplia región del extremo 5' del promotor pero no suprimía los sitios de unión para MEF2 y MyoD. En células transfectadas con esta construcción, si bien el efecto positivo del Na_2WO_4 disminuyó, la actividad transcripcional seguía siendo significativamente mayor que en el grupo no tratado (Figura 6.3-B).

Por su parte, las células transfectadas con las construcciones mCK1 y mCK2 presentaban una actividad transcripcional similar en condiciones basales (Figura 6.3-B).

Se realizó una nueva delección que eliminaba los dos lugares de unión de MEF2 y uno de MyoD, además de las bases eliminadas en la primera delección (mCK3, ver Figura 6.3-A). Las células no tratadas y transfectadas con esta última construcción mostraban una disminución en los niveles de transcripción del gen reportero respecto a las células transfectadas con el promotor completo (mCK1), y además, se perdió prácticamente por completo el efecto positivo que originaba el Na_2WO_4 (Figura 6.3-B). Con estos resultados, concluimos que el factor de transcripción MEF2 debía jugar un papel relevante en el efecto positivo del Na_2WO_4 sobre el incremento en la actividad de creatina quinasa y, por extensión, en su capacidad para promover a diferenciación de las células L6 de mioblastos en miotubos.

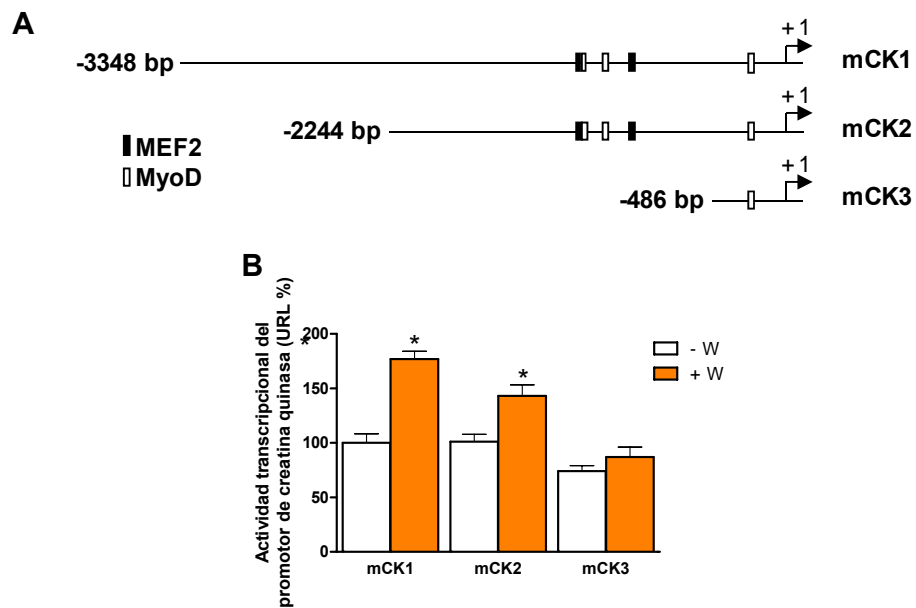


Figura 6.3. El factor de transcripción MEF2 participa en la activación del promotor de creatina quinasa mediada por Na_2WO_4 . (A) Esquema representativo del promotor de creatina quinasa que muestra los sitios putativos de unión para MEF2 y MyoD, así como las delecciones llevadas a cabo. (B) Las células transfectadas se diferenciaron en miotubos y a continuación se incubaron en ausencia o presencia de 0,5 mM Na_2WO_4 [W] durante 18-20h. Se determinó la actividad transcripcional del promotor de creatina quinasa. Los datos se normalizaron teniendo en cuenta la eficiencia de transfección y se muestran como unidades arbitrarias. Los resultados se expresan como la media \pm S.E.M. (n=4). * $p < 0,05$ comparado con las células no tratadas y transfectadas con la misma construcción. mCK, *muscle creatine kinase*.

A continuación, nos propusimos estudiar si el efecto del Na_2WO_4 estaba relacionado con una serie de factores de transcripción cuya expresión varía a lo largo del proceso de diferenciación de mioblastos a miotubos. En nuestro caso realizamos la cuantificación por *Western blot* de los factores de transcripción Pax-7, Myf-5 y MEF2D.

Pax-7 y Myf-5 se expresan en mioblastos y su expresión disminuye cuando comienza el proceso de diferenciación. Dicha disminución es muy rápida en el caso de Pax-7 y algo más prolongada en el tiempo en el caso de Myf-5 (Bentzinger *et al.*, 2012). Por el contrario, los mioblastos presentan niveles bajos de MEF2D que se van incrementando a medida que avanza el proceso de diferenciación (Zhu *et al.*, 2004).

Cuando incubamos los mioblastos L6 en medio de diferenciación, tanto la disminución en la expresión de Myf-5 como el incremento en la expresión de MEF2D se produjeron más rápidamente en las células que se cultivaron en presencia de Na_2WO_4 . En el caso de Pax-7 no se apreciaron diferencias porque a las 24 h ya se había suprimido por completo su expresión en ambos grupos (Figura 6.4).

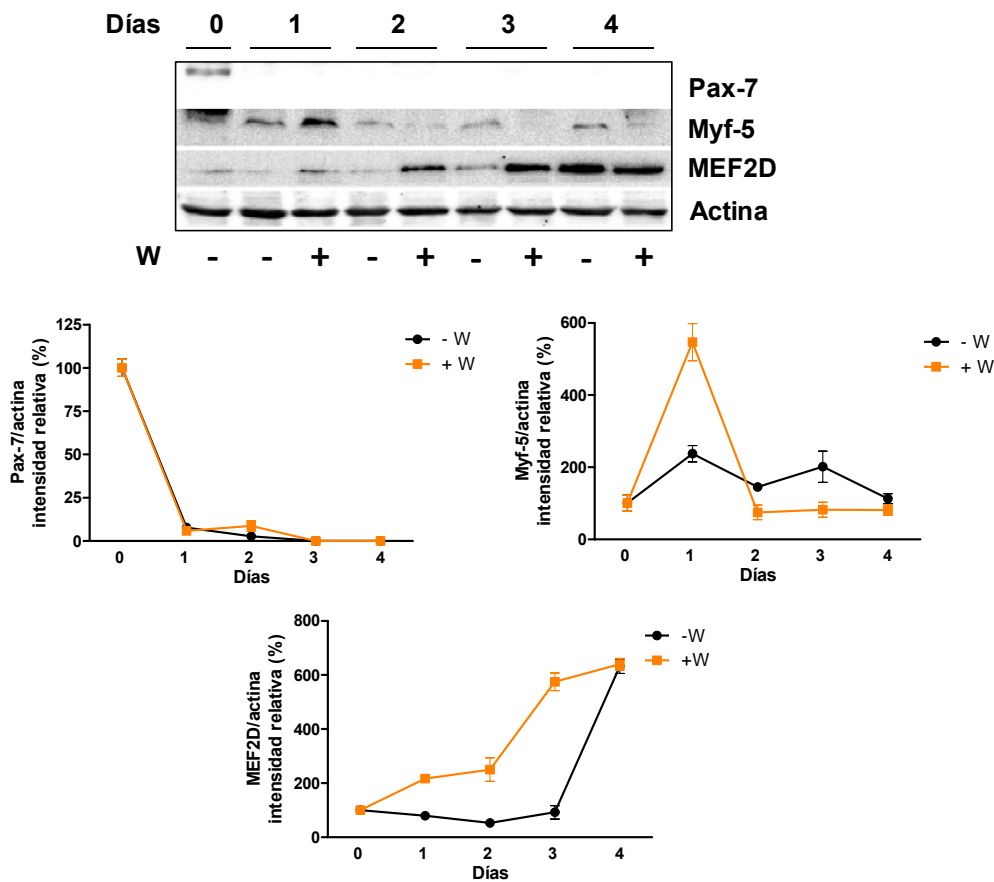


Figura 6.4. El Na_2WO_4 promueve los cambios en la expresión de factores de transcripción implicados en la diferenciación celular. Células L6 fueron cultivadas en medio de diferenciación en ausencia o presencia de 0,5 mM Na_2WO_4 [W] durante cuatro días. Se lisaron las células y se realizaron *Western blots* empleando los extractos proteicos totales y anticuerpos específicos frente a Pax-7, Myf-5, MEF2D y actina. En la parte superior de la figura se muestran membranas representativas de los resultados obtenidos. Los datos se expresan como la media \pm S.E.M. (n=4).

6.1.2 Regulación de la transcripción y expresión de MEF2D por tungstato sódico

De acuerdo con los resultados obtenidos hasta el momento y teniendo en cuenta los efectos positivos del Na_2WO_4 sobre la expresión de MEF2D, decidimos profundizar en el estudio de la expresión y regulación de este factor de transcripción.

Si bien ya habíamos comprobado que la cantidad de proteína aumentaba en presencia de Na_2WO_4 , nos propusimos estudiar qué ocurriría con los niveles de mRNA. Para ello realizamos ensayos de qPCR y obtuvimos como resultado que no se producían cambios significativos en la cantidad del mensajero de MEF2D en las células tratadas con Na_2WO_4 respecto al grupo control no tratado (Figura 6.5).

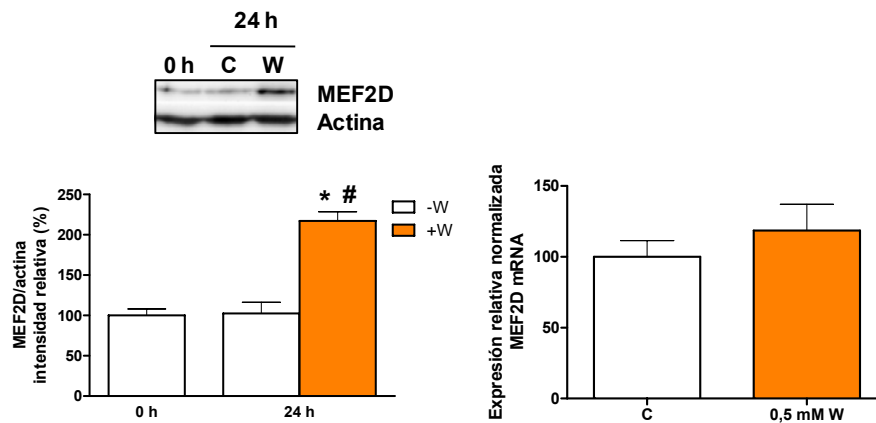


Figura 6.5. El Na_2WO_4 no modifica la expresión del mRNA de MEF2D. Células L6 fueron cultivadas en medio de diferenciación en ausencia o presencia de 0,5 mM Na_2WO_4 [W] durante 24 h. (A) Se lisaron las células y se realizaron *Western blots* empleando los extractos proteicos totales y anticuerpos específicos frente a MEF2D y actina. En la parte superior de la figura se muestran membranas representativas de los resultados obtenidos. Los datos se expresan como la media \pm S.E.M. (n=4). (B) La expresión relativa de MEF2D mRNA se calculó usando el método del $2^{-\Delta\text{Ct}}$ tomando la β -actina como gen de referencia interno. Los resultados se expresan como la media \pm S.E.M. (n=6).

Puesto que se produjo un incremento de la cantidad de proteína pero no ocurrió lo mismo con su mRNA, concluimos que la expresión de MEF2D estaría regulada a nivel postraduccional.

6.1.2.1 El tungstato sódico inhibe la sumoilación de MEF2D

Está descrito que los factores de transcripción de la familia MEF2 pueden modularse a través de modificaciones covalentes como son los procesos de fosforilación y sumoilación (ver 3.1.1.1). Cuando MEF2D es sumoilado, se procede a su degradación.

Para el estudio de la sumoilación de MEF2D, procedimos a realizar *Western blots* partiendo de extractos proteicos totales obtenidos con un tampón de lisis al que se adicionó N-etilmaleimida (NEM). Este compuesto inhibe la desumoilación de las proteínas. Los resultados mostraron que las muestras tratadas con Na_2WO_4 no originaban la señal correspondiente a MEF2D más SUMO (Figura 6.6).

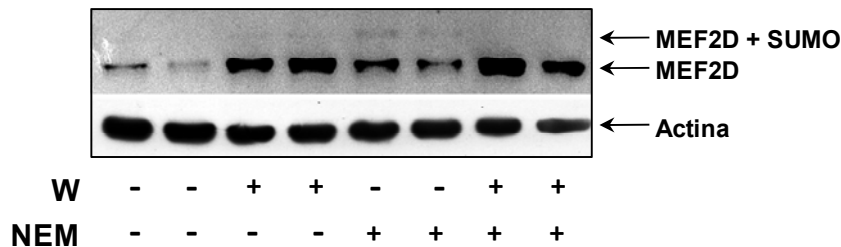


Figura 6.6. El Na_2WO_4 reduce la sumoilación de MEF2D. Células L6 se incubaron en medio de diferenciación en ausencia o presencia de Na_2WO_4 [W] durante 4 días. Se lisaron con un tampón de lisis que incluía 20 mM N-etilmaleimida [NEM] para prevenir la desumoilación de las proteínas y se realizaron *Western blots* empleando los extractos proteicos totales y anticuerpos específicos frente a MEF2D y actina. Se muestra una membrana representativa de los resultados obtenidos (n=4).

Puesto que está descrito que el ácido ginkgólico inhibe la sumoilación (Fukuda *et al.*, 2009), decidimos medir los niveles de transcripción dependiente de MEF2 en células cultivadas en presencia de dicho compuesto y de Na_2WO_4 .

El ácido ginkgólico produjo un aumento en la actividad transcripcional respecto a las células control no tratadas. Dicho incremento fue similar al originado por el Na_2WO_4 . La adición simultánea del inhibidor y efector no supuso efecto adicional alguno (Figura 6.7).

MEF2D presenta un sitio de sumoilación en K439, pero para que esta pueda llevarse a cabo es necesaria la fosforilación previa de la S444. Mediante la técnica de mutagénesis dirigida se obtuvieron diversas secuencias de DNA cuya expresión originaba mutaciones puntuales en dichos aminoácidos: K439R, S444A y S444D.

La mutación K439R previene la sumoilación de la proteína. En el caso de S444A se impide la fosforilación del resto de serina y el cambio la serina por aspartato simula en cierto modo una fosforilación permanente en dicho resto.

La secuencia de DNA silvestre y las mutadas se clonaron fusionadas a la secuencia del factor de transcripción de levaduras GAL4 para poder medir la actividad transcripcional mediada por MEF2D con el uso de genes reporteros (5.1.4.1).

En esencia, la técnica consiste en cotransfectar las células con dos vectores. Uno de ellos (pFR-Luc) contiene un promotor sintético con cinco repeticiones en tándem del sitio de unión a GAL4 de levaduras que controla la expresión de una luciferasa. El otro vector presenta el dominio de unión a DNA del factor de

transcripción de levaduras GAL4 y fusionado a él debe clonarse la secuencia que codifica para la proteína que se desea estudiar, en nuestro caso MEF2D. Los niveles de expresión de la luciferasa codificada por pFR-Luc dependerán a su vez únicamente de la expresión de MEF2D fusionado al dominio de unión a DNA de GAL4 y no interferirán en el análisis la proteína MEF2D silvestre sintetizada por la célula. Con este método se puede medir la actividad transcripcional de MEF2D en células musculares sin tener que recurrir a otras líneas celulares, que poco o nada tengan que ver con músculo, donde su expresión basal sea mínima o nula.

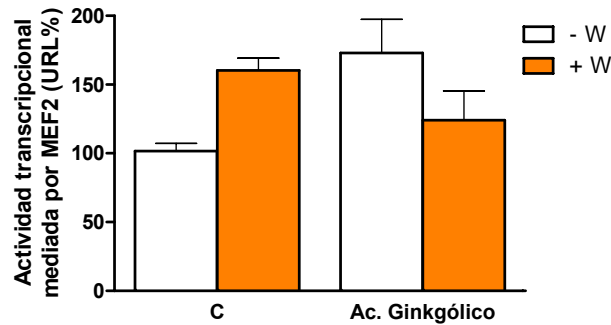


Figura 6.7. El ácido ginkgólico es un inhibidor de la sumoilación y activa la transcripción mediada por MEF2. Células L6 se diferenciaron en miotubos. A continuación se incubaron en ausencia o presencia de Na_2WO_4 [W], ácido ginkgólico o ambos durante 16 h. Los datos se normalizaron teniendo en cuenta la eficiencia de transfección y se muestran como unidades arbitrarias. Los resultados se expresan como la media \pm S.E.M. (n=4)

Los resultados muestran que cuando las células transfectadas con la construcción que incluye la secuencia de MEF2D original se incuban en presencia de Na_2WO_4 , se produce un incremento significativo de la actividad transcripcional respecto a las células del grupo control no tratado.

En el caso del mutante K439R, puesto que la sumoilación no es posible y por tanto se impide la degradación de la proteína, la actividad transcripcional es muy elevada y la adición de Na_2WO_4 al medio no supone una activación adicional (Figura 6.8).

Por otra parte, la mutación S444A supone un aumento en la actividad transcripcional puesto que no se puede llevar a cabo la fosforilación requerida para la sumoilación, pero dicho aumento no es tan elevado como en el caso anterior. En esta ocasión, la adición de Na_2WO_4 al medio de cultivo sí da lugar a una mayor actividad transcripcional respecto al grupo control transfectado con la misma construcción pero no tratado.

Finalmente, puesto que el cambio S444D simula una fosforilación permanente, MEF2D se encuentra en las condiciones adecuadas para ser sumoiledado y posteriormente degradado. En esta situación los niveles de actividad transcripcional son menores que en los casos anteriores y no se ven incrementados por la presencia de Na_2WO_4 en el medio (Figura 6.8).

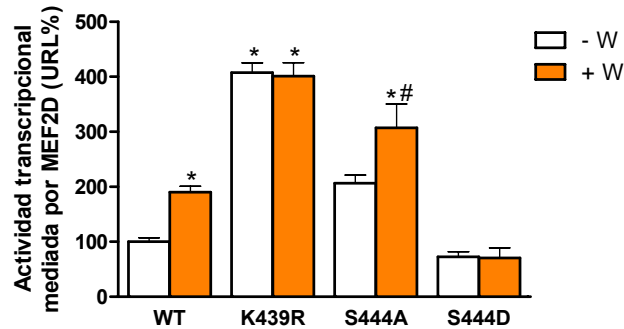


Figura 6.8. El incremento de la transcripción mediado por MEF2D debido a Na_2WO_4 está relacionado con la sumoilación en K439. Células L6 se cotransfectaron con el plásmido pCMV-GAL que incluía las distintas construcciones de MEF2D y con el plásmido pFR-Luc que incluye el gen reportero. A continuación se diferenciaron en miotubos antes de proceder al tratamiento con 0,5 mM Na_2WO_4 [W] para evaluar los niveles de transcripción dependientes de MEF2D. Los resultados fueron normalizados teniendo en cuenta la eficiencia de transfección y se muestran como unidades arbitrarias (n=4). Los datos se expresan como la media \pm S.E.M. *p<0,05 comparado con las células control no tratadas; #p<0,05 comparado con las células transfectadas con la misma construcción no tratadas.

6.1.2.2 MEF2D presenta sitios de fosforilación que modulan su actividad

Además de la sumoilación, MEF2D ve regulada su actividad a través de la fosforilación de los restos S121 y S190. Estos son susceptibles de ser fosforilados por mediación de la proteína quinasa A (PKA) dando lugar a una inhibición de la actividad del factor de transcripción (Du *et al.*, 2008).

La PKA en su forma inactiva, está constituida por dos subunidades catalíticas y dos subunidades reguladoras. Cada una de las subunidades reguladoras puede unirse a AMP cíclico (cAMP) liberándose del conjunto y activando las subunidades catalíticas. Tomando esta información, decidimos realizar ensayos con células L6 cultivadas en presencia de 8-Br-cAMP, un análogo permeable del cAMP que activa a PKA y presenta mayor resistencia a la hidrólisis.

En primer lugar abordamos el estudio de la actividad transcripcional mediante el uso de genes reporteros. Para ello se cultivaron las células en ausencia o presencia de Na_2WO_4 , 8-Br-cAMP o ambos de forma concomitante. Además, uno de los grupos se cotransfectó con DNA codificante de las subunidades catalíticas de PKA, es decir, en ausencia de las subunidades reguladoras y por tanto siempre activas.

Las células incubadas con 8-Br-cAMP presentaban valores de actividad transcripcional dependiente de MEF2 por debajo de los obtenidos con las células control no tratadas y el tratamiento con la mezcla de los dos efectores no supuso una recuperación de la actividad (Figura 6.9). Las células que expresaban las subunidades catalíticas de PKA arrojaban valores significativamente menores que el grupo control, si bien en presencia de Na_2WO_4 este efecto se revertía parcialmente.

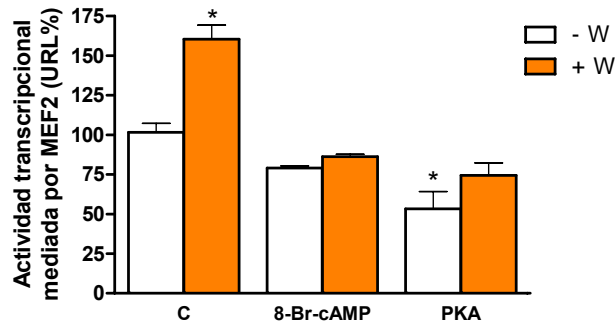


Figura 6.9. La incubación de células L6 en presencia de 8-Br-cAMP o que sobreexpresan las subunidades catalíticas de PKA presentan una disminución en la actividad transcripcional mediada por MEF2 que solo es revertida parcialmente en el segundo caso. Un grupo de células se cotransfectó con DNA codificante para las subunidades catalíticas de PKA. Las células L6 se diferenciaron en miotubos y a continuación se incubaron en ausencia o presencia de 50 μM 8-Br-cAMP, 0,5 mM Na_2WO_4 [W] o ambos durante 18-20h. Los resultados fueron normalizados teniendo en cuenta la eficiencia de transfección y se muestran como unidades arbitrarias (n=4). Los datos se expresan como la media \pm S.E.M. * $p < 0,05$ comparado con las células control no tratadas.

El siguiente paso fue estudiar la actividad transcripcional dependiente de MEF cuando se mutaban los sitios de fosforilación por PKA. Así, por mutagénesis dirigida se realizaron construcciones que incluían la mutación S121A, S190A o ambas. La sustitución de los restos de serina por alanina impide la fosforilación mediada por PKA. En esta ocasión, las distintas construcciones se transfectaron en células CHO.

Las células que se transfectaron con cualquiera de las construcciones que incluían la mutación S121A no respondían al tratamiento con Na_2WO_4 . Además, tampoco aparecían los efectos inhibitorios observados con la incubación concomitante de las células con Na_2WO_4 y 8-Br-cAMP. Estos dos fenómenos sí se producían en las células transfectadas con la construcción mutada exclusivamente en S190. Por tanto, concluimos que el resto S121 es necesario para que el Na_2WO_4 pueda mantener su efecto positivo sobre la activación de MEF2 (Figura 6.10).

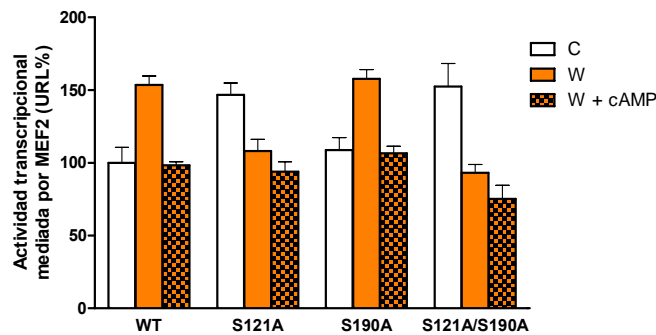


Figura 6.10. El Na₂WO₄ necesita el resto S121 para mantener sus efectos. Células CHO se transfectaron con vectores que incluían las secuencias codificantes de MEF2D silvestre [WT] y las formas mutadas [S121A, S190A, S121A, S190A] y con el vector pMEF2X4 E1b-Luc que expresa el gen reportero bajo el control de un promotor que presenta cuatro copias en tándem del sitio de unión a MEF2. Las células se incubaron en DMEM suplementado con 10% (v/v) FBS en ausencia [C] o presencia de 0,5 mM Na₂WO₄ [W], 50 μM 8-Br-cAMP [cAMP] o ambos [W + cAMP] durante 18-20h. Los resultados fueron normalizados teniendo en cuenta la eficiencia de transfección y se muestran como unidades arbitrarias. Los datos se expresan como la media ± S.E.M. (n=4).

Finalmente, cuantificamos los niveles celulares de cAMP. Esto se realizó en dos condiciones distintas: en ausencia y en presencia del diterpeno forskolina que induce la formación de cAMP (Hedin y Rosberg, 1983).

Cuando las células se incubaban en ausencia de forskolina, esto es, en condiciones basales, el Na₂WO₄ no modulaba los niveles de cAMP; sin embargo, la incubación con forskolina originó un sustancial incremento en la cantidad de cAMP respecto a las células control no tratadas que fue revertido considerablemente en las células que se cultivaron en presencia de forskolina y Na₂WO₄ (Figura 6.11).

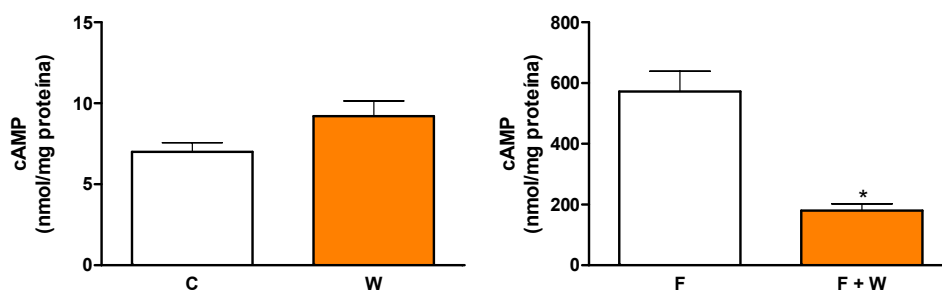


Figura 6.11. El Na₂WO₄ revierte el incremento de cAMP originado por forskolina. Células L6 se diferenciaron en miotubos y se incubaron en ausencia [C] o presencia de 0,5 mM Na₂WO₄ [W], 25 μM forskolina [F] o ambos [F+W] durante 30 min. A continuación se midieron los niveles de cAMP. Los datos se expresan como la media ± S.E.M. (n=4). *p<0,05 comparado con el grupo tratado con 25 μM forskolina.

6.2 La activación de ERK1/2 por tungstato sódico induce la síntesis y previene la degradación de proteínas en miotubos L6 de rata

Abordamos el estudio del efecto de la activación de ERK1/2 por tungstato sódico sobre el recambio proteico en miotubos L6 diferenciados. Con este fin, determinamos los índices de síntesis y degradación de proteínas y abundamos en la influencia de la activación de ERK1/2 sobre los mecanismos moleculares que participan en estos dos procesos.

6.2.1 Efectos del tungstato sódico sobre el recambio proteico

El tungstato sódico (0,1-0,5 mM) tuvo un significativo efecto positivo sobre la síntesis de proteínas (Figura 6.12-A). El efecto de 0,1 mM Na_2WO_4 fue similar al obtenido con 50 nM insulina en las mismas condiciones. Posteriormente, comprobamos si el tungstato sódico tenía la capacidad de contrarrestar los efectos de la dexametasona. La incubación de miotubos L6 con 5 μM dexametasona produjo una disminución en la síntesis (Figura 6.12-B) y un incremento en la degradación de proteínas (Figura 6.12-C). La adición de tungstato sódico a las células 48 h antes de la incubación con dexametasona incrementó la síntesis de proteínas hasta alcanzar los valores control (Figura 6.12-B) y disminuyó la degradación de proteínas inducida por dexametasona de una forma dosis dependiente.

Puesto que mTOR es un elemento central en la regulación de la síntesis de proteínas, decidimos estudiar los efectos del Na_2WO_4 sobre la fosforilación de esta quinasa (Figura 6.13-A). Se observó un incremento de la fosforilación de mTOR de forma dosis dependiente de un modo paralelo a como lo hace la síntesis de proteínas. La incubación previa con 25 nM rapamicina (un inhibidor específico de mTOR) bloqueó los efectos del tungstato sódico (Figura 6.13-B), lo que confirmó la implicación de mTOR en el mecanismo de acción del tungstato sódico sobre la síntesis de proteínas.

A continuación, nos centramos en los efectos del tungstato sódico y la insulina sobre el estado de fosforilación de ciertas quinasas que son sustratos de mTOR y que están implicadas en la regulación del inicio de la traducción del mRNA. Observamos que el tungstato sódico producía un incremento en la fosforilación de S6K1 (*ribosomal protein S6 kinase*), 4E-BP1 (*eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1*) y eIF4E (*eukaryotic translation initiation factor E*) de un modo dosis dependiente (Figura 6.13C-E). La incubación de las células con insulina condujo a una mayor fosforilación de las quinasas que cuando fueron incubadas con Na_2WO_4 .

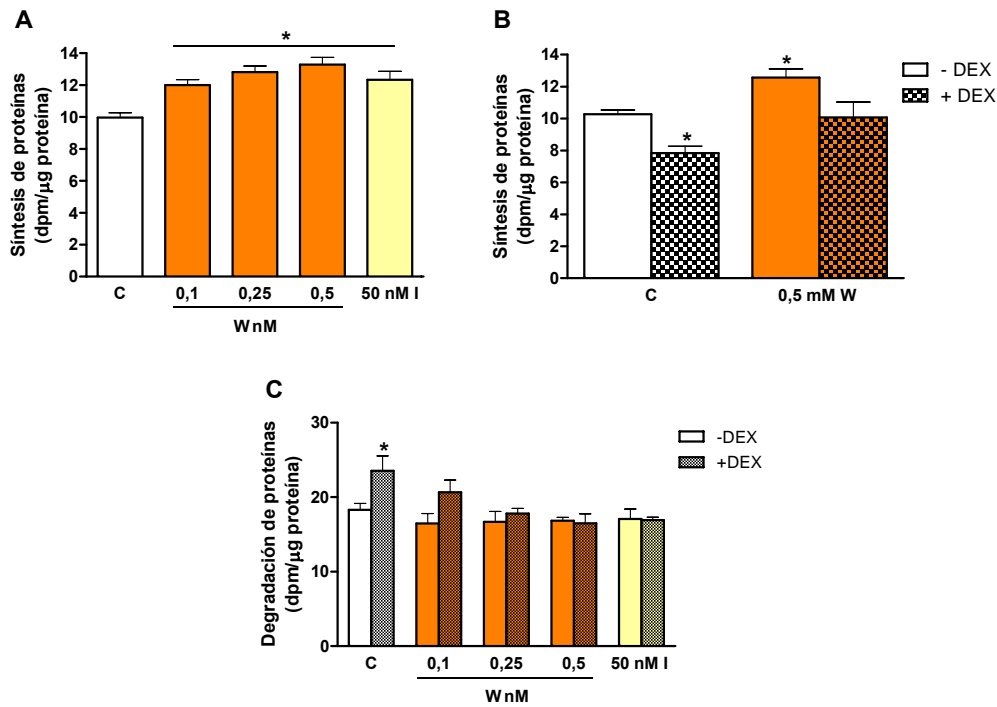


Figura 6.12. Efectos del tungstato sódico sobre el recambio proteico en miotubos L6. (A) Las células fueron incubadas durante 2 h en DMEM suplementado con 10% FBS; 0,1-0,5 mM Na_2WO_4 [W] o 50 nM insulina [I]. (B) Las células fueron incubadas durante 2 h en DMEM suplementado con 10% FBS y 0,5 mM Na_2WO_4 y posteriormente con 5 μM dexametasona en ausencia o presencia de tungstato sódico durante 1 h. (C) Las células fueron incubadas 48 h en DMEM con 10% FBS; 0,1-0,5 mM Na_2WO_4 o 50 nM insulina y posteriormente se incubaron durante 24 h con 5 μM dexametasona [DEX] en ausencia o presencia de los efectores. La síntesis de proteínas (A y B) y la degradación de proteínas (C) se determinó como se describe en 5.2.4.1 y 5.2.4.2. Los datos se han expresado en dpm/ μg de proteína. Los resultados representan la media \pm S.E.M. (n=8). * $p < 0,05$ comparado con las células no tratadas.

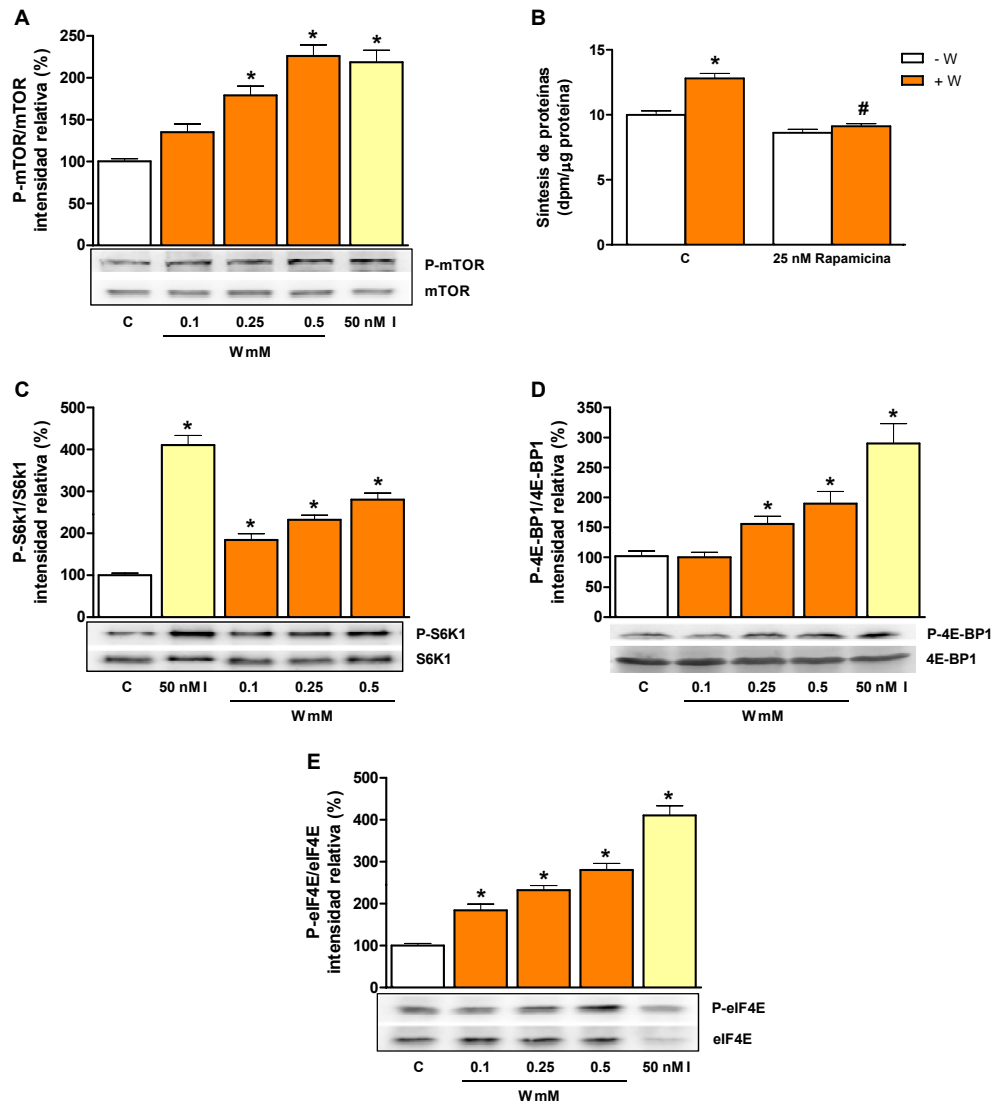


Figura 6.13 El tungstato sódico estimula la señalización a través de mTOR en miotubos L6. Los miotubos fueron incubados en ausencia de FBS entre 16 h y 18 h antes de realizar los experimentos. (A) Se trataron los miotubos con 0,1-0,5 mM Na_2WO_4 [W] o 50 nM insulina [I] en el mismo medio durante 30 min. Se lisaron las células y se realizaron *Western blots* empleando los extractos proteicos totales y anticuerpos específicos frente a mTOR y P-mTOR. Bajo la gráfica se muestra una membrana representativa de los resultados obtenidos (n=4). (B) Los miotubos se incubaron en el mismo medio suplementado con 0,5 mM Na_2WO_4 y en ausencia o presencia de 25 nM rapamicina durante 2 h. La rapamicina se añadió 30 min antes que el tungstato sódico y se mantuvo durante todo el experimento. La síntesis proteica se determinó como se indica en 5.2.4.1 (n=6). (C-E) Las células se trataron como en el apartado (A). Se lisaron y se hicieron *Western blots* usando extractos proteicos totales y anticuerpos específicos frente a S6K1 (C), 4E-BP1 (D), eIF4E (E) y sus respectivas formas fosforiladas. Bajo cada gráfica se muestra una membrana representativa de los resultados obtenidos (n=4). Los datos se expresan como la media \pm S.E.M. * $p < 0,05$ comparado con las células control no tratadas; # $p < 0,05$ comparado con las células tratadas con tungstato sódico.

6.2.2 Modulación de la señalización corriente arriba de mTOR por tungstato sódico

Las dos rutas de señalización principales en la regulación de la actividad de mTOR son las rutas de PI3K/Akt y MEK/ERK. Se conoce por estudios previos (Giron *et al.*, 2008) que el tungstato sódico no induce la fosforilación de Akt (*RAC-alpha serine/threonine-protein kinase*) en miotubos L6. Nuestros ensayos corroboraron esta observación (Figura 6.14-A) y además mostraron un incremento de la fosforilación de ERK1/2 (*extracelular signal-regulated kinase*) de un modo dosis dependiente (Figura 6.14-B). Como cabía esperar, la insulina produjo un aumento de la fosforilación en ambos casos.

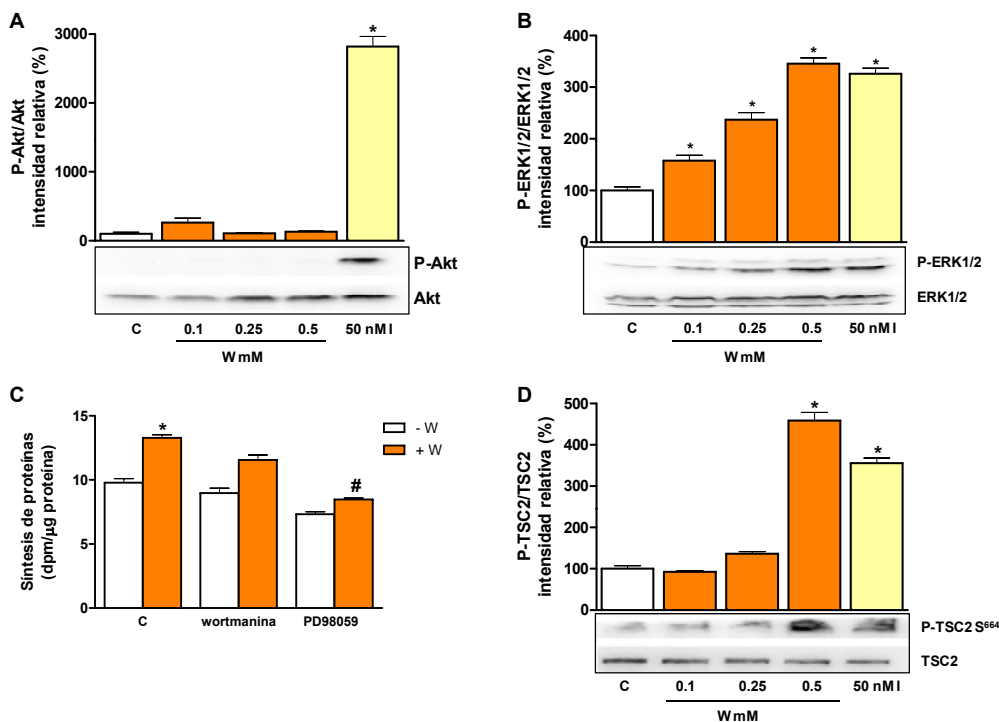


Figura 6.14. Efectos del tungstato sódico corriente arriba de mTOR en miotubos L6. Los miotubos fueron incubados en ausencia de FBS entre 16 h y 18 h antes de realizar los experimentos. (A-B) Las células se trataron con 0,1-0,5 mM Na_2WO_4 [W] o 50 nM insulina [I] en el mismo medio durante 30 min. Las células fueron lisadas y se realizaron *Western blots* empleando los extractos proteicos totales y anticuerpos específicos frente a Akt (A) o ERK1/2 (B) y sus correspondientes formas fosforiladas. (C) Las células se incubaron en el mismo medio suplementado con 0,5 mM Na_2WO_4 en ausencia o presencia de 100 nM wortmanina o 20 μM PD98059 durante 2 h. Los inhibidores se adicionaron 30 min antes que los efectores y se mantuvieron durante todo el experimento. La síntesis de proteínas se determinó como se indica en 5.2.4.1 (n=6). * $p < 0,05$ comparado con las células control no tratadas; # $p < 0,05$ comparado con las células tratadas con tungstato sódico. (D) Las células fueron tratadas como en los apartados (A) y (B) salvo que en esta ocasión se emplearon anticuerpos específicos frente a TSC2 y su forma fosforilada en S664. Bajo cada gráfica se muestran membranas representativas de los resultados obtenidos (n=4). Los datos se expresan como la media \pm S.E.M. * $p < 0,05$ comparado con las células control no tratadas.

Posteriormente, se determinó la síntesis de proteínas en ausencia y presencia de 0,5 mM Na₂WO₄ en células que habían sido incubadas previamente con inhibidores específicos de la fosforilación de Akt (100 nM wortmanina) o de la activación de ERK1/2 (20 μM PD98059). El incremento de la síntesis de proteínas mediada por tungstato sódico fue bloqueado por la incubación previa con PD98059, pero no por wortmanina. De este modo confirmamos que únicamente la activación de ERK1/2 está implicada en los efectos del Na₂WO₄ sobre la síntesis de proteínas (Figura 6.14-C).

Por otra parte, se conoce que la fosforilación de TSC2 (*tuberin*) en el resto de serina 664 es un fenómeno característico de la activación de mTOR mediada por ERK1/2 (Ma *et al.*, 2007). En este sentido, cuando las células fueron incubadas con 0,5 mM Na₂WO₄ o 50 nM insulina se observó un incremento de la fosforilación de dicho resto de serina en TSC2 (Figura 6.14-D).

6.2.3 La activación de ERK1/2 por tungstato sódico es concomitante con una disminución en la actividad de FoxO3a

En músculo, la degradación de proteínas inducida por dexametasona es mediada por la activación de los sistemas de degradación de proteínas ubiquitina-proteasoma y autofagia-lisosoma (ver 3.1.2.2). Un elemento fundamental en la regulación de ambos sistemas es el factor de transcripción FoxO3a (*forkhead box protein O*) (Cho *et al.*, 2010; Mammucari *et al.*, 2007; Sandri, 2013; Zhao *et al.*, 2007).

Con objeto de medir la actividad transcripcional dependiente de FoxO, se transfectaron células L6 con una construcción que incluía la secuencia codificante para la luciferasa de luciérnaga sensible a FoxO. A continuación se procedió a diferenciar las células a miotubos y posteriormente se incubaron con 0,5 mM Na₂WO₄ o 50 nM insulina. Pasadas 48 h, se adicionó 5 μM dexametasona al medio de cultivo y se incubaron en estas condiciones durante 24 h más. Mientras que la dexametasona indujo la expresión de la luciferasa, las células que habían sido incubadas previamente con tungstato sódico o insulina presentaban un bloqueo en el incremento de dicha expresión. Además, ni el tungstato sódico ni la insulina en ausencia de dexametasona modificaron la actividad de la luciferasa en comparación con el grupo control (Figura 6.15-A).

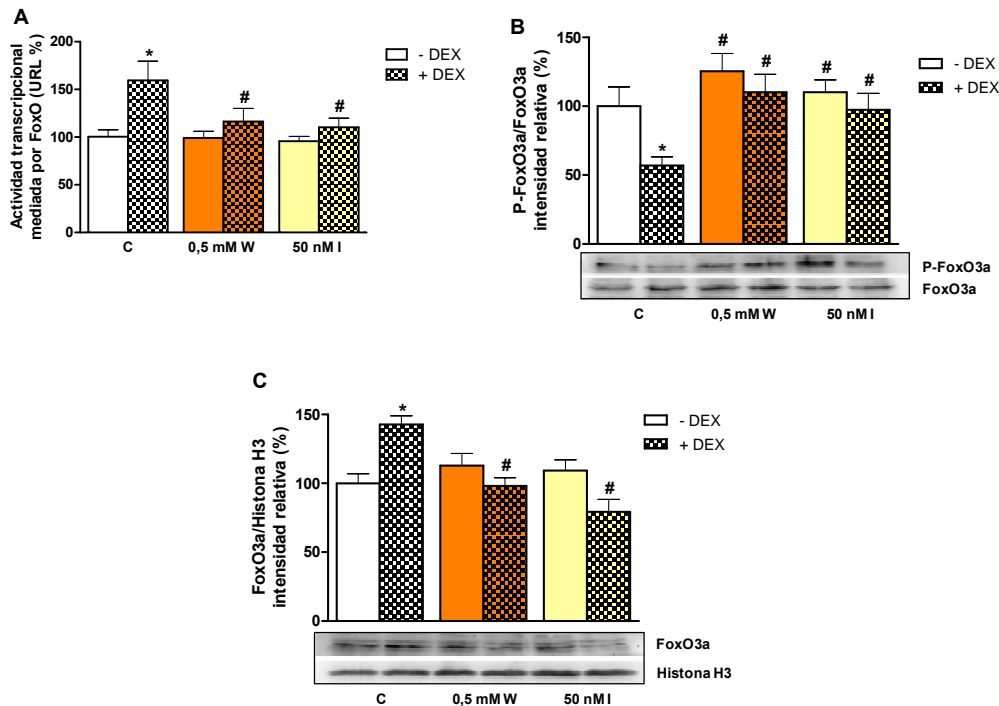


Figura 6.15. Efectos preventivos del tungstato sódico sobre la actividad transcripcional de FoxO3a y la expresión de esta proteína en el citoplasma y el núcleo de miotubos tratados con dexametasona. Las células fueron incubadas inicialmente durante 48 h en DMEM suplementado con 10% (v/v) FBS y 0,5 mM Na_2WO_4 [W] o 50 nM insulina [I]. A continuación se incubaron 24 h más con 5 μM dexametasona [DEX] en ausencia o presencia de los efectores. (A) Las células fueron transfectadas transitoriamente con un plásmido que codifica para la luciferasa de luciérnaga inducible por FoxO y posteriormente se diferenciaron en miotubos antes de proceder a los tratamientos para evaluar los niveles de transcripción dependientes de FoxO. Los resultados fueron normalizados teniendo en cuenta la eficiencia de transfección y se muestran como unidades arbitrarias (n=6). (B) FoxO3a y su forma fosforilada fueron cuantificados por *Western blot* a partir de extractos citoplasmáticos (n=4). (C) Se determinaron los niveles de FoxO3a e histona H3 en extractos nucleares por *Western blot* (n=4). Los datos se expresan como la media \pm S.E.M. * $p < 0,05$ comparado con las células control no tratadas; # $p < 0,05$ comparado con las células tratadas con dexametasona.

Si FoxO3a se encuentra fosforilada, permanece en el citoplasma como un factor de transcripción inactivo (Sanchez *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2007). Tanto el Na_2WO_4 como la insulina incrementaron la fosforilación de esta proteína en el citoplasma en comparación con las células tratadas con dexametasona y, además, contrarrestaron la disminución en el estado de fosforilación inducida por dexametasona (Figura 6.16-B). Además, extractos nucleares obtenidos a partir de

células tratadas con dexametasona mostraron incrementos en FoxO3a respecto al grupo control que no se observaron en las células tratadas con tungstato sódico o insulina (Figura 6.15-C). De nuevo, la incubación previa con ambos agentes neutralizó los efectos de la dexametasona.

Posteriormente, estudiamos la influencia de la dexametasona y el tungstato sódico sobre la regulación del sistema ubiquitina-proteasoma. Para ello, analizamos los efectos del Na_2WO_4 y la insulina sobre la regulación de la actividad del promotor de ubiquitina y la expresión de los niveles de mRNA mensajero de las dos principales ligasas de ubiquitina: MuRF1 (*muscle-specific RING finger protein 1*) y atrogin-1 (Figura 6.16). El tungstato sódico contrarrestó el incremento causado por el tratamiento con dexametasona en la transcripción dependiente del promotor de ubiquitina (Figura 6.16-A), la expresión (Figura 6.16-B y D), y los niveles de mRNA (Figura 6.16-C y E) de las dos ligasas de ubiquitina. Las diferencias observadas entre la cantidad de proteína (Figura 6.16-B) y los niveles de mRNA (Figura 6.16-C) de MuRF1 en las células tratadas con insulina más dexametasona sugieren que la expresión de dicha proteína está controlada de forma postranscripcional.

Por otra parte, LC3 (*microtubule-associated protein 1 light chain 3*), que está implicada en la formación del autofagosoma (Mizushima *et al.*, 2010; Sandri, 2013), está codificada por uno de los genes cuya expresión es incrementada por mediación de FoxO3a. Para estudiar si el tungstato sódico está también involucrado en la proteólisis lisosomal, llevamos a cabo *Western blots* para LC3. Esta proteína es cortada y conjugada a fosfatidiletanolamina durante la creación de los autofagosomas dando lugar a una forma denominada LC3-II que migra más rápidamente (Ohsumi, 2001). La intensidad de las bandas de LC3-II mostrada se calculó en relación a la intensidad de las bandas para actina obtenidas en la misma membrana.

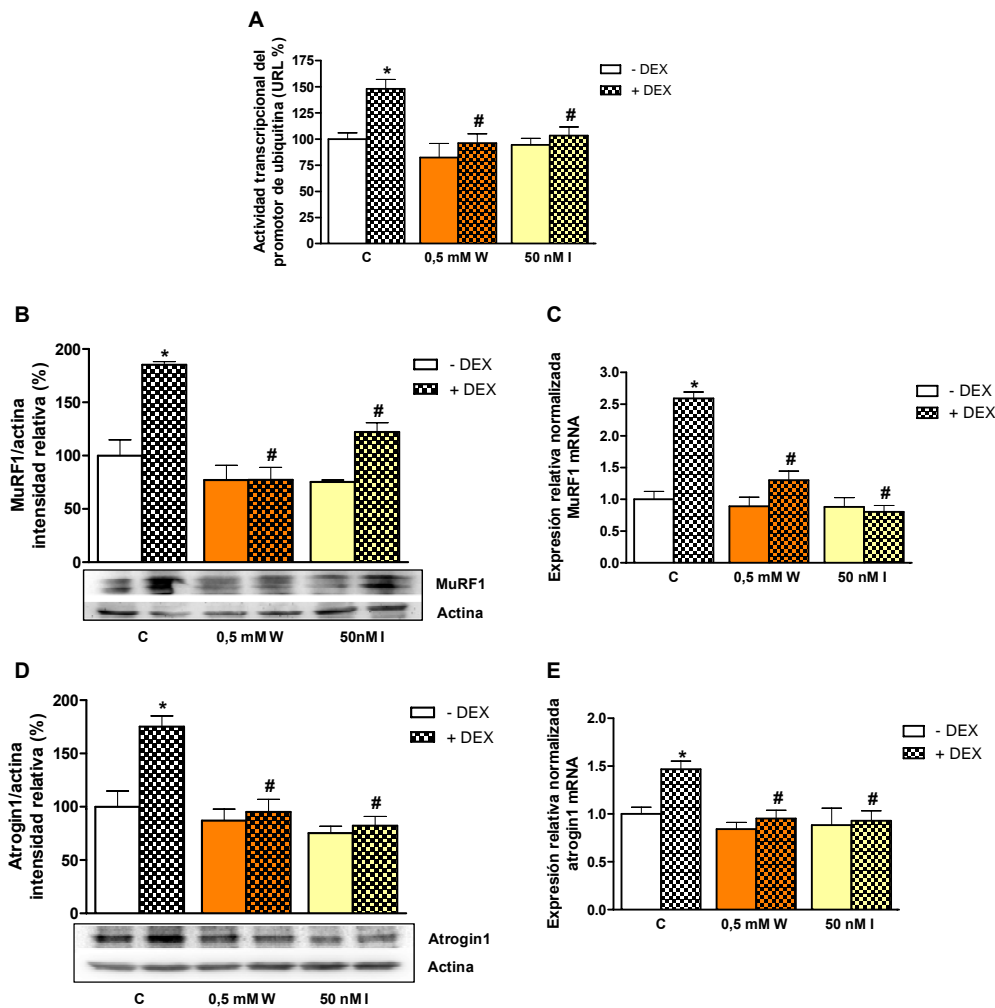


Figura 6.16. El tungstato sódico disminuye la actividad transcripcional del promotor de ubiquitina C y la expresión de MuRF1 y atrogin-1 en miotubos tratados con dexametasona. Las células fueron incubadas inicialmente durante 48 h en DMEM suplementado con 10% (v/v) FBS y 0,5 mM Na_2WO_4 [W] o 50 nM insulina [I] y a continuación se incubaron 24 h más con 5 μM dexametasona [DEX] en ausencia o presencia de los efectores. (A) Las células se transfectaron transitoriamente con un plásmido que contiene la secuencia que codifica para la luciferasa de luciérnaga bajo el control del promotor de ubiquitina C. A continuación se diferenciaron en miotubos antes de proceder a los tratamientos para evaluar la actividad transcripcional del promotor. Los resultados se normalizaron teniendo en cuenta la eficiencia de transfección y se muestran como unidades arbitrarias (n=6). La expresión de las proteínas MuRF1 (B) y atrogin-1 (D) se evaluó mediante *Western blot* de extractos proteicos totales y el uso de anticuerpos específicos. Los niveles de actina se emplearon como control de carga (n=4). Los niveles de mRNA de MuRF1 (C) y atrogin-1 (E) se midieron por PCR en tiempo real en muestras de todos los grupos experimentales. La expresión relativa de mRNA se calculó usando el método del $2^{-\Delta\text{Ct}}$ tomando la β -actina como gen de referencia interno (n=8). Los datos se expresan como la media \pm S.E.M. *p<0,05 comparado con las células control no tratadas; #p<0,05 comparado con las células tratadas con dexametasona.

La incubación con dexametasona se asocia con una acumulación de LC3-II, pero este efecto fue bloqueado cuando se realizó una incubación previa con tungstato sódico o insulina (Figura 6.17-A).

Cuando procedimos a bloquear la degradación lisosomal de los autofagosomas empleando bafilomicina A1 (Mizushima *et al.*, 2010), se observó un incremento significativo en la expresión de LC3-II en las células tratadas con dexametasona (Figura 6.17-B). Este aumento fue contrarrestado tanto por el tungstato sódico como por la insulina.

La expresión de p62/SQSTM1 (*sequestosome 1*) también fue determinada (Figura 6.17-C). Esta proteína es incorporada en el autofagosoma a través de la interacción con LC3 (Komatsu e Ichimura, 2010; Mizushima *et al.*, 2010). Mientras que el tratamiento con dexametasona originó la disminución de la expresión de p62, la incubación previa con tungstato sódico o insulina bloqueó este efecto.

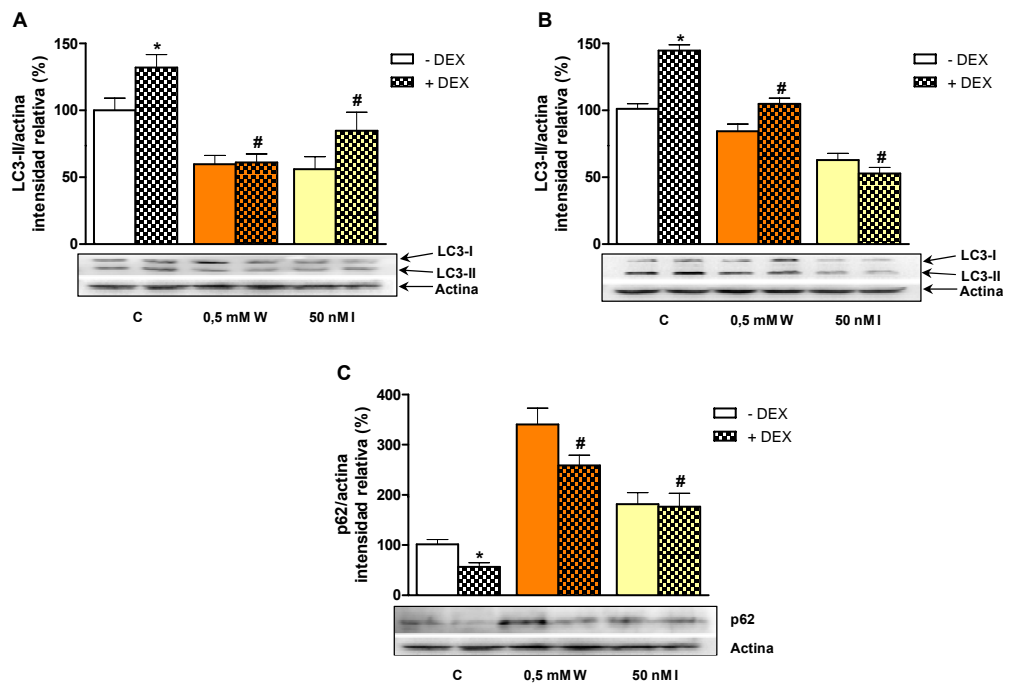


Figura 6.17. Regulación de la expresión de LC3 y p62 por el tungstato sódico en microtubulos tratados con dexametasona. Las células fueron incubadas inicialmente durante 48 h en DMEM suplementado con 10% (v/v) FBS y 0,5 mM Na_2WO_4 [W] o 50 nM insulina [I] y a continuación se incubaron 24 h más con 5 μM dexametasona [DEX] en ausencia o presencia de los efectores. Las células se lisaron y se hicieron *Western blots* usando extractos proteicos totales y anticuerpos específicos frente a LC3 (A, B) y p62 (C). Se llevaron a cabo en ausencia (A) y presencia (B) de bafilomicina A1, en cuyo caso se adicionó simultáneamente con la dexametasona y se mantuvo durante todo el experimento. Las membranas de LC3 muestran dos bandas correspondientes a LC3-I y la forma lipídada LC3-II. La intensidad de las bandas de LC3-II y p62 se calculó en relación a la intensidad de las bandas para actina obtenidas en la misma membrana. Los datos se expresan como la media \pm S.E.M. (n=4) * $p < 0,05$ comparado con las células control no tratadas; # $p < 0,05$ comparado con las células tratadas con dexametasona.

Para confirmar los efectos del tungstato sódico sobre la prevención de la autofagia, transfectamos células L6 con un plásmido que presenta la secuencia codificante de la proteína quimérica GFP-LC3 y que permite observar la formación de autofagosomas empleando un microscopio de fluorescencia (Mammucari *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2007) (Figura 6.18). Estos experimentos se llevaron a cabo en presencia de bafilomicina A1. El tratamiento con dexametasona dio lugar a un incremento en la formación de autofagosomas; sin embargo las células tratadas previamente con tungstato sódico mostraron una disminución en dicho parámetro.

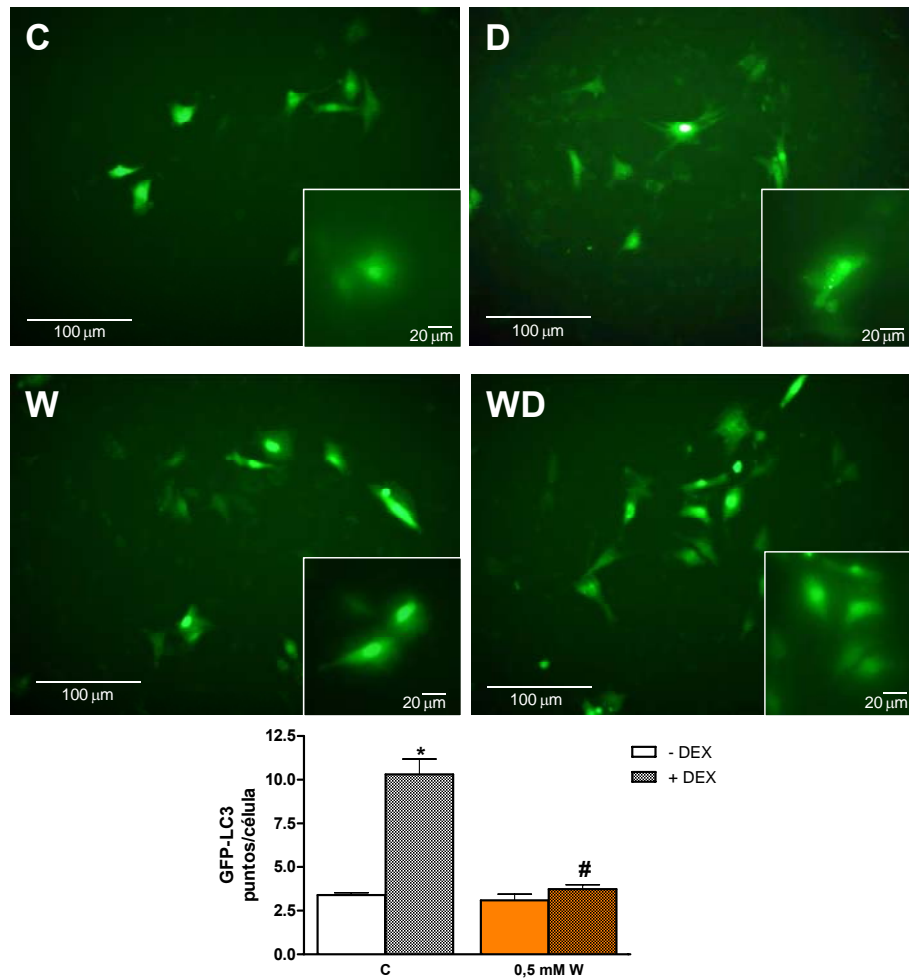


Figura 6.18. Regulación de la formación de autofagosomas por mediación del tungstato sódico en miotubos tratados con dexametasona. Los experimentos se realizaron como se describe en 5.2.2.8 y en presencia de bafilomicina A1. En los grupos tratados con 0,5 mM Na_2WO_4 [W], este se adicionó al medio de cultivo 30 min antes de añadir 5 μM dexametasona [DEX]. En estas condiciones se incubaron durante 30 min más. La formación de autofagosomas se analizó mediante microscopía confocal de fluorescencia y se hizo un recuento de los puntos por célula. Los resultados se expresan como la media \pm S.E.M. (n=4). * $p < 0,05$ comparado con las células control no tratadas; # $p < 0,05$ comparado con las células tratadas con dexametasona.

Para obtener un mejor conocimiento de la regulación del sistema autofagia-lisosoma, se midieron los niveles de mRNA de Bnip3 (*BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3*). Tanto el tungstato sódico como la insulina revertieron el incremento en los niveles de mRNA de Bnip3 causado por el tratamiento con dexametasona (Figura 6.19).

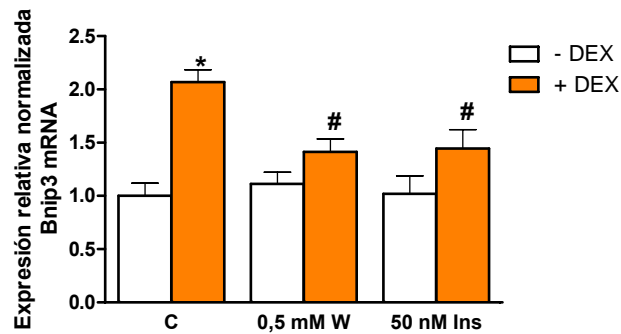


Figura 6.19. El tungstato sódico disminuye los niveles de mRNA de Bnip3 en miotubos tratados con dexametasona. Las células se incubaron durante 48 h en DMEM suplementado con 10% FBS y 0,5 mM Na_2WO_4 [W] o 50 nM insulina [I]. A continuación se adicionó 5 μM dexametasona [DEX] al medio de cultivo y se incubaron 24 h más en ausencia o presencia de los efectores. Los niveles de mRNA de Bnip3 se midieron por PCR en tiempo real en muestras de todos los grupos experimentales. La expresión relativa de mRNA se calculó usando el método del $2^{\Delta\text{Ct}}$ tomando la β -actina como gen de referencia interno. Los resultados se expresan como la media \pm S.E.M. (n=8). * $p < 0,05$ comparado con las células control no tratadas; # $p < 0,05$ comparado con las células tratadas con dexametasona.

6.3 El tungstato sódico induce la diferenciación y protege de la apoptosis debida a estrés oxidativo en células Neuro2a

La plasticidad neuronal es un campo de investigación que en la actualidad está recibiendo mucha atención. La posibilidad de formar nuevas sinapsis neuronales a la vez que prevenir la muerte neuronal es el objetivo de aquellas terapias que pretenden disminuir, o al menos enlentecer, el avance de los procesos neurodegenerativos asociados con el envejecimiento o la enfermedad. Un modelo simple para el estudio de la plasticidad neuronal lo constituyen cultivos de la línea de neuroblastos murinos Neuro2a (Arsenault *et al.*, 2014).

Primero estudiamos el efecto del Na_2WO_4 sobre el proceso de diferenciación de células Neuro2a. Para ello, se observó la formación de neuritas frente a un grupo control y se cuantificaron marcadores moleculares de diferenciación. Posteriormente, se abordó el estudio del posible efecto neuroprotector del Na_2WO_4 frente al estrés oxidativo mediante ensayos de apoptosis y formación de autofagosomas.

6.3.1 El tungstato sódico induce la diferenciación de células Neuro2a

Se incubaron células Neuro2a en ausencia o presencia de Na_2WO_4 y se cuantificó la formación de neuritas a lo largo del tiempo. Este parámetro se considera un indicador de diferenciación de neuroblastos en neuronas. El porcentaje de células diferenciadas fue significativamente mayor en el grupo tratado que en el control tanto a las 24 como las 48 h (Figura 6.20-A).

Al observar las células en el microscopio y realizar el recuento de neuritas, pudimos apreciar que el número total de células por campo era menor en el grupo tratado que en el grupo control y que la diferencia se incrementaba con el tiempo. Dicha observación nos llevó a plantearnos el estudio de los efectos del Na_2WO_4 sobre la proliferación de las células Neuro2a. Para ello realizamos un ensayo de viabilidad celular basado en MTT (ver 5.2.2.9). Los resultados obtenidos demostraron que, efectivamente, las células tratadas seguían creciendo, pero a una velocidad significativamente menor a como lo hacían las células del grupo control (Figura 6.20-B).

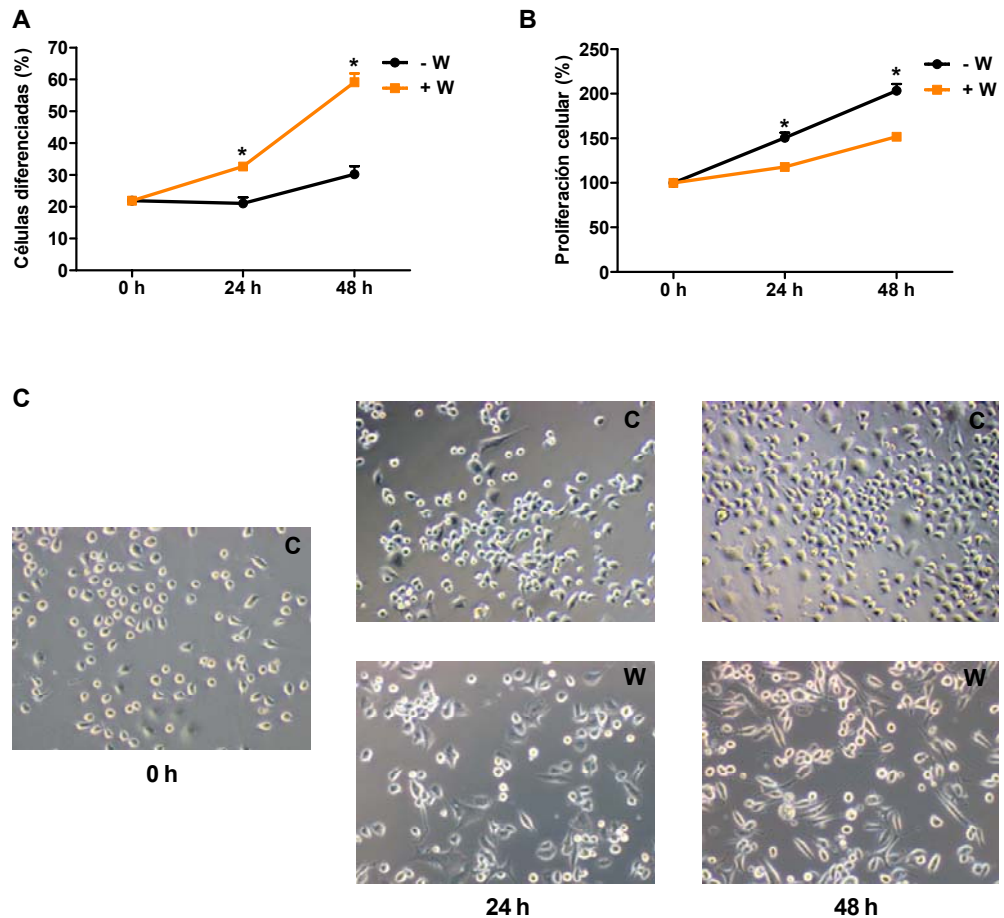


Figura 6.20. El Na_2WO_4 induce la diferenciación de las células Neuro2a en neuronas y enlentece la proliferación. Las células fueron incubadas en DMEM suplementado con 0,5% (v/v) FBS y en ausencia o presencia de 1 mM Na_2WO_4 [W] durante 48 h. (A) Se realizó el recuento de neuritas a las 0, 24 y 48 h. Los datos se han expresado como el porcentaje de células que presentan neuritas sobre el número total de células. Los resultados representan la media \pm S.E.M. (n=4). (B) Se realizaron ensayos de MTT a las 0, 24 y 48 h. Los resultados representan la media \pm S.E.M. (n=6). (C) Las imágenes muestran un ejemplo representativo del estado de los cultivos en los tiempos en que se realizaron los recuentos de neuritas y los ensayos de MTT. * $p < 0,05$ comparado con las células control no tratadas.

Además del recuento de la formación de neuritas, estudiamos la diferenciación celular con marcadores moleculares. Cuando los neuroblastos se diferencian en neuronas, se incrementa la expresión del enzima acetilcolinesterasa cuya función es hidrolizar el neurotransmisor acetilcolina (Bigbee *et al.*, 2000). Así pues, determinamos mediante *Western blot* los niveles del enzima en ausencia o presencia de Na_2WO_4 . Las células tratadas presentaban niveles significativamente mayores de acetilcolinesterasa que las células del grupo control (Figura 6.21-A).

Posteriormente nos interesamos por conocer qué tipo de neuronas se estaban formando. Para dilucidar esta cuestión procedimos a realizar qPCR de varios genes que inducen su expresión en función de qué tipo de neurona se está formando. Así pues, medimos los niveles de expresión de tirosina hidroxilasa y Nurr1, que aumentan su expresión en neuronas dopaminérgicas (Volpicelli *et al.*, 2004; White y Thomas, 2012), y colina O-acetiltransferasa (Chat) que lo hace en el caso de las neuronas colinérgicas (Butcher *et al.*, 1992). En el caso de las células tratadas con Na_2WO_4 se produjo un incremento de Chat, pero no así de Th y Nurr1 (Figura 6.21-B) por lo que podemos decir que las células Neuro2a cultivadas en presencia de Na_2WO_4 se diferencian en neuronas de tipo colinérgico.

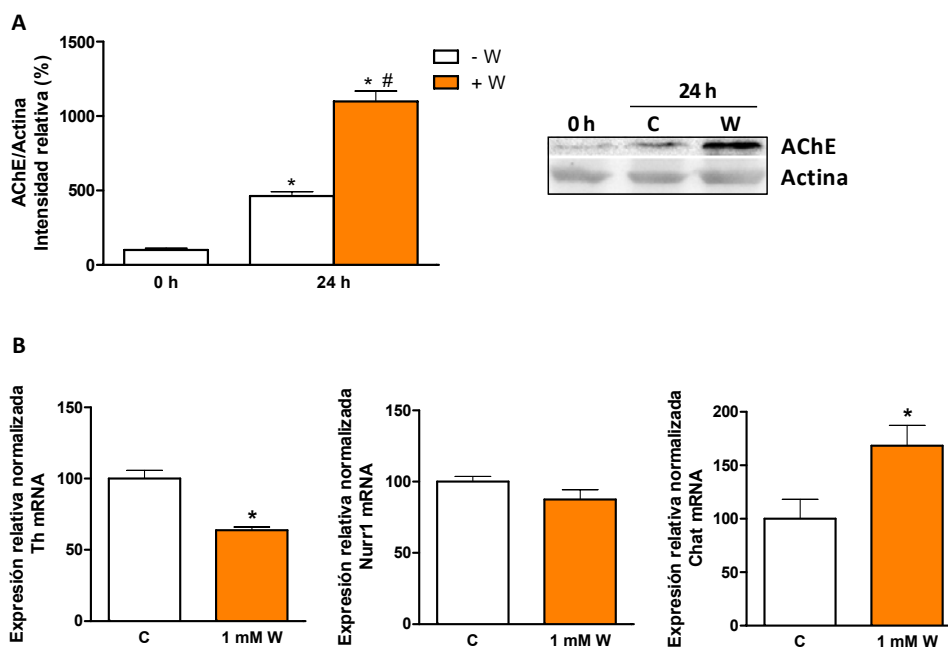


Figura 6.21. El Na_2WO_4 produce una sobreexpresión de marcadores moleculares de diferenciación neuronal. Las células se incubaron en DMEM suplementado con 0,5% (v/v) FBS en ausencia o presencia de 1 mM Na_2WO_4 [W] durante 24 h. (A) Se lisaron las células y se realizaron *Western blots* empleando los extractos proteicos totales y anticuerpos específicos frente a acetilcolinesterasa (AChE) y actina. Junto a la gráfica se muestran membranas representativas de los resultados obtenidos. Los datos se expresan como la media \pm S.E.M. (n=4). * $p < 0,05$ comparado con las células control no tratadas a tiempo 0 h. # $p < 0,05$ comparado con las células control no tratadas a tiempo 24 h. (B) Se extrajo el RNA, se retrotranscribió el mRNA y se realizaron qPCR para los genes tirosina hidroxilasa (Th), Nurr1 y colina O-acetiltransferasa (Chat). Los datos se expresan como la media \pm S.E.M. (n=4) * $p < 0,05$ comparado con las células control no tratadas.

También es conocido que el factor de transcripción MEF2D se expresa en neuronas diferenciadas (Lam y Chawla, 2007). Tomando esta información como punto de partida, procedimos al estudio de la expresión y actividad de MEF2D en Neuro2a.

Cuando las células eran tratadas con Na_2WO_4 , apreciábamos un incremento en los niveles de la proteína MEF2D respecto a las células control no tratadas (Figura 6.22-A). Experimentos para la determinación de la actividad transcripcional de MEF2D con el uso de genes reporteros (luciferasa) también mostraron que dicha actividad era mayor en las células tratadas que en el grupo control (Figura 6.22-B).

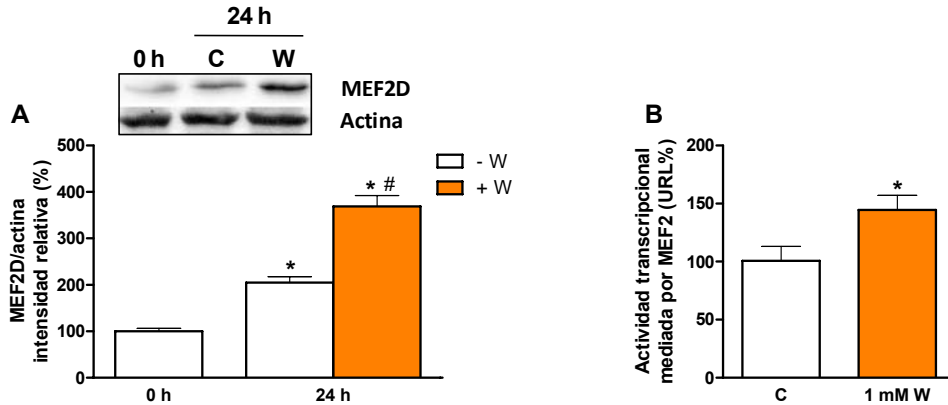


Figura 6.22. El Na_2WO_4 incrementa la expresión de MEF2D, su actividad transcripcional. (A) Células Neuro2a se cultivaron en DMEM suplementado con 0,5% (v/v) FBS en ausencia o presencia de 1 mM Na_2WO_4 [W] durante 24 h. Se lisaron las células y se realizaron *Western blots* empleando los extractos proteicos totales y anticuerpos específicos frente a MEF2D y actina. Sobre la gráfica se muestran membranas representativas de los resultados obtenidos. Los datos se expresan como la media \pm S.E.M. (n=4). * $p < 0,05$ respecto a las células control no tratadas en el tiempo 0 h. # $p < 0,05$ comparado con las células control no tratadas en el tiempo 24 h (B) Las células se cultivaron como se indica en (A) y se midió la actividad transcripcional mediada por MEF2 mediante el uso de genes reporteros. Los datos se expresan como la media \pm S.E.M. (n=6). * $p < 0,05$ respecto a las células control no tratadas.

Por otra parte, MEF2D, como cualquier factor de transcripción, presenta una localización nuclear para poder llevar a cabo su acción; sin embargo, su degradación se produce en el citoplasma mediante el proceso de autofagia mediada por chaperona (CMA: *chaperone-mediated autophagy*) (Yang *et al.*, 2009). La ausencia de suero bovino fetal en el medio de cultivo activa la CMA y, por otra parte, el NH_4Cl inhibe el paso final de degradación proteica. Combinando estos dos factores y empleando una proteína quimérica MEF2D-GFP, pudimos comprobar que las células cultivadas en ausencia de suero y presencia de Na_2WO_4 presentaban menores niveles de fluorescencia (y por tanto MEF2D) en el citoplasma que las células del grupo control (Figura 6.23). Entendemos, por tanto, que el Na_2WO_4 previene la exportación de MEF2D desde el núcleo al citoplasma impidiendo su degradación y prolongando de este modo su acción como factor de transcripción que participa en la diferenciación neuronal.

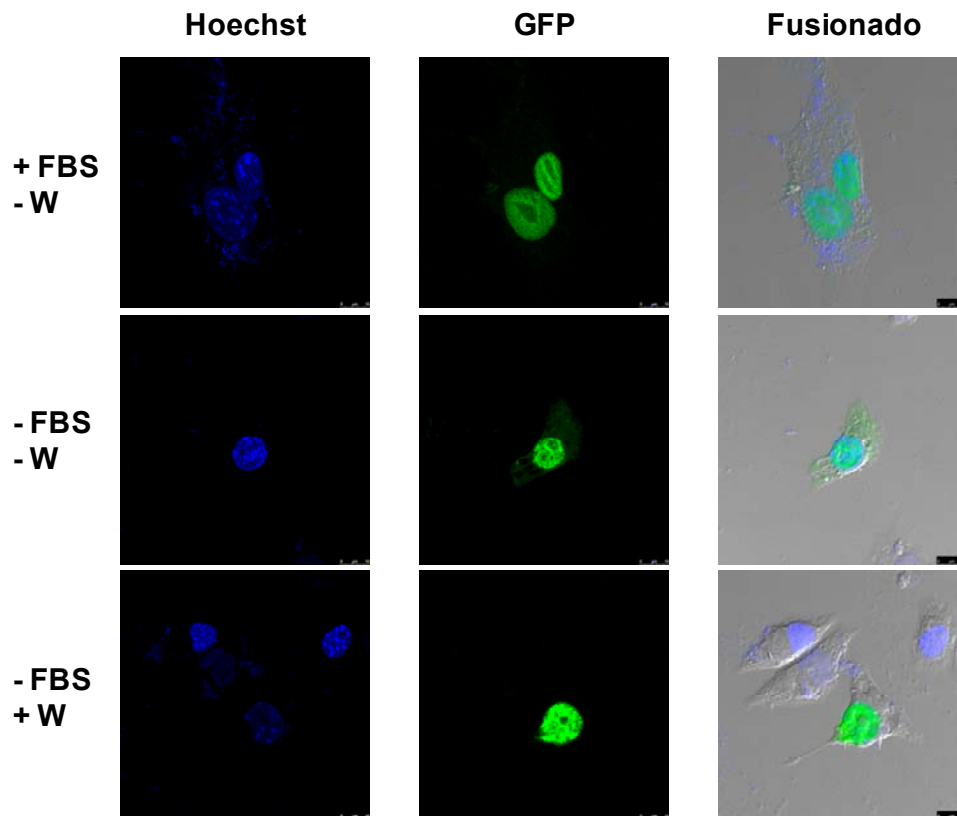


Figura 6.23 El Na_2WO_4 disminuye la degradación de MEF2D por autofagia mediada por chaperona. Las células se cultivaron en DMEM suplementado con 20 mM NH_4Cl y en ausencia o presencia de 10% (v/v) FBS y Na_2WO_4 [W]. Se tomaron fotografías de microscopía confocal para la emisión de Hoescht, GFP-MEF2D y la fusión de ambas sobre la imagen de campo claro que permite observar con precisión la región correspondiente al citoplasma.

Según diversos estudios, es necesaria la activación sostenida en el tiempo de ERK1/2 para que se produzca la diferenciación neuronal (Li *et al.*, 2006; Marshall, 1995). Otros estudios muestran que la vía de Akt también participa en el proceso de diferenciación (Lee *et al.*, 2015; Qiao *et al.*, 2012). Con estos antecedentes, nos dispusimos a estudiar el efecto del Na_2WO_4 sobre estas dos quinasas.

En el caso de ERK1/2, las células que fueron cultivadas en presencia de Na_2WO_4 durante 24 h presentaban unos niveles significativamente mayores de la enzima fosforilada que las células del grupo control no tratado para ese mismo tiempo. Por su parte, al medir los niveles de fosforilación de Akt en las condiciones que acabamos de describir, no se observaron diferencias significativas (Figura 6.24).

Así pues, parece claro que el Na_2WO_4 activa a ERK1/2 pero no a Akt, al menos de forma mantenida en el tiempo (24 h).

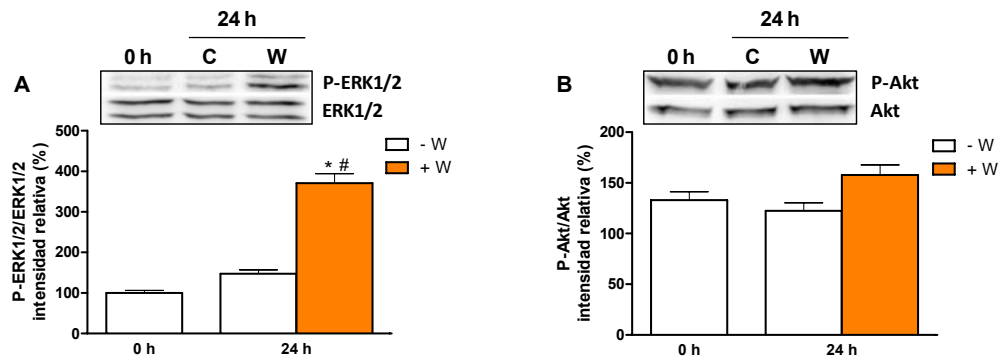


Figura 6.24. El Na_2WO_4 activa a ERK1/2 de forma mantenida en el tiempo, pero no tiene el mismo efecto sobre Akt. Células Neuro2a fueron cultivadas en DMEM suplementadas con 0,5% (v/v) FBS en ausencia o presencia de 1 mM Na_2WO_4 . Se lisaron las células y se realizaron *Western blots* empleando los extractos proteicos totales y anticuerpos específicos frente a ERK1/2 (A), Akt (B) y sus correspondientes formas fosforiladas. Sobre las gráficas se muestran membranas representativas de los resultados obtenidos. Los datos se expresan como la media \pm S.E.M. (n=4). *p<0,05 comparado con las células control no tratadas a tiempo 0 h; #p<0,05 comparado con las células control no tratadas a tiempo 24 h.

A la vista de estos datos, decidimos estudiar la influencia de estas quinasas sobre la diferenciación de Neuro2a. Para ello se prepararon cultivos celulares en ausencia o presencia de PD98059 y LY294002 que son inhibidores de la activación de ERK1/2 y Akt, respectivamente. A continuación se procedió a determinar el porcentaje de células diferenciadas por recuento de neuritas.

Los resultados mostraron que, en condiciones basales, no se requería la ruta de Ras-Raf-MAPK/ERK para que se llevara a cabo la diferenciación, pero sí era necesaria para que el Na_2WO_4 ejerciera su efecto positivo sobre este proceso. Cuando se inhibía la ruta de PI3K/Akt, se suprimía completamente la diferenciación (Figura 6.25).

Podemos concluir que para que el Na_2WO_4 pueda promover la diferenciación neuronal se necesita que la ruta de Ras-Raf-MAPK/ERK se encuentre activa y que la ruta de PI3K/Akt no se encuentre inhibida.

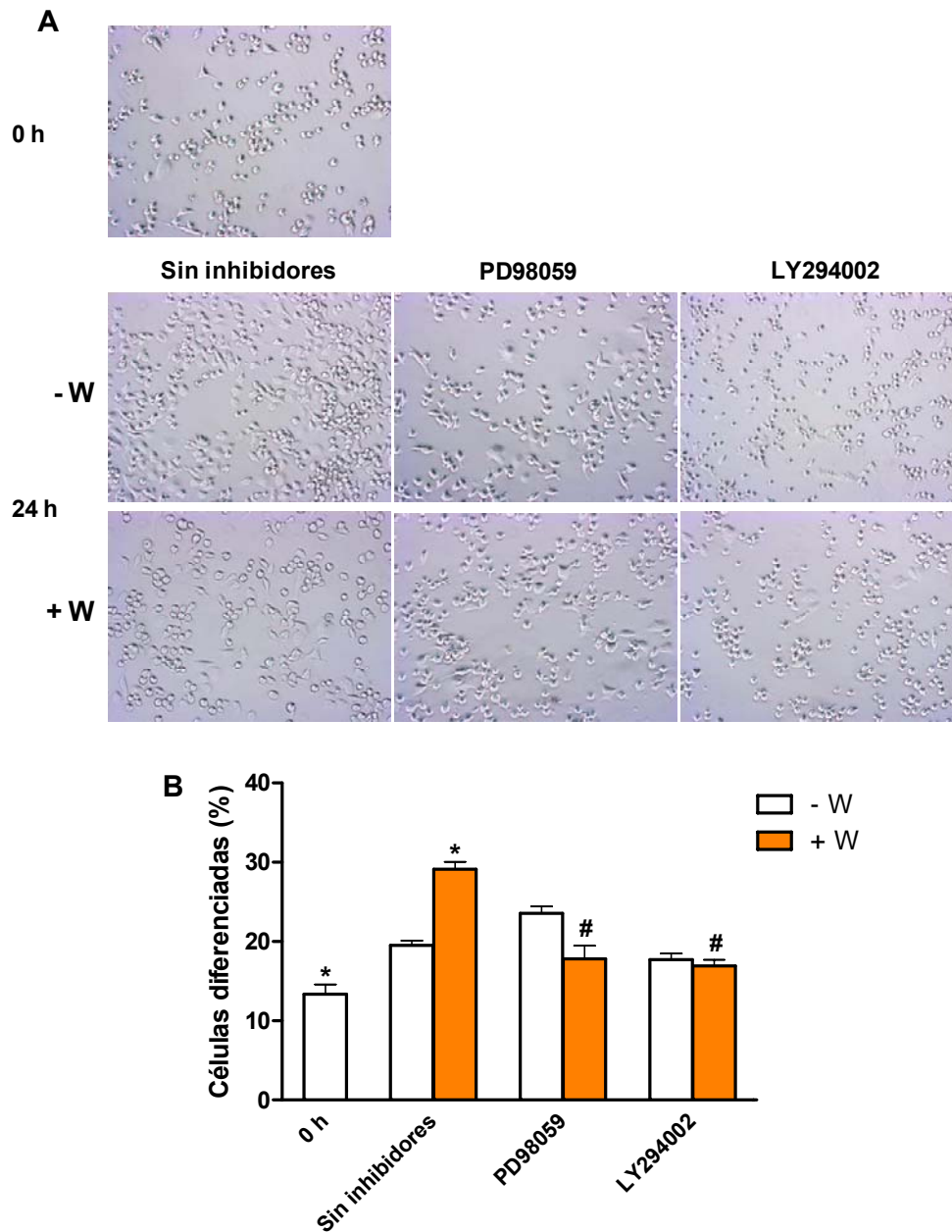


Figura 6.25. Las rutas de señalización Ras-Raf-MAPK/ERK y PI3K/Akt no deben estar inhibidas para que el Na_2WO_4 pueda ejercer su efecto positivo sobre la diferenciación neuronal. Células Neuro2a se incubaron en DMEM suplementado con 0,5% (v/v) FBS en ausencia o presencia de 1 mM Na_2WO_4 [W] y los inhibidores PD98059 y LY294002. (A) Las imágenes muestran un ejemplo representativo del estado de los cultivos en los tiempos en que se realizaron los recuentos de neuritas. (B) Se realizó el recuento de neuritas a las 0 y 24 h. Los datos se han expresado como el porcentaje de células que presentan neuritas sobre el número total de células. Los resultados representan la media \pm S.E.M. (n=4). * $p < 0,05$ comparado con células no tratadas sin inhibidores a las 24 h. # $p < 0,05$ comparado con células tratadas con Na_2WO_4 y sin inhibidores a las 24 h.

Se ha descrito que la expresión de las proteínas durante la diferenciación celular está controlada principalmente por los cambios en la síntesis de dichas proteínas y no tanto por los niveles de degradación (Kristensen *et al.*, 2013). Puesto que ya comprobamos que el Na_2WO_4 favorece la diferenciación de las células Neuro2a en neuronas, decidimos estudiar qué ocurría con la síntesis de proteínas.

En este caso, las células tratadas con Na_2WO_4 presentaron un incremento significativo de este proceso en comparación con el grupo control no tratado (Figura 6.26).

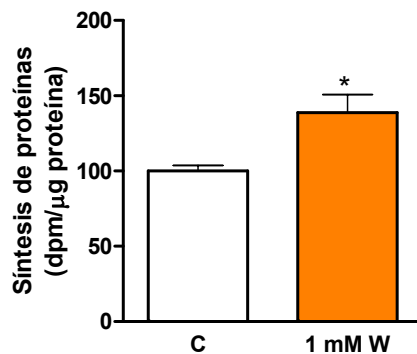


Figura 6.26. El Na_2WO_4 incrementa la síntesis de proteínas en células Neuro2a. Las células se cultivaron en DMEM suplementado con 10% (v/v) FBS en ausencia o presencia de 1 mM Na_2WO_4 durante 2 h. La síntesis de proteínas se determinó como se indica en 5.2.4.1. Los datos se han expresado en dpm/μg de proteína. Los resultados representan la media \pm S.E.M. (n=8). *p<0,05 comparado con las células control no tratadas.

6.3.2 El tungstato sódico protege frente a la muerte celular producida por estrés oxidativo

El daño generado en macromoléculas (lípidos, proteínas, DNA) como consecuencia del estrés oxidativo es un factor común presente en algunas de las enfermedades neurodegenerativas de mayor prevalencia, como son la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, Huntington y esclerosis lateral amiotrófica (Niedzielska *et al.*, 2015).

En este sentido, decidimos abordar el estudio de cómo afecta el estrés oxidativo a las células Neuro2a en cuanto a su viabilidad y el posible efecto paliativo que pudiera tener el Na_2WO_4 sobre la muerte celular.

Para el estudio de la viabilidad de las células Neuro2a en presencia de H_2O_2 se realizaron ensayos MTT (ver 5.2.2.9). Cuando las células eran incubadas en presencia de H_2O_2 , observamos que transcurridas 48 h, más del 75% de las células morían. Si la incubación se realizaba concomitantemente con Na_2WO_4 , la mortalidad se revertía de forma dosis dependiente hasta su práctica desaparición en el caso de la concentración más alta ensayada, esto es, 1 mM Na_2WO_4 (Figura 6.27). Por esta razón elegimos dicha concentración para la realización del resto de experimentos de esta sección.

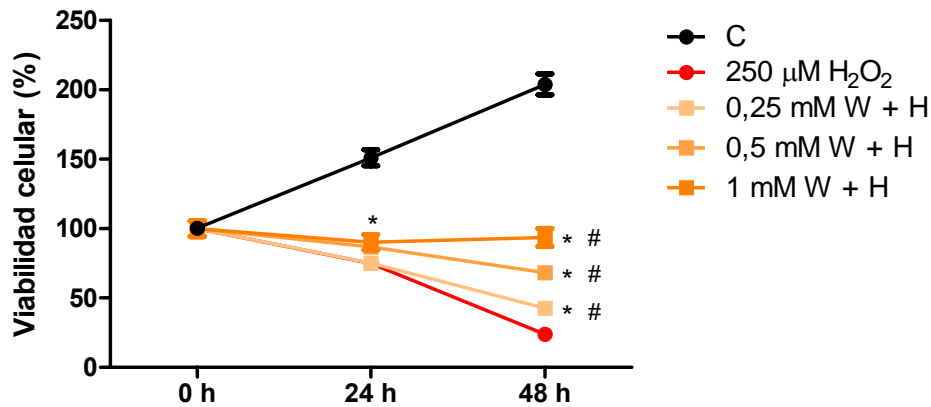


Figura 6.27. El Na_2WO_4 protege frente a la muerte celular producida por estrés oxidativo. Las células fueron incubadas en DMEM suplementado con 10% (v/v) FBS [C] y en ausencia o presencia de 250 μM H_2O_2 [H] y concentraciones crecientes de Na_2WO_4 [W]. Se realizaron ensayos de MTT a las 0, 24 y 48 h. Los datos se expresan como el porcentaje de células vivas referido al tiempo 0 h. Los resultados representan la media \pm S.E.M. (n=6). * $p < 0,05$ comparado con las células control no tratadas. # $p < 0,05$ comparado con las células tratadas con 250 μM H_2O_2 .

A la vista de estos resultados, cabía preguntarse si el efecto positivo del Na_2WO_4 se debía a un potencial poder antioxidante, o bien a que en las células cultivadas en presencia de Na_2WO_4 se desencadenaban una serie de procesos que les permitían hacer frente al estrés oxidativo.

Para dirimir cuál de estas dos hipótesis se ajustaba a la realidad, comenzamos por realizar un ensayo de detección de especies reactivas de oxígeno en cultivos celulares con el compuesto 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFDA) (ver 5.2.2.11). Se realizaron varias medidas a lo largo del tiempo y se comprobó que los niveles de especies reactivas de oxígeno variaban de un modo similar respecto al control tanto en las células tratadas únicamente con H_2O_2 como en aquellas tratadas con la mezcla de H_2O_2 y Na_2WO_4 (Figura 6.28). Con este resultado, concluimos que los efectos beneficiosos observados sobre la muerte celular debida al estrés oxidativo no podían atribuirse a un supuesto poder antioxidante del Na_2WO_4 .

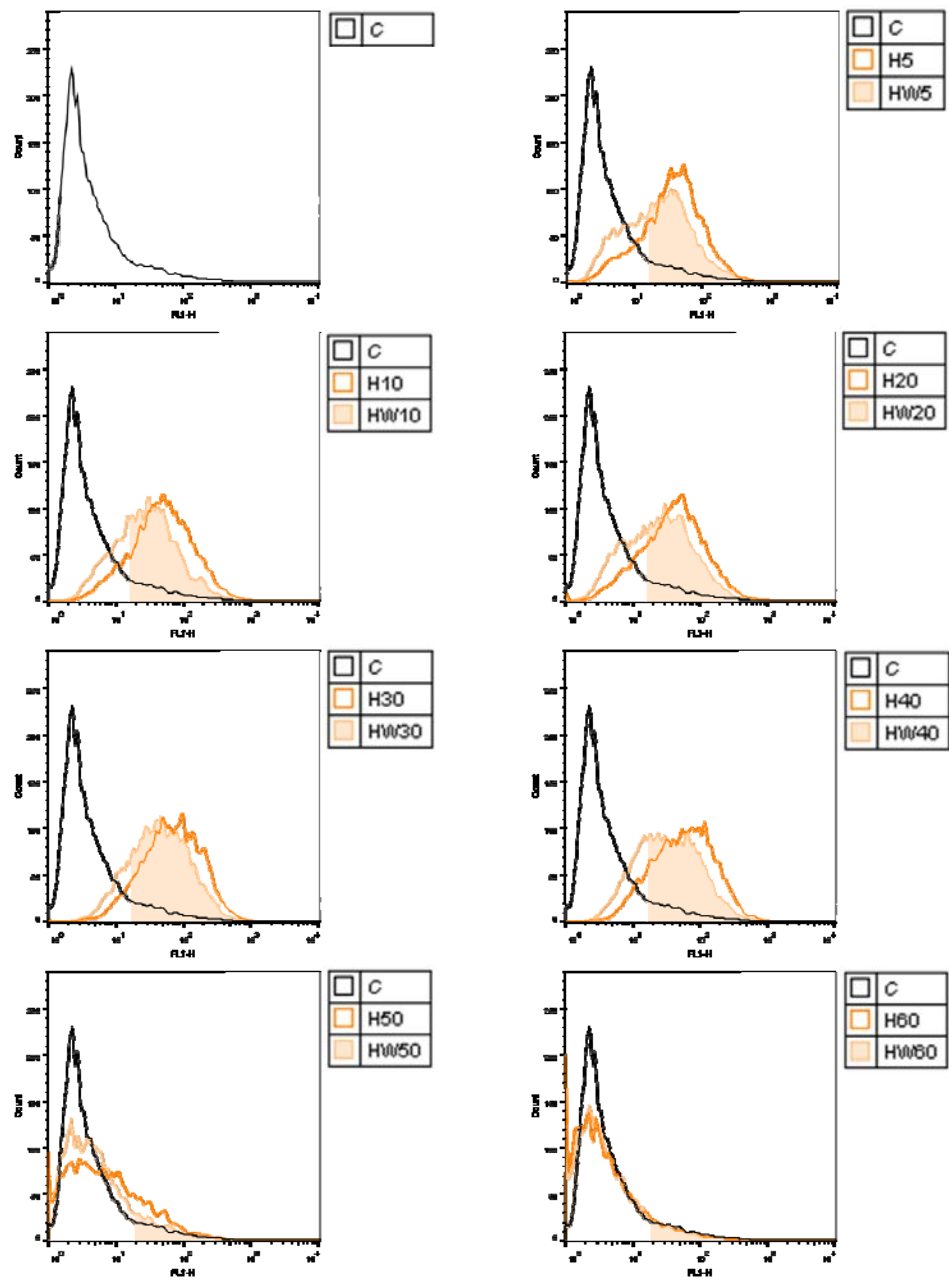


Figura 6.28. La generación de especies reactivas de oxígeno por parte del H_2O_2 no es revertida en presencia de Na_2WO_4 . Las células fueron incubadas en DMEM sin FBS y suplementado con $250 \mu M$ H_2O_2 [H] y/o $1 mM$ Na_2WO_4 [W] durante el tiempo en minutos que indican las leyendas de los histogramas. Las células se tripsinizaron y se analizaron por citometría de flujo. En todos los casos se muestra el histograma del control a tiempo cero como referencia. La figura muestra un resultado representativo de los experimentos realizados ($n=3$).

Era el momento de plantearse qué mecanismos celulares estarían implicados en la disminución de la mortalidad.

Ante determinadas situaciones de estrés, la célula activa procesos de autofagia como mecanismo de defensa degradando las proteínas y orgánulos que puedan estar dañados y que presentan alteraciones en su estructura y/o función. Si el efecto de los agentes estresantes supera a la capacidad protectora del proceso de autofagia, esta continúa hasta producir la muerte de la célula. Este fenómeno ocurre en el caso del estrés oxidativo y, en concreto, cuando es generado por H_2O_2 (Chen *et al.*, 2008).

Así pues, nos decidimos a estudiar el efecto del Na_2WO_4 sobre la autofagia producida por estrés oxidativo mediada por H_2O_2 . Para ello transfectamos células Neuro2a con un plásmido que presenta la secuencia codificante de la proteína quimérica LC3-GFP que, como dijimos anteriormente, permite observar la formación de autofagosomas empleando un microscopio de fluorescencia. Los experimentos se llevaron a cabo en presencia de bafilomicina A1 que bloquea el paso de autofagosomas a autolisosomas (ver 5.2.2.8).

El tratamiento con H_2O_2 originó un incremento en la formación de autofagosomas; sin embargo las células tratadas simultáneamente con Na_2WO_4 y H_2O_2 mostraron una disminución en dicho parámetro (Figura 6.29)

Por otra parte, está ampliamente descrito que el estrés oxidativo es un mediador de la apoptosis (Buttke y Sandstrom, 1994) de modo que decidimos estudiar dicho proceso.

La primera aproximación consistió en observar la morfología del núcleo tras incubar las células en presencia de H_2O_2 y/o tungstato tomando como referencia la forma típicamente redondeada de los núcleos en el grupo control no tratado. Para ello se procedió a la tinción de los núcleos con Hoechst y su posterior observación en el microscopio de fluorescencia.

En el caso de las células incubadas con H_2O_2 , un elevado porcentaje de los núcleos observados presentaban una morfología cóncava propia de la condensación de la cromatina en las etapas intermedias de la apoptosis (picnosis), mientras que algunas de las células ya presentaban la fragmentación del núcleo característica de las fases finales (cariorexsis). Por el contrario, en las células que habían sido tratadas concomitantemente H_2O_2 y Na_2WO_4 , el número de células con una morfología nuclear anormal era significativamente menor (Figura 6.30). Además, las células incubadas exclusivamente con Na_2WO_4 no presentaban modificaciones en la forma de sus núcleos respecto al grupo control no tratado.

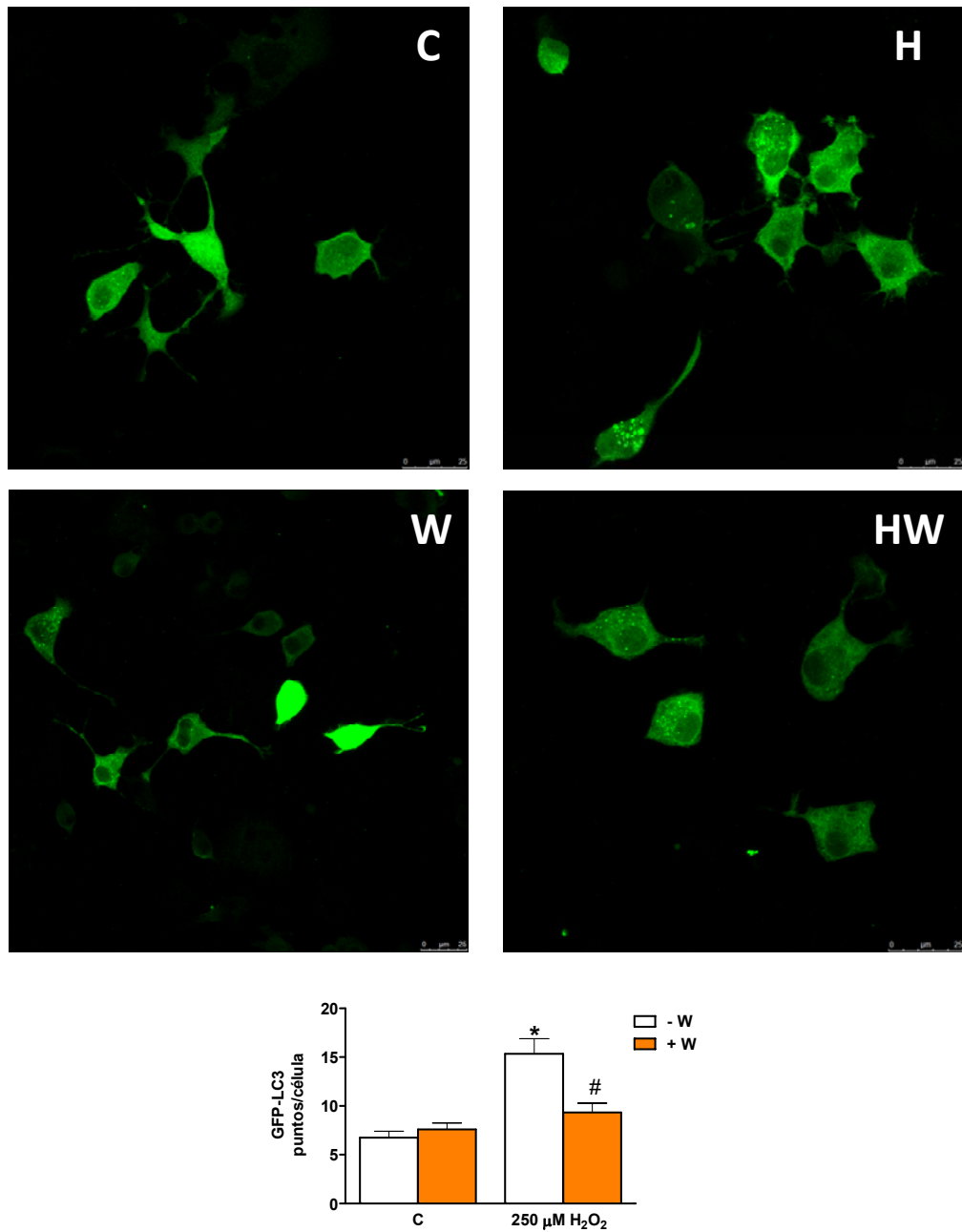


Figura 6.29. Regulación de la formación de autofagosomas por mediación del Na₂WO₄ en células Neuro2a tratadas con H₂O₂. Los experimentos se realizaron como se describe en 5.2.2.8 y en presencia de 100 nM bafilomicina A1. Las células se incubaron durante 30 min en ausencia [C] o presencia de 250 μM H₂O₂ [H], 1 mM Na₂WO₄ [W] y la mezcla de ambos [HW]. La formación de autofagosomas se analizó mediante microscopía confocal de fluorescencia y se hizo un recuento de los puntos por célula. Los resultados se expresan como la media ± S.E.M. (n=4). *p<0,05 comparado con las células control no tratadas; #p<0,05 comparado con las células tratadas con H₂O₂.

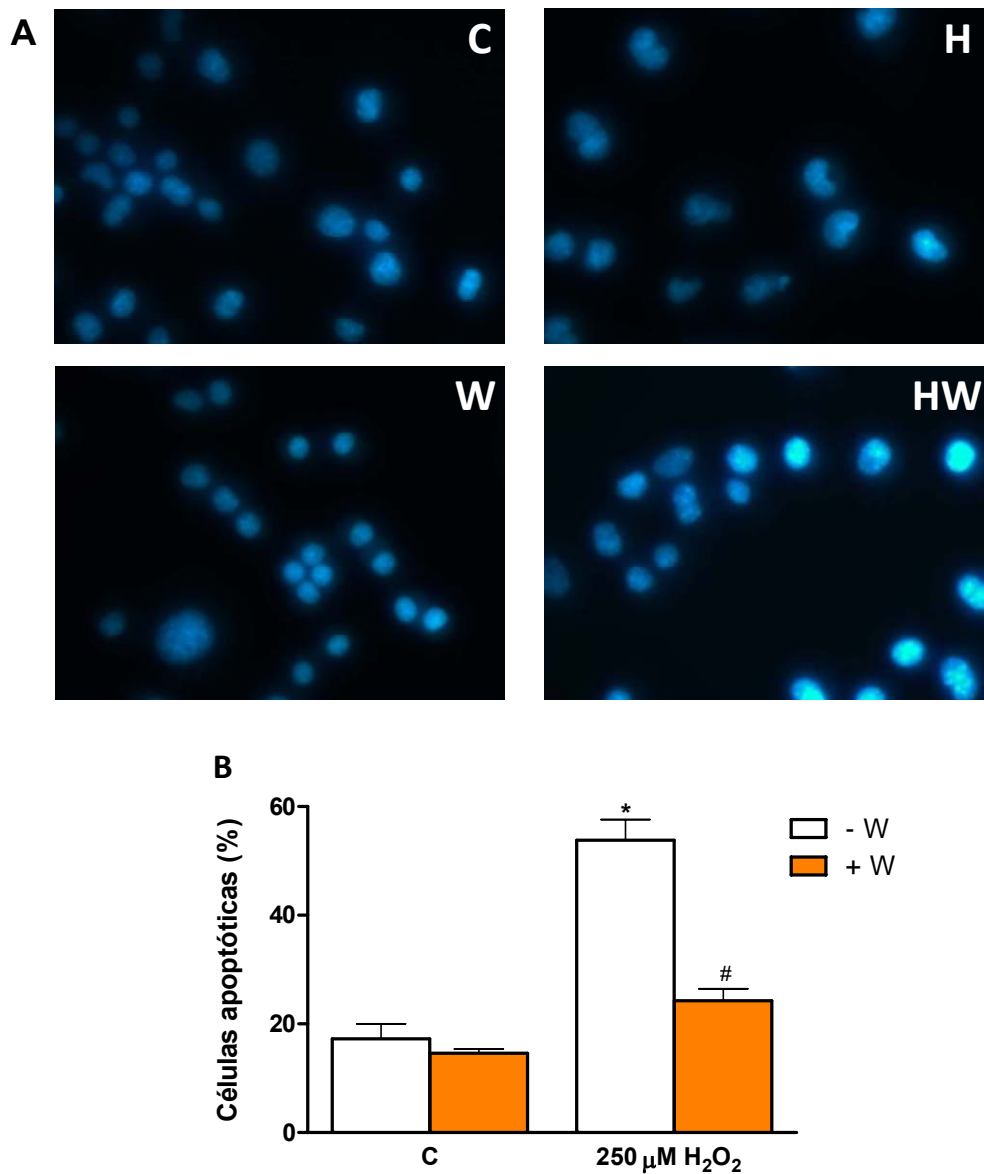


Figura 6.30. El Na_2WO_4 minimiza los cambios en la morfología nuclear debidos al estrés oxidativo por H_2O_2 . (A) Las células Neuro2a se incubaron durante 24 h en DMEM suplementado con 10% (v/v) FBS y en ausencia [C] o presencia de $250 \mu M H_2O_2$ [H], $1 mM Na_2WO_4$ [W] y la mezcla de ambos [HW]. A continuación se fijaron, se tiñeron con Hoechst y se observaron en el microscopio de fluorescencia. Se muestra un resultado representativo de los experimentos llevados a cabo. (B) Recuento del porcentaje de núcleos con morfología apoptótica. Los datos representan la media \pm S.E.M. (n=4). *p<0,05 comparado con las células control no tratadas. #p<0,05 comparado con las células tratadas con $250 \mu M H_2O_2$.

La siguiente aproximación que hicimos consistió en estudiar la apoptosis por citometría de flujo usando yoduro de propidio (ver 5.2.2.12). Con este método podemos obtener información numérica sobre el porcentaje de células muertas por apoptosis (región sub-G1) tras la incubación en presencia de H_2O_2 y comprobar si el Na_2WO_4 produce una disminución en dicho porcentaje.

En esta ocasión, se ensayaron dos concentraciones distintas de H_2O_2 : 250 y 500 μM . En los experimentos precedentes no se empleó la concentración más alta porque la muerte celular producida era tan drástica que hacía imposible la medida de cualquier parámetro. Sin embargo, puesto que en este experimento el interés radica precisamente en conocer la variación en el porcentaje de células que mueren, no teníamos ningún problema para introducir el valor más elevado en nuestras condiciones experimentales.

El porcentaje de células muertas por apoptosis en el grupo control no tratado se situaba en el 1,5%, mientras que en el caso de las células tratadas con 250 μM y 500 μM H_2O_2 los porcentajes alcanzaban valores del 8% y el 70%, respectivamente. Por su parte, el Na_2WO_4 mostró una disminución significativa de la muerte celular por apoptosis en ambos casos (Figura 6.31)

Se pueden encontrar ejemplos que asocian el estrés oxidativo por H_2O_2 con la apoptosis dependiente de caspasas y, en concreto, con la activación de la caspasa-3 en diversos tipos celulares incluyendo el neuronal (Jiang *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2000; Matsura *et al.*, 1999). Con estos antecedentes decidimos abordar el estudio de la activación de la caspasa-3 por H_2O_2 en las células Neuro2a y el posible efecto inhibidor del Na_2WO_4 sobre la misma.

En este sentido, se cultivaron las células en presencia de H_2O_2 y se procesaron las muestras a las tres y las seis horas. El análisis realizado por *Western blot* con anticuerpos específicos frente a caspasa-3 mostraron un incremento sustancial en los niveles de la forma activa de la proteína en comparación con el grupo control. Dicho fenómeno se veía paliado cuando las células eran incubadas simultáneamente con Na_2WO_4 (Figura 6.32).

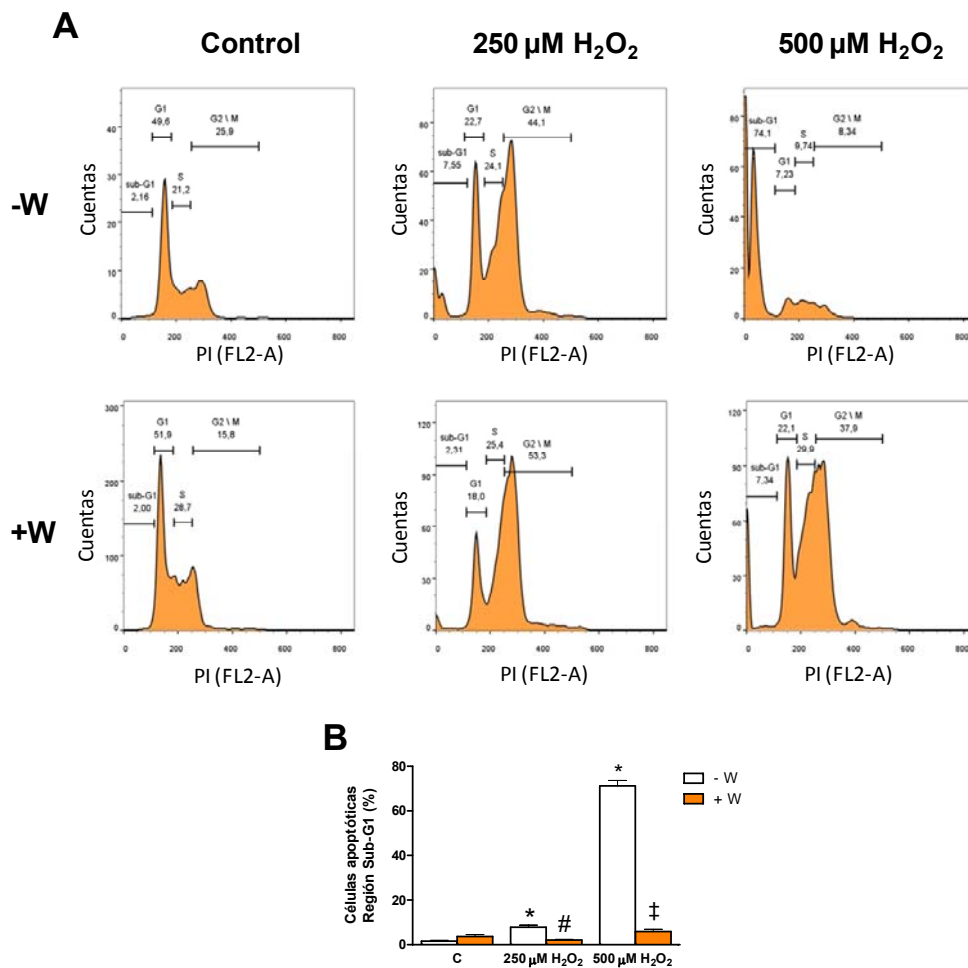


Figura 6.31. El Na_2WO_4 disminuye la muerte celular ocasionada por el estrés oxidativo. Las células Neuro2a se incubaron en DMEM suplementado con 10% (v/v) FBS y en ausencia o presencia de 250-500 μM H_2O_2 [H] y 1 mM Na_2WO_4 [W] durante 24 h. A continuación se analizó la apoptosis tardía mediante citometría de flujo con yoduro de propidio. (A) Se muestra un resultado representativo de los experimentos realizados. El número sobre cada segmento representa el porcentaje de la población celular en cada una de las etapas del ciclo celular. Las células muertas por apoptosis corresponden a la región sub-G1. (B) Representación gráfica de las células apoptóticas en las distintas condiciones experimentales. Los resultados se expresan como la media \pm S.E.M. (n=3). * $p < 0,05$ comparado con las células control no tratadas; # $p < 0,05$ comparado con las células tratadas con 250 μM H_2O_2 ; ‡ $p < 0,05$ comparado con las células tratadas con 500 μM H_2O_2 .

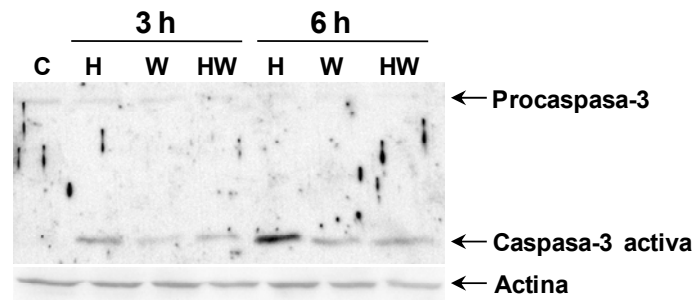


Figura 6.32. La activación de la caspasa-3 por estrés oxidativo es revertida por el Na_2WO_4 . Las células Neuro2a se incubaron en DMEM sin FBS en ausencia [C] o presencia de $250 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ [H], $1 \text{ mM Na}_2\text{WO}_4$ [W] o ambos [HW]. Se lisaron las células a las tres y las seis horas y se realizaron *Western blots* empleando los extractos proteicos totales y anticuerpos específicos frente a caspasa-3 y actina (n=4).

Son muchos los estudios que demuestran que la activación de ERK1/2 tiene un efecto antiapoptótico en la célula; pero también existe un gran número de artículos que exponen lo contrario, esto es, un papel proapoptótico. Al parecer, el que se produzca uno u otro efecto viene determinado fundamentalmente por el tipo de estímulo que provoca la activación de ERK1/2 y por el tejido que se estudie (Lu y Xu, 2006).

Cuando se habla de Akt, en general se acepta que su activación tiene un claro efecto antiapoptótico debido esencialmente a su capacidad de fosforilar e inhibir a FoxO que, entre otros muchos, tiene la capacidad de inducir la transcripción de genes proapoptóticos (Zhang *et al.*, 2011).

En relación con todo ello, nos dispusimos a evaluar cuáles eran los niveles de fosforilación de ERK1/2 y Akt en células Neuro2a en las que se inducía la apoptosis por estrés oxidativo cuando se incubaban en presencia de Na_2WO_4 .

Los resultados mostraron que tanto ERK1/2 como Akt presentaban menores niveles de fosforilación cuando las células se incubaban en presencia de H_2O_2 que en el caso del grupo control. Además, al cultivar las células en medio de cultivo suplementado con H_2O_2 y Na_2WO_4 de forma concomitante, se recuperaban parcialmente los niveles de fosforilación de ambas quinasas (Figura 6.33).

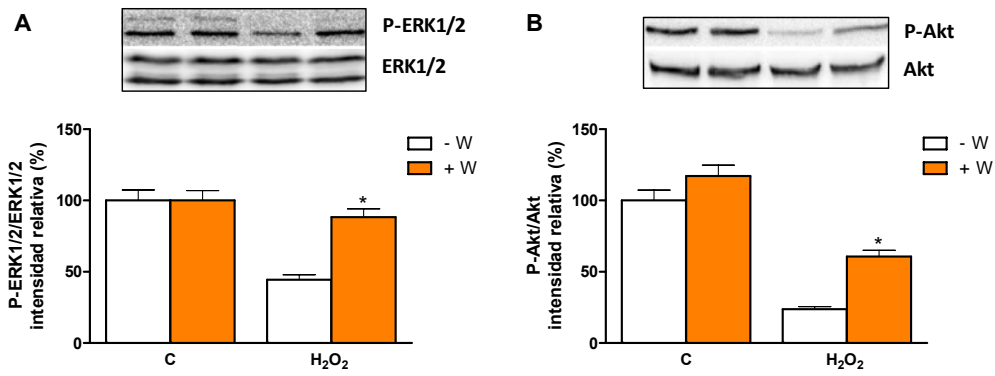


Figura 6.33. El Na_2WO_4 revierte parcialmente la disminución de los niveles de fosforilación de ERK1/2 y Akt debida al estrés oxidativo por H_2O_2 . Células Neuro2a se incubaron en DMEM suplementado con 10% (v/v) FBS y en ausencia [C] o presencia de 250 μM H_2O_2 , 1 mM Na_2WO_4 [W] o ambos [HW]. Se lisaron las células y se realizaron *Western blots* empleando los extractos proteicos totales y anticuerpos específicos frente a ERK1/2 (A), Akt (B) y sus respectivas formas fosforiladas. Sobre las gráficas se muestran membranas representativas de los resultados obtenidos. Los datos se expresan como la media \pm S.E.M. (n=4). * $p < 0,05$ comparado con las células tratadas con H_2O_2 .

7 DISCUSIÓN

El tungstato sódico es un compuesto que se ha descrito como un agente hipoglucemiante oral. Fue referido como tal en los años 1990 por el grupo de investigación del Profesor Guinovart en la Universidad de Barcelona (Barbera *et al.*, 1997; Barbera *et al.*, 1994). Entre las propiedades que hacen de este compuesto un atractivo agente hipoglucemiante está, además de la vía de administración oral, una baja o nula toxicidad (a diferencia de otros compuestos como los derivados del vanadato) y la sencillez de su estructura química. Un dato muy relevante es que no conduce a situaciones de hipoglucemia en respuesta al tratamiento, efecto indeseable frecuente del tratamiento con insulina u otros hipoglucemiantes orales (Barbera *et al.*, 2001).

El grupo de investigación del profesor Guinovart, demostró los efectos hepáticos del tungstato sódico que conducen a la normalización de la glucemia tanto en modelos *in vivo* (Barbera *et al.*, 1994) como *in vitro* (Dominguez *et al.*, 2003). Estos efectos se resumen en el hecho de que el compuesto es capaz de incrementar la captación de glucosa por el hígado, aumentando la actividad de la glucógeno sintasa y disminuyendo la de la glucógeno fosforilasa y al mismo tiempo es capaz de reducir la aportación neta de glucosa hepática al organismo inhibiendo la gluconeogénesis, fundamentalmente a nivel de la PEPCK. Cabe señalarse que estos efectos en modelos animales se mantienen a largo plazo y que el tungstato sódico, al menos a través de la normalización de la glucemia, tiene un claro efecto en la prevención del síndrome diabético tardío (Barbera *et al.*, 2001)

Utilizando cultivos celulares de células CHO-K1 que sobreexpresan el receptor de insulina, hepatomas y hepatocitos se ha demostrado que estos efectos del tungstato sódico a nivel hepático no se encuentran mediados por el receptor de insulina ni por las vías clásicas de señalización de la insulina (Dominguez *et al.*, 2003). Así, por ejemplo, el tungstato sódico no incrementa la autofosforilación del receptor de insulina, la fosforilación del IRS-2 (*insulin receptor substrate 2*) o la activación de PKB/Akt. Por el contrario, a nivel hepático se ha establecido inequívocamente que uno de los efectos clave que median la acción del tungstato es la activación de la vía de señalización de MAP quinasas y en concreto el incremento de la fosforilación y activación de MEK1/2 que a su vez es responsable de la activación de quinasas como ERK1/2 responsables en gran medida de la acción del tungstato sódico. Inhibidores de esta ruta como PD98059 claramente bloquean los efectos del tungstato sódico (Dominguez *et al.*, 2003). Así, en tejido hepático la activación de ERK1/2 mediada por tungstato produce un aumento en la fosforilación y consiguiente inactivación de la glucógeno sintasa quinasa 3 β , lo que produce la regulación del metabolismo del glucógeno.

Más recientemente, se ha demostrado que en hepatocitos en cultivo (Zafra *et al.*, 2013), el tungstato sódico ejerce su acción a través de la activación de una ruta no canónica que implica a las proteínas G. En concreto, el uso de toxina Pertussis

como un inhibidor de la subunidad Gα_{i2} bloqueó la activación mediada por tungstato sódico de Ras y la consecuente fosforilación de ERK1/2. Este efecto se ha demostrado también en células musculares lisas donde el tungstato ejerce un efecto antihipertensivo (Fernandez-Marino *et al.*, 2015).

Nuestro grupo de investigación se ha centrado en los efectos del tungstato sódico sobre la captación de glucosa por tejidos periféricos como un segundo mecanismo de mantenimiento de la homeostasis glucídica. Así, resultados *in vivo* en ratas diabéticas mediante la inyección con estreptozotocina, indican que en gran medida la disminución de la captación de glucosa por el músculo es normalizada por el tratamiento con tungstato sódico (Giron *et al.*, 2003). Esta normalización es debida a un doble mecanismo, un incremento en la expresión del transportador insulina dependiente GLUT4 y un aumento de su translocación a la membrana plasmática. Por el contrario, el tungstato no modifica la expresión del transportador basal GLUT1 ni su localización en la membrana plasmática, lo que justifica en parte que no produzca episodios de hipoglucemia.

A nivel molecular, y utilizando para ello cultivos de miotubos L6 de rata (Giron *et al.*, 2008), se comprueba que el tungstato sódico mantiene esa acción dual sobre el transportador GLUT4, incrementa su síntesis a nivel transcripcional y favorece su translocación a la membrana plasmática por un mecanismo dependiente de ERK1/2 y que se encuentra mediado por proteínas quinasas C atípicas y fosfolipasa D. Por otra parte, la activación de la transcripción del gen de GLUT4 por tungstato se encuentra mediada por la modulación de factores de transcripción tejido específicos, en concreto de la familia de MEF2 (*myocyte enhancer factor 2*).

En este punto es donde podemos decir que comienza la hipótesis de trabajo y el desarrollo experimental de esta Tesis Doctoral. Si el tungstato sódico ejercía efectos positivos sobre la captación de glucosa por el músculo y además estos efectos estaban mediados por vías de señalización únicas e independientes de la insulina, ¿era posible que en músculo esquelético y en otros tejidos tuviera efectos beneficiosos sobre otros parámetros?

Hemos de pensar que es conocido desde hace tiempo (Mandel y Pearson, 1974), que la insulina y el IGF-1 tienen un claro efecto anabolizante sobre el músculo esquelético y que son capaces de promover su diferenciación desde mioblastos a miotubos. Al mismo tiempo, son capaces de incrementar la síntesis proteica y disminuir la degradación de proteínas en este tejido (Ge *et al.*, 2013).

Existen numerosas enfermedades que cursan con pérdida de masa muscular e incluso, dentro del envejecimiento fisiológico, la pérdida de masa muscular asociada a la edad es un proceso inevitable. Enfermedades como cáncer y la caquexia asociada al mismo, infecciones, hospitalizaciones prolongadas, factores de estrés o efectos secundarios asociados al tratamiento con determinados medicamentos como corticoides se asocian con una acentuada pérdida de masa muscular y por tanto, son susceptibles de una terapia farmacológica restauradora.

Las primeras pruebas de que el tungstato sódico era capaz de aumentar el grado de diferenciación de mioblastos se obtuvieron de la comprobación mediante microscopía de su efecto sobre la fusión de mioblastos a miotubos (Figura 6.1). Células L6 incubadas con tungstato sódico mostraron un grado de fusión de núcleos y formación de miofibras superior a las células control y similar al que se obtiene en presencia de 50 nM insulina, dosis a la que esta ejerce acciones similares al IGF-1. Esta mayor diferenciación mediada por el tungstato sódico puede ser cuantificada determinando la actividad creatina quinasa como marcador de diferenciación muscular (Figura 6.2). El tungstato sódico es capaz de incrementar la actividad creatina quinasa muscular y este efecto es debido a un incremento en la transcripción desde su promotor.

Aunque hemos utilizado un sistema de cultivos celulares de mioblastos que se diferencian a miotubos por una restricción de suero, este sistema ha sido ampliamente utilizado para estudiar procesos de diferenciación muscular (Richler y Yaffe, 1970), y las etapas por las que en estas células se da el proceso de diferenciación ha sido claramente establecido. Así, se conoce que la expresión, seriada y regulada en el tiempo de un conjunto de proteínas, actuando la mayoría de ellas como factores de transcripción, conduce a la diferenciación muscular. Un esquema del patrón de tiempos de expresión de estos factores se muestra en la Figura 7.1.

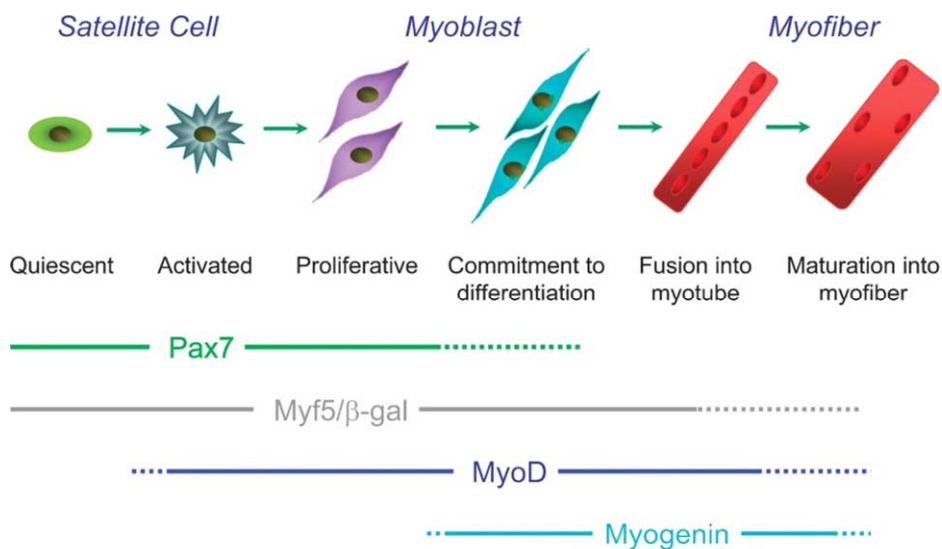


Figura 7.1. Miogénesis de células satélite y marcadores de cada etapa. Tomado de Miller et al. (1999) con modificaciones.

Nuestros resultados (Figura 6.4) muestran que el tungstato sódico aumenta la diferenciación muscular acelerando el proceso de tal manera que, a lo largo del tiempo en presencia de tungstato sódico, se da una transición más rápida desde

marcadores tempranos de diferenciación hasta marcadores tardíos. Dentro de estos marcadores, el tungstato ejerce su acción fundamentalmente aumentando los niveles de MEF2, en concreto MEF2D, y tiene menos efecto en los valores de MyoD medidos mediante qPCR (datos no mostrados).

De estos resultados, se puede concluir que la familia de reguladores transcripcionales MEF2, y en concreto MEF2D, es clave tanto en el incremento de la captación de glucosa por el músculo como en el proceso de diferenciación muscular. De hecho, cuando se realizan deleciones seriadas en el promotor de la creatina quinasa (Figura 6.3) y se analiza el efecto del tungstato sódico como activador de la transcripción de este gen marcador de diferenciación, se observa que las secuencias potenciadoras de unión a la familia MEF2 son esenciales para mantener el efecto positivo del tungstato sobre la transcripción de este gen. Por tanto, en este punto la pregunta que debemos realizarnos es: ¿cómo el tungstato sódico es capaz de modular los niveles y la actividad de la familia MEF2?

La familia MEF2 es una familia de reguladores transcripcionales que reconocen una secuencia específica de DNA en los promotores de varios genes que codifican para proteínas estructurales del músculo esquelético o que participan en la diferenciación muscular (Black y Olson, 1998). Asimismo, la función de MEF2 está relacionada con la supervivencia de las neuronas (Wang *et al.*, 2005).

La regulación de la función de MEF2 es compleja y ocurre a distintos niveles, tales como expresión específica en tejidos (Kim *et al.*, 2008), *splicing* alternativo del pre-mRNA (Zhu *et al.*, 2005), rotura proteolítica mediada por caspasas, modulación de su afinidad para unirse al DNA modulada por histonas desacetilasas y asociación con correguladores transcripcionales (Nebbioso *et al.*, 2009). Además, la función de MEF2 se ve afectada por modificación covalente como fosforilación (Li *et al.*, 1992), acetilación, sumoilación y/o ubiquitinación (Gregoire *et al.*, 2006)

La fosforilación de MEF2 ocurre en diferentes posiciones y por distintos factores. Así, la proteína quinasa A fosforila a MEF2 en el dominio de unión al DNA y por tanto, regula la afinidad de MEF2 a la secuencia específica de promotores de distintos genes (Du *et al.*, 2008). Otras proteínas quinasas que modulan la actividad de MEF2 son ERK5 (Kato *et al.*, 2000), CDK5 o GSK3 (Wang *et al.*, 2009).

En un primer paso hemos determinado el efecto del tungstato sódico sobre la expresión de MEF2D, ya que previamente (Giron *et al.*, 2008) habíamos determinado que dentro de la familia de MEF2, es el miembro que presenta una mayor respuesta al tungstato. Se observa que mientras que el tungstato sódico produce claramente un incremento en la actividad transcripcional y cantidad de proteína, no produce en paralelo un aumento en los niveles de mRNA (Figura 6.5). Esto indica que el mecanismo de control mediado por tungstato es postranscripcional.

En el caso de MEF2D, existen dos mecanismos postranscripcionales que controlan su actividad: fosforilación y sumoilación. Ambos procesos son relevantes para el control de la actividad transcripcional y además el último está implicado en el control de la cantidad de proteína modulando su degradación proteolítica. Un esquema de estos sitios de modificación se muestra en la Figura 7.2.

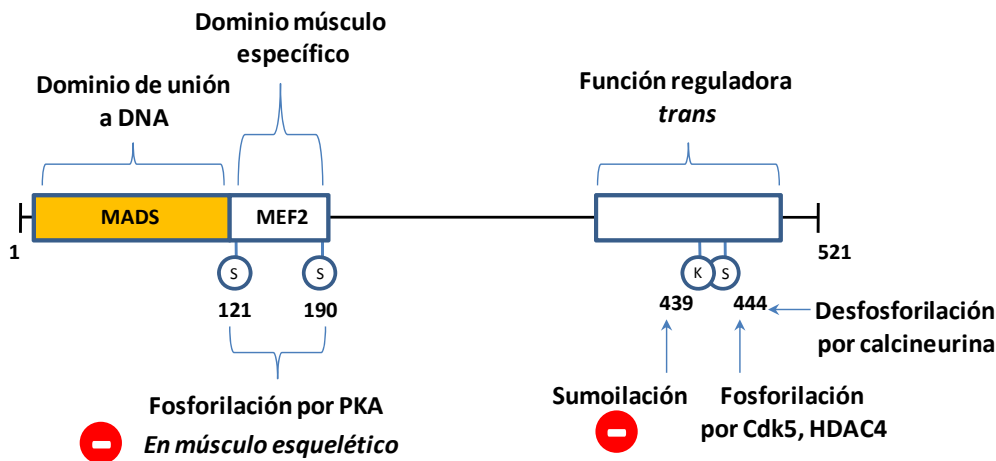


Figura 7.2. Regulación de la actividad de MEF2D por modificaciones covalentes: fosforilación y sumoilación.

Puesto que el tungstato produce no sólo un incremento en la actividad sino también en la cantidad de proteína, en primer lugar hemos estudiado el efecto del compuesto sobre la sumoilación de MEF2D. Experimentos de análisis de la sumoilación mediante *Western blot* (Figura 6.6), uso de inhibidores de la misma (Figura 6.7) y mutagénesis dirigida K439A para eliminar el sitio de sumoilación (Figura 6.8) apoyan la hipótesis de que el tungstato sódico es capaz de incrementar los niveles de MEF2D bloqueando el proceso de sumoilación.

La sumoilación de MEF2D se ha descrito (Gregoire *et al.*, 2006) que está controlada en parte por el grado de fosforilación de serina en posición 444. Esta serina ha sido descrito que es fosforilada por HDAC4 (*histone deacetylase 4*) y por Cdk5 estimulando la sumoilación, por el contrario la calcineurina (proteína fosfatasa 2B) desfosforila este resto y bloquea la sumoilación en la posición 439 (Figura 7.2). Nuestros experimentos mediante mutagénesis dirigida de esta serina indican que, aunque su mutación a ácido aspártico simulando una fosforilación permanente, bloquea la activación por tungstato, la mutagénesis a alanina permite que el tungstato siga incrementando la actividad transcripcional, por lo que probablemente existirán otros mecanismos adicionales de regulación del grado de sumoilación por tungstato de MEF2D que permanecen por dilucidar. También, determinar si el tungstato sódico bloquea la sumoilación de otras proteínas clave que se regulan por este mecanismo es una labor a completar.

Otro punto de regulación de la actividad transcripcional de MEF2D es la fosforilación en las posiciones S121 y S190. La elevación de los niveles de cAMP a través de la activación de la proteína quinasa A (PKA) es capaz de regular numerosos procesos celulares que incluyen la regulación de la expresión génica. En músculo tiene un claro efecto bloqueando la diferenciación muscular (Li *et al.*, 1992; Winter *et al.*, 1993). Este efecto se ha descrito que en gran medida se debe a una inhibición de la actividad transcripcional en músculo de MEF2D (Du *et al.*, 2008) mediada por la fosforilación por PKA de MEF2D, fundamentalmente en las posiciones 121 y 190. Es importante destacar que este efecto de cAMP y la PKA son tejido específico, ya que en cerebro se produce el fenómeno contrario y la fosforilación por PKA de MEF2D conduce a su activación.

Hemos estudiado el efecto que la incubación con tungstato sódico, en presencia o ausencia de análogos no hidrolizables del cAMP o en células transfectadas con las subunidades catalíticas de la PKA, tiene sobre la actividad transcripcional mediada por MEF2. Se observa (Figura 6.9) que ambos efectores tienen efectos antagónicos y que parte de los efectos del tungstato sódico en músculo podrían ser debidos a una reducción de los efectos del cAMP en el proceso de diferenciación. Para corroborar esta hipótesis, realizamos un estudio de mutagénesis dirigida de los dos principales restos fosforilados por PKA en MEF2D, las posiciones S121 y S190. En primer lugar es interesante señalar que la actividad transcripcional mediada por MEF2D S121A en condiciones basales fue significativamente superior a la mediada por la forma silvestre del regulador transcripcional, mientras que en condiciones basales la mutación en posición 190 tuvo un efecto neutro sobre la transcripción (Figura 6.10). Los resultados de transcripción mediada por estos mutantes en presencia de tungstato sódico indican que la posición 121 es esencial para el efecto mediado por el tungstato, su mutación a alanina aunque aumenta la transcripción basal, bloquea el efecto de tungstato. Por el contrario, la mutación en posición 190 a alanina es permisiva para mantener la acción de nuestra molécula efectora. Por tanto, parece que a este nivel el efecto del tungstato sódico se basa en prevenir la inhibición de la transcripción producida por la fosforilación en posición 121 por la PKA.

¿Cómo es capaz el tungstato sódico de prevenir esta fosforilación? Una pista se obtiene de trabajos previos que indican que en hepatocitos y en músculo liso, el tungstato sódico actúa a nivel de la activación de una ruta no canónica que implica a las proteínas G (Fernandez-Marino *et al.*, 2015; Zafra *et al.*, 2013). Por tanto, decidimos cuantificar los niveles de cAMP en miotubos tras la incubación con forskolina como agonista de la síntesis de cAMP. Los resultados indican que mientras que el tungstato no modifica los niveles basales de cAMP, sí que tiene un efecto significativo sobre los niveles de cAMP frente a un estímulo. (Figura 6.11).

Por tanto, hasta este punto, nuestra hipótesis inicial se confirma. El tungstato sódico es capaz de inducir la diferenciación muscular y proteger esta diferenciación frente a situaciones que bloquean la misma como es el incremento de los niveles de

cAMP. No obstante, debemos considerar que un aspecto clave del funcionamiento muscular es el recambio proteico del tejido y que un proceso de incremento de la diferenciación sin un aumento de la síntesis proteica y disminución de la degradación de proteínas tendría efectos limitados a nivel fisiopatológico. Por ello, el siguiente objetivo fue determinar el recambio proteico en células L6 diferenciadas. Para ello, hemos estudiado dos modelos experimentales: células L6 diferenciadas en condiciones basales y células L6 diferenciadas en las que se ha inducido una degradación proteica elevada mediante incubación con dexametasona, un modelo de degradación de proteínas bien caracterizado.

La masa muscular viene determinada por el balance dinámico entre síntesis y degradación de proteínas (Weigl, 2012). Ambos procesos están conectados y regulados de tal manera que cuando se estimula la síntesis proteica se bloquea la degradación y viceversa. La quinasa mTOR (*mechanistic target of rapamycin*) juega un papel central en regular esta síntesis y degradación de proteínas. mTOR controla la síntesis proteica mediante la fosforilación de proteínas clave debajo de su vía de señalización, como es S6K1 (*ribosomal protein S6 kinase 1*) (Schakman *et al.*, 2013; Shimizu *et al.*, 2011; Weigl, 2012; Winter *et al.*, 2011). A su vez, la activación de la vía de señalización de PKB/Akt y de ERK1/2 da lugar a la fosforilación de un represor de mTOR, TSC (*tuberous sclerosis complex*), formado por dos unidades TSC1 y TSC2 (Winter *et al.*, 2011). La fosforilación de TSC2 en la treonina 1462 y la serina 939 mediada por PKB/Akt (Inoki *et al.*, 2002) o en la serina 664 por ERK1/2 (Ma *et al.*, 2007) activa primero a mTOR y posteriormente a S6K1, como un regulador clave del inicio de la traducción (Orlova y Crino, 2010).

Por otra parte, la degradación de proteínas esta mediada por dos rutas altamente conservadas: la dependiente del sistema ubiquitina-proteasoma y la ruta autofágica-lisosomal (Sandri, 2013). La ruta dependiente de ubiquitina es la responsable de la degradación de la mayoría de proteínas solubles y miofibrillas musculares y, por tanto, su actividad se encuentra incrementada en músculo atrófico debido al aumento de la expresión de ligasas de ubiquitina como atrogin-1 y MuRF1 (Sandri, 2013; Zhao *et al.*, 2007). La autofagia también tiene un papel relevante en músculo y origina la activación coordinada de un conjunto de genes como LC3 y Bnip3 (Sandri, 2013). Ambas vías de degradación actúan de manera coordinada a través de una regulación común proporcionada por el factor de transcripción FoxO3 (*forkhead box O3*). FoxO3 está en condiciones basales fosforilado e inactivado por PKB/Akt, pero cuando esta quinasa no está activa se inhibe su represión, se transloca al núcleo e induce la expresión de MuRF-1 y atrogin-1, así como de los genes asociados a la autofagia (Mammucari *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2007).

Una de las funciones contrastadas del tungstato sódico es su capacidad de incrementar la fosforilación de ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) en varias líneas celulares (Ballester *et al.*, 2005; Dominguez *et al.*, 2003; Giron *et al.*, 2008; Nocito *et al.*, 2012; Zafra *et al.*, 2013). Dicha fosforilación supone su activación y esta se ha relacionado con un incremento en el transporte de glucosa en cultivos de

células de músculo esquelético (Giron *et al.*, 2008) y con el cambio observado en el contenido de glucógeno en cultivos primarios de hepatocitos de rata (Dominguez *et al.*, 2003).

En esta Tesis Doctoral, hemos puesto de manifiesto por primera vez que la activación de ERK por tungstato sódico en músculo esquelético es capaz de incrementar la síntesis de proteínas por activación de mTOR (*mechanistic target of rapamycin*) y de disminuir la degradación de proteínas por un bloqueo de la actividad de FoxO3a. Además, la activación de ERK promueve el recambio proteico en células de músculo esquelético tratadas con dexametasona.

Numerosos estudios han demostrado que mTOR juega un papel crucial en la regulación de la síntesis de proteínas y la subsiguiente hipertrofia en músculo esquelético (Komamura *et al.*, 2003; Miyazaki *et al.*, 2011; Spangenburg, 2009; Vyas *et al.*, 2002). El mecanismo de regulación de la actividad de mTOR en músculo esquelético que mejor se conoce es la ruta de señalización a través de insulina/IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*). La administración de IGF-1 exógeno a miotubos en cultivo (Vyas *et al.*, 2002) origina un incremento en el tamaño de la célula muscular y en el contenido total de proteínas. Sin embargo, en ratones en los que la señalización a partir de IGF-1 está bloqueada por sobreexpresión de un receptor para IGF-1 dominante negativo, el músculo esquelético se hipertrofia en respuesta a sobrecarga mecánica del mismo modo en que lo hace en ratones silvestres (Miyazaki *et al.*, 2011; Spangenburg, 2009). En este sentido, Miyazaki *et al.* (2011) demostraron que la señalización a través del eje Ras-Raf-MAPK/ERK contribuye a la activación de mTOR durante la respuesta temprana a la sobrecarga mecánica.

Nuestro trabajo confirma este resultado. El tungstato sódico incrementó la síntesis de proteínas de un modo dosis dependiente (Figura 6.12). El efecto positivo de este compuesto se debió a la fosforilación de mTOR a través de la activación de ERK e inactivación de TSC2 (*tuberin*). Además, el incremento de la síntesis de proteínas detectado tras la activación de ERK fue similar al obtenido por la activación de Akt (*RAC-alpha serine/threonine-protein kinase*). Por otra parte, los sustratos de mTOR S6K1 (*ribosomal protein S6 kinase*), 4E-BP1 (*eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1*) y eIF4E (*eukaryotic translation initiation factor E*) también se encontraban fosforilados en células tratadas con tungstato sódico o insulina (Figura 6.13 y Figura 6.14).

Por tanto, hemos demostrado que la activación de ERK en miotubos de rata produce un efecto similar sobre la síntesis de proteínas y sobre el mecanismo molecular subyacente a este proceso al obtenido a través de la fosforilación de Akt.

Numerosas situaciones patológicas caracterizadas por la atrofia muscular (sepsis, caquexia, ayuno, acidosis metabólica, insulinopenia severa, etc.) están asociadas a un incremento en los niveles de glucocorticoides circulantes (Schakman *et al.*, 2013). En estas condiciones, la pérdida rápida de masa muscular se produce principalmente debido a la degradación de proteínas (Mammucari *et al.*, 2007). En este sentido, una serie de genes relacionados con el proceso de autofagia que se

inducen o reprimen de forma similar en distintos tipos de autofagia han sido identificados y se denominan genéricamente en inglés como *atrogenes* (Komamura *et al.*, 2003; Lecker *et al.*, 2004). Dichos genes están sometidos a una regulación común a nivel transcripcional en distintos tipos de atrofia lo que, en su conjunto, conduce a una aceleración de la degradación de proteínas. En el músculo esquelético, los glucocorticoides producen tanto una disminución de la síntesis de proteínas como un incremento de la proteólisis lo que indefectiblemente conduce a la atrofia muscular (Lofberg *et al.*, 2002).

Los efectos estimuladores de los glucocorticoides sobre la degradación de proteínas son el resultado de la activación de los sistemas ubiquitina-proteasoma y autofagia-lisosoma.

En el primer caso, los glucocorticoides inducen la expresión de varios componentes del sistema ubiquitina-proteasoma como son la ubiquitina, atrogin-1 y MuRF1 (*muscle-specific RING finger protein 1*) (Bodine *et al.*, 2001). La activación de la transcripción de los genes que codifican para estas proteínas está relacionada con un incremento en los índices de ubiquitinización de proteínas y de degradación proteica (Schakman *et al.*, 2013; Shimizu *et al.*, 2011).

En el caso del sistema autofagia-lisosoma, se propone que el efecto de los glucocorticoides se debe a un incremento de la conversión de LC3-I (*microtubule-associated protein 1 light chain 3*) en su forma lipídada LC3-II, siendo esta última un indicador de autofagia (Mizushima *et al.*, 2010; Sanchez *et al.*, 2014; Sandri, 2013; Zhao *et al.*, 2007).

Diversos estudios han puesto de manifiesto que la atrofia muscular es el resultado de una serie de procesos activos que están coordinados transcripcionalmente a través de la expresión de los factores de transcripción FoxO (Cho *et al.*, 2010; Mammucari *et al.*, 2007; Sanchez *et al.*, 2014; Sandri, 2013; Zhao *et al.*, 2007). La fosforilación de FoxO por Akt conduce a su inactivación en el citoplasma; sin embargo, la inhibición de la ruta de señalización PI3K/Akt por los glucocorticoides da lugar a la desfosforilación de FoxO y su importación hasta el núcleo.

Genes implicados en la degradación de proteínas, como ATROGIN1 o MURF-1, se encuentran entre los más fuertemente inducidos en diversas enfermedades que conducen a la atrofia muscular, como se ha podido comprobar en experimentos con *microarrays* (Komamura *et al.*, 2003; Lecker *et al.*, 2004). Dichos genes están bajo el control de los factores de transcripción FoxO.

En conjunto, toda esta información nos indica que el incremento de la expresión de FoxO inducida por glucocorticoides activa un programa de transcripción de genes responsables de desencadenar la atrofia muscular.

En esta Tesis Doctoral, empleamos miotubos L6 incubados con dexametasona como un modelo celular de degradación de proteínas (Hong y Forsberg, 1995; Zheng *et al.*, 2010). Como cabía esperar, la dexametasona disminuyó

la síntesis e incrementó la degradación de proteínas validando así nuestro modelo (Figura 6.12).

Por otra parte, el tratamiento de los miotubos durante 24 h con dexametasona dio lugar a la activación de FoxO3a (Figura 6.15). Este fenómeno se pudo comprobar con el uso de genes reporteros (luciferasa de luciérnaga) inducibles por FoxO. También se confirmó la desfosforilación en extractos citoplasmáticos y su incremento en extractos nucleares (Figura 6.15).

Además, se observó una correlación entre el incremento en la actividad de FoxO y una mayor actividad transcripcional dependiente del promotor de ubiquitina así como un incremento en los niveles de mRNA de atrogin-1 y MuRF1 (Figura 6.16).

Todos estos resultados sugieren que la expresión de las ligasas de ubiquitina está sometida a un control transcripcional mediado por la translocación de FoxO al núcleo.

La mayoría de los intentos para prevenir la atrofia muscular han empleado IGF-1 o un compuesto anabólico que estimule su expresión (Ge *et al.*, 2013; Schakman *et al.*, 2013). Estudios realizados en líneas celulares de mioblastos como L6E9, C2C12 y L6A1 sugieren que el efecto estimulador de IGF-1 sobre la proliferación celular y la síntesis de proteínas es mediada por las rutas de señalización de Ras-Raf-MAPK/ERK y PI3K/Akt; sin embargo, es comúnmente aceptado que el efecto inhibitorio de IGF-1 sobre la degradación de proteínas está mediada únicamente por la segunda de dichas rutas (Ge *et al.*, 2013; Miyazaki *et al.*, 2011; Winter *et al.*, 2011).

Nosotros mostramos en nuestro estudio que el tungstato sódico, un activador de la ruta de Ras-Raf-MAPK/ERK pero no de PI3K/Akt, previene los efectos potenciadores de la dexametasona sobre la degradación de proteínas. De hecho, las células que fueron incubadas previamente con tungstato sódico presentaban una disminución en la actividad de FoxO3a, un incremento de la forma fosforilada en el citoplasma y una disminución de su expresión en el núcleo al ser incubadas con dexametasona (Figura 6.15).

Estos efectos del tungstato sódico se tradujeron en una menor actividad dependiente de ubiquitina y una reducción de los niveles del mRNA de atrogin-1 y MuRF1 así como de la expresión de las respectivas proteínas hasta los niveles del grupo control (Figura 6.16). Además, el tungstato sódico por sí solo no produjo cambios en la actividad de FoxO3a o en la expresión de sus dianas moleculares. Debemos decir que, aunque se ha descrito que la activación de ERK1/2 conduce a un incremento en la expresión de ubiquitina (Zheng *et al.*, 2010), este efecto no se ha observado en nuestro estudio.

Nuestros hallazgos también muestran que el tungstato sódico tiene la capacidad de reducir la formación de autofagosomas y la expresión de la forma lipídica de LC3 en las células que son tratadas con dexametasona (Figura 6.17 y Figura 6.18). Además, el tungstato sódico disminuye la degradación de p62/SQSTM1 (*sequestosome 1*), uno de los sustratos específicos que se degradan a través del

sistema autofagia-lisosoma (Figura 6.17) (Komatsu e Ichimura, 2010; Mizushima *et al.*, 2010), y reduce los niveles de mRNA de Bnip3 (*BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3*), un gen relacionado con la autofagia cuya expresión está bajo el control de FoxO3a (Sanchez *et al.*, 2014; Shimizu *et al.*, 2011), hasta los niveles del grupo control (Figura 6.19). Estas observaciones apuntan hacia la implicación de la autofagia como un mecanismo adicional por el que el tungstato sódico previene la degradación de proteínas.

En conclusión, la activación de la ruta Ras-Raf-MAPK/ERK por el tungstato sódico previno la disminución en la síntesis y el incremento en la degradación de proteínas inducidas por la dexametasona en nuestro modelo de estudio celular. De acuerdo con nuestros resultados, proponemos que el tungstato sódico puede ser considerado una alternativa a IGF-1 y sus análogos en la prevención de la atrofia del músculo esquelético.

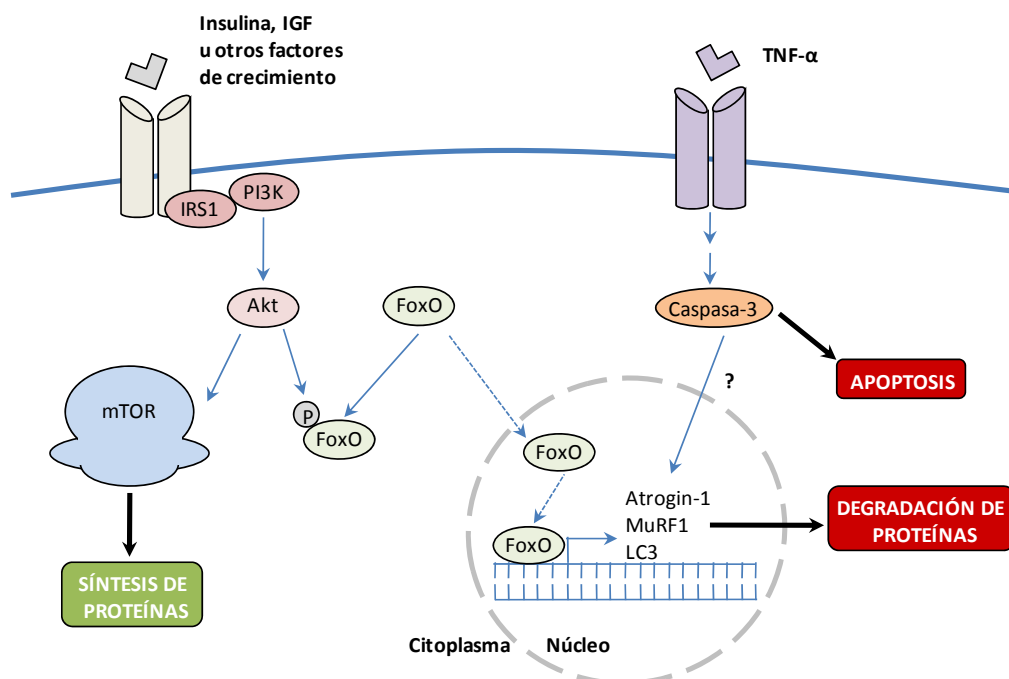


Figura 7.3. Regulación del recambio proteico en músculo esquelético.

El tungstato sódico tiene un efecto beneficioso promoviendo la diferenciación de células musculares, un efecto protector en la diferenciación frente a la elevación de los niveles de cAMP y aún más relevante, es capaz de normalizar el recambio proteico. Todos estos efectos están mediados por la vía de señalización de MAP quinasas y por el factor de transcripción MEF2D. La expresión de la familia MEF2, no solo es relevante en músculo sino que también tiene un papel destacado en tejido nervioso.

Los miembros de esta familia juegan un papel relevante en el desarrollo y la supervivencia neuronal. La expresión de determinadas isoformas de MEF2 es necesaria para el desarrollo y supervivencia de neuronas en el cerebro (Gong *et al.*, 2003; Mao *et al.*, 1999; Tang *et al.*, 2005) y se han implicado en el desarrollo de neuronas corticales (Liu *et al.*, 2003). Así mismo, esta familia de factores transcripcionales es activada por vías de señalización que regulan la supervivencia y la apoptosis neuronal. Por ejemplo, en neuronas tanto p38 MAP quinasa (Mao *et al.*, 1999), como ERK5 y PKA (Kato *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2005) activan la funcionalidad de MEF2 y aumentan la supervivencia celular.

Además, se ha descrito que el tungstato sódico es capaz de inhibir la fosforilación de la proteína tau mediada por GSK3 (Gomez-Ramos *et al.*, 2006) y que dicho efecto, que podría tener un papel neuroprotector frente Alzheimer, está mediado por la vía de señalización de ERK. Este hecho, junto con el papel relevante de MEF2 en la supervivencia neuronal, nos ha llevado a extender los estudios del efecto diferenciador y de supervivencia del tungstato sódico a la línea de neuroblastos Neuro2a, una línea celular considerada un modelo bien establecido para el estudio de la diferenciación neuronal, crecimiento de neuritas (Park *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2009; Yanaka *et al.*, 2007) y neurotoxicidad (Arsenault *et al.*, 2014).

La formación de neuritas es una etapa esencial en el desarrollo neuronal para permitir la formación de sistemas funcionales interconectados (Read y Gorman, 2009). Así mismo, es crucial para la plasticidad neuronal (Hrvoj-Mihic *et al.*, 2013) y la regeneración en aquellos tipos de neuronas en los que fenómeno tiene lugar (Schiwy *et al.*, 2009). Las bases moleculares que rigen la formación de neuritas son conocidas e implican la activación de ERK1/2 (Wang *et al.*, 2011a; Wang *et al.*, 2011b) y de PKB/Akt (Chong *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2015; Read y Gorman, 2009). A su vez, ambas rutas de señalización celular promueven la activación de factores de transcripción entre los que destaca la familia de MEF2. La sobreexpresión de esta familia en las etapas de desarrollo del cerebro (Chan *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2008; Rashid *et al.*, 2014) controla procesos celulares que incluyen supervivencia, diferenciación, morfogénesis y apoptosis (McKinsey *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2005). Por tanto, la posibilidad de manipular la señalización mediada por ERK y MEF2 utilizando pequeñas moléculas permeables a la barrera hematoencefálica es una hipótesis atractiva para el tungstato sódico.

Para demostrar esta hipótesis, en primer lugar estudiamos los efectos del tungstato sódico sobre la proliferación de la línea celular Neuro2a (Figura 6.20-B). El tratamiento con tungstato sódico produjo un efecto significativo disminuyendo la proliferación celular a las 48 horas de incubación. Este resultado es importante ya que la línea celular Neuro2a es una línea de neuroblastos de rápido crecimiento y por tanto nuestro resultado parece indicar que el tungstato no ejerce un efecto proliferativo no deseado.

A continuación, investigamos si el tungstato inducía la diferenciación de neuritas. Para ello se analizaron cambios morfológicos en las células Neuro2a a las 24

y 48 h de incubación con tungstato sódico. Como se observa en la Figura 6.20-C, la mayoría de las células no tratadas muestran una forma redondeada mientras que el tungstato incrementa significativamente la formación de neuritas. La diferenciación de las células Neuro2a se confirmó midiendo la actividad y la expresión de acetilcolinesterasa (Bigbee *et al.*, 2000), observándose que los cambios en la actividad enzimática eran paralelos a los de cantidad de enzima (Figura 6.21-A).

Estos resultados sugieren que el efecto del tungstato sódico sobre las células Neuro2a está basado principalmente en promover la elongación de las neuritas más que en aumentar su proliferación celular. Además, se ha propuesto que un aumento en sus niveles de diferenciación podría constituir un marcador en la mejora de la formación de memoria a largo plazo (Dickey *et al.*, 2004) y, por tanto, justificaría el que se elucidaran las bases moleculares subyacentes en el proceso de diferenciación neuronal mediado por tungstato.

Los neuroblastos cuando se diferencian pueden dar lugar a diversos tipos neuronales, entre ellos neuronas dopaminérgicas (Volpicelli *et al.*, 2004; White y Thomas, 2012) y colinérgicas (Butcher *et al.*, 1992). Para conocer qué tipo de neurona se estaba formando en nuestro caso, se midió por qPCR la expresión de genes que se usan como marcadores moleculares del tipo neuronal. Nuestros resultados muestran que las células incubadas en presencia de tungstato sódico se diferencian en neuronas colinérgicas ya que se observa un aumento en la expresión de colina O-acetiltransferasa y no en tirosina hidroxilasa y/o Nurr1, marcadores estos últimos de neuronas de tipo dopaminérgico (Figura 6.21-B).

En enfermedades neurodegenerativas, ciertas poblaciones neuronales adultas mueren gradualmente. Los factores de transcripción de la familia MEF2 juegan un papel muy importante en la supervivencia de diferentes tipos de neuronas (McKinsey *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2005) y, de hecho, en modelos celulares la inhibición de MEF2 contribuye a la muerte celular (Yang *et al.*, 2009). Por esta razón, el aumento de la expresión y actividad del factor de transcripción MEF2D por tungstato sódico (Figura 6.22) sería indicativo del papel del compuesto, no solo en la diferenciación neuronal (Lam y Chawla, 2007), sino también en la supervivencia de estas células (McKinsey *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2005). En este sentido, nos ha parecido interesante profundizar en el mecanismo mediante el cual el tungstato sódico aumenta la actividad de MEF2D.

Está descrito que una forma de proteger a las neuronas de la degeneración es mediante un proceso de autofagia mediado por chaperonas (Yang *et al.*, 2009) y que este proceso regula la actividad de MEF2D en neuronas. Este factor de transcripción se transloca del núcleo al citoplasma donde interacciona con la chaperona Hsc70 (*heat shock 70 kDa protein 8*) y es degradado. También se conoce que la ausencia de suero bovino fetal en el medio induce este mecanismo de autofagia mientras que el NH_4Cl lo inhibe por una disminución del pH que afecta a la actividad de las hidrolasas lisosomales que participan en la última etapa de la degradación proteica.

Para el estudio de este proceso hicimos uso de una proteína quimérica en la que MEF2D se expresa como una proteína de fusión con la proteína verde fluorescente. De este modo, podíamos conocer la localización celular de la proteína por microscopía confocal de fluorescencia (Figura 6.23). Nuestros resultados ponen de manifiesto que, cuando las células fueron incubadas con tungstato sódico, la distribución de MEF2D-GFP es fundamentalmente nuclear. La permanencia durante más tiempo de MEF2D en el núcleo impediría su degradación por autofagia mediada por chaperonas y, de este modo, se explicaría el incremento en la actividad de este factor de transcripción.

Una vez demostrado cómo el tungstato sódico participa en la diferenciación y supervivencia de las neuronas a través de un aumento en la expresión de MEF2D, había que establecer si su mecanismo de acción está basado en una activación de ERK1/2, como ya ha sido descrito en otras líneas celulares (Giron *et al.*, 2008).

Para que las neuronas se diferencien es necesaria la activación tanto de la vía de Akt (Lee *et al.*, 2015; Qiao *et al.*, 2012) como de ERK1/2 (Wang *et al.*, 2011a). Como punto adicional, una serie de estudios ha puesto de manifiesto que para que se produzca la diferenciación neuronal, la activación de ERK1/2 debe ser mantenida en el tiempo (Li *et al.*, 2006; Marshall, 1995). El estudio de la fosforilación de ambas quinasas en cultivos celulares que habían sido incubados en presencia de tungstato sódico durante 24 h puso de manifiesto que nuestro compuesto sí promovía la fosforilación de ERK1/2 de forma mantenida, pero no tenía ningún efecto sobre la fosforilación de Akt (Figura 6.24). Es importante destacar, por tanto, que la acción del tungstato sódico es relevante no sólo por su capacidad de activar ERK1/2, sino por hacerlo en un marco de tiempo adecuado que favorece la diferenciación neuronal y bloquea la proliferación (Ebisuya *et al.*, 2005).

Para complementar este estudio y concluir que el efecto del tungstato sobre la regulación de la formación de neuritas está mediado por la activación de ERK1/2, se incubaron células Neuro2a con inhibidores de la activación de las rutas de señalización mediadas por Akt y ERK1/2 antes de adicionar tungstato sódico al medio de cultivo (Figura 6.25). En condiciones basales se observa que para que se lleve a cabo la diferenciación no se requiere la ruta de Ras-Raf-MAPK/ERK, pero esta sí era necesaria para que el tungstato ejerciera su efecto positivo sobre este proceso. Sin embargo, para que las células se diferenciaran, era obligatorio que la ruta de PI3K/Akt no estuviese bloqueada. Por tanto, el tungstato media la diferenciación neuronal a través de la activación de la ruta de Ras-Raf-MAPK/ERK siempre que la ruta de PI3K/Akt no se encuentre inhibida.

La siguiente cuestión que abordamos fue comprobar si el tungstato sódico estaba implicado en la síntesis de proteínas en neuronas ya que está descrito que la expresión de proteínas necesarias para la diferenciación neuronal está regulada principalmente por cambios en la síntesis de las mismas (Kristensen *et al.*, 2013). La Figura 6.26 ratifica que el tungstato sódico aumenta significativamente la síntesis de proteínas con respecto a las células no tratadas. Muy probablemente, los

mecanismos por los que el tungstato sódico incrementa la síntesis proteica en las células Neuro2a sean similares a los que permiten que ejerza esta misma acción en músculo y, por tanto, basados en una activación de mTOR; no obstante, son necesarios nuevos experimentos que confirmen este extremo.

Teniendo todas las precauciones necesarias, ya que los experimentos se han llevado a cabo en cultivos de líneas celulares establecidas y necesitarán su confirmación en cultivos primarios de neuronas, podemos concluir que el aumento en la formación de neuritas mediada por nuestro compuesto se lleva a cabo mediante el aumento en la síntesis proteica y la inhibición de la degradación del factor de transcripción MEF2D. Además, esta acción puede favorecer la plasticidad neuronal.

Una segunda parte del estudio en neuronas ha sido estudiar si el tungstato sódico protege frente a la muerte celular producida por estrés oxidativo y, en consecuencia, plantearnos un posible efecto neuroprotector del mismo.

El estrés oxidativo es un componente común presente en algunas de las enfermedades neurodegenerativas de mayor prevalencia (Niedzielska *et al.*, 2015). Un modelo ampliamente utilizado para reproducir el daño oxidativo en cultivos celulares consiste en incubar las células con peróxido de hidrógeno (Kwon *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015; Rabelo *et al.*, 2015). Este modelo permite mimetizar el efecto que tiene sobre la viabilidad celular la incubación con moléculas neurotóxicas como el péptido β -amiloide, ya que el mecanismo de acción de muchos de estos compuestos es la generación intracelular de radicales libres de oxígeno.

El primer paso consistió en un estudio de viabilidad celular en el que las células Neuro2a se incubaban al mismo tiempo con peróxido de hidrógeno y concentraciones crecientes de tungstato sódico. Se observa que el tungstato sódico (Figura 6.27) tiene un efecto dosis-respuesta atenuante sobre la muerte celular producida por peróxido de hidrógeno.

¿A qué se debe este efecto? ¿El tungstato sódico es capaz simplemente de neutralizar el efecto pro-oxidativo del peróxido de hidrógeno debido a una capacidad antioxidante? ¿O existe otro mecanismo más complejo molecular subyacente responsable de su efecto?

Si el tungstato sódico actúa como un agente antioxidante clásico sería interesante, pero aún lo sería más si ejerciera su efecto neuroprotector bloqueando rutas de señalización específicas y que se haya descrito que estén involucradas en la defensa frente a procesos neurodegenerativos. Por ello, en primer lugar hemos determinado el efecto del tungstato sódico sobre la generación de radicales libres inducidos por la incubación con peróxido de hidrógeno. Para ello (Figura 6.28), hemos utilizado una sonda fluorescente sensible a radicales libres (DCFDA) y analizado mediante citometría de flujo la generación de radicales libres intracelulares. Los resultados indican que el tungstato sódico no tiene capacidad de

disminuir la generación de radicales libres dentro de la célula y que por tanto su mecanismo de acción debe de ser diferente.

La cuestión por tanto es conocer qué mecanismos moleculares son activados por el tungstato sódico para prevenir la muerte celular. Ante situaciones de estrés, la autofagia actúa como mecanismo de defensa degradando las proteínas y orgánulos que puedan estar dañados-oxidados. Si el efecto de los agentes estresantes supera a la capacidad protectora del proceso de autofagia, esta continúa hasta producir la muerte de la célula. Este fenómeno ocurre en el caso del estrés oxidativo y, en concreto, cuando es generado por peróxido de hidrógeno (Chen *et al.*, 2008).

Hemos medido el efecto del tungstato sódico sobre la autofagia inducida por peróxido de hidrógeno (Figura 6.29), los resultados indican que el incremento de autofagia inducido por este compuesto es significativamente reducido por el tungstato sódico. De nuevo, podríamos pensar que las bases moleculares de este efecto podrían ser similares a las descritas por nosotros para el tungstato sódico en músculo frente a una inducción de la autofagia por dexametasona.

El estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno, además de la autofagia, induce la apoptosis (Buttke y Sandstrom, 1994; Matsuzawa e Ichijo, 2008). La apoptosis es un tipo de muerte celular controlada por un complejo entramado de rutas de señalización (Hotchkiss *et al.*, 2009; Kam y Ferch, 2000). Las células que se encuentran en esta situación, muestran una serie de características propias a nivel morfológico y molecular como son la condensación de la cromatina, que origina cambios en la morfología del núcleo, y la fragmentación del DNA (Ghibelli *et al.*, 1995). Puesto que autofagia y apoptosis se presentan en condiciones de estrés oxidativo y habíamos comprobado que el tungstato sódico presentaba un efecto inhibitorio sobre la primera, decidimos evaluar su papel sobre la segunda, esto es, la apoptosis.

Para ello, en primer lugar se abordó el estudio de la morfología nuclear. Un elevado porcentaje de las células que habían sido cultivadas en presencia de peróxido de hidrógeno presentaban un núcleo de forma cóncava que es propio del estado de apoptosis. Cuando al medio de cultivo se añadía tungstato sódico de forma simultánea, el porcentaje de células con dicha morfología era significativamente menor (Figura 6.30).

Como hemos comentado, otro evento que se produce en las células cuando entran en apoptosis es la fragmentación del DNA. En realidad, es este fenómeno el que origina los cambios en la morfología nuclear (Tounekti *et al.*, 1995). Habitualmente, la fragmentación de DNA, se estudia por electroforesis en geles de agarosa si bien el análisis por citometría de flujo resulta más conveniente cuando se desea cuantificar el porcentaje de células apoptóticas dentro de una población.

A la hora de abordar estos experimentos, se consideró emplear una dosis mayor de peróxido de hidrógeno de la que veníamos usando hasta el momento ya que, aunque 250 μ M desencadena los mecanismos moleculares que conducen a la

muerte celular, esta no es notoria hasta transcurridas 48 h. Usando el doble de dosis, el porcentaje de células Neuro2a muertas por apoptosis a las 24 h aumentaba considerablemente. En estas condiciones, el cultivo concomitante con peróxido de hidrógeno y tungstato sódico condujo a una disminución significativa de la muerte celular (Figura 6.31).

Por otra parte, se conoce que, en condiciones normales, en torno al 2% del oxígeno consumido por la mitocondria genera especies reactivas de oxígeno (ROS) debido al funcionamiento de la cadena transportadora de electrones (Circu y Aw, 2010). Ante determinadas situaciones de estrés, se puede incrementar la cantidad de radicales libre generados por la mitocondria lo que puede conducir al daño de este orgánulo (Orrenius, 2007). La lesión de la mitocondria por ROS provoca la permeabilización de su membrana y la salida al exterior de proteínas proapoptóticas. Entre ellas destaca el citocromo c que desencadena la muerte celular por una vía dependiente de caspasas cuyo último efector es la caspasa-3 (Zhuang *et al.*, 1999). Esta es la que se conoce como vía intrínseca de la apoptosis y sobre ella decidimos estudiar el papel del tungstato sódico.

Experimentos de *Western blot* pusieron de manifiesto que, cuando las células Neuro2a eran incubadas con peróxido de hidrógeno, la forma activa de la caspasa-3 se incrementaba notablemente (Figura 6.32). Esta situación era revertida cuando en el medio de cultivo también se añadía tungstato sódico. Así pues, podemos concluir que el efecto protector del tungstato sódico frente a la apoptosis mediada por estrés oxidativo puede estar relacionado con el mantenimiento de la integridad de la mitocondria ya que se ven disminuidos los efectos de la caspasa efectora. Para un conocimiento más completo de los efectos del tungstato sobre la apoptosis, son necesarios nuevos experimentos que profundicen sobre esta vía así como sobre la llamada vía extrínseca.

Por otra parte, el proceso de apoptosis también se encuentra regulado por las rutas de señalización de Ras-Raf-MEK/ERK y PKB/Akt. Está establecido que la activación de la segunda tiene un efecto antiapoptótico, mientras que la activación de ERK tiene un papel dual en función de la situación fisiopatológica y del tipo de estímulos estudiados (Lu y Xu, 2006; Zhang *et al.*, 2011). Como hicimos en ocasiones anteriores, estudiamos los niveles de las quinasas ERK1/2 y Akt en una situación de estrés oxidativo mediado por peróxido de hidrógeno, así como los efectos del tungstato sódico sobre ellos.

En ambos casos, la incubación de las células Neuro2a con peróxido de hidrógeno durante treinta minutos originó una disminución de los niveles de fosforilación de estas proteínas respecto al grupo control. Dicha disminución se vio revertida parcialmente por la presencia de tungstato sódico en el medio de cultivo (Figura 6.33). Si bien el efecto sobre ERK1/2 podía ser esperado, los experimentos previos han demostrado que el tungstato sódico no activa Akt y en esta ocasión, observamos que los niveles de fosforilación se recuperan en parte. Con este resultado concluimos que el tungstato sódico reprime la apoptosis reactivando dos

vías de señalización antiapoptóticas, aunque es conveniente realizar nuevos ensayos para conocer en detalle el mecanismo por el que se ve implicada la vía de PKB/Akt.

En resumen, el tungstato sódico presenta un notable efecto neuroprotector frente a la apoptosis desencadenada por estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno. Para conseguir este efecto se produce una recuperación de la señalización a través de las vías de ERK y Akt, así como una inactivación de la vía intrínseca de la apoptosis.

8 CONCLUSIONES

1. El tungstato sódico favorece la diferenciación de mioblastos L6 en miotubos. Esto es debido a que el tungstato produce una rápida modificación de los niveles de expresión de los MRF (*myogenic regulatory factors*) y a un aumento de la expresión de MEF2D ya inhibe su sumoilación y degradación. Al mismo tiempo, antagoniza la inhibición de MEF2D por la fosforilación dependiente de cAMP.
2. El tungstato sódico incrementa la síntesis y previene la degradación de proteínas en miotubos L6. Este efecto radica en la activación de la quinasa mTOR y la inhibición de los factores de transcripción FoxO; ambos fenómenos mediados por la activación de ERK1/2.
3. El tungstato sódico induce la diferenciación de células Neuro2a en neuronas de tipo colinérgico. Para que este fenómeno se produzca es necesario al menos la no inhibición de la vía de Akt, la activación mantenida de la quinasa ERK1/2 y la inducción del factor de transcripción MEF2D.
4. La muerte celular inducida por estrés oxidativo en células Neuro2a es paliada en presencia de tungstato sódico. En este sentido, tanto los procesos de autofagia como de apoptosis se ven atenuados. Las quinasas Akt y ERK1/2 pueden tener un papel relevante en este efecto ya que sus niveles de fosforilación se recuperan parcialmente por efecto de la incubación con tungstato sódico.

9 BIBLIOGRAFÍA

Adi, S., Bin-Abbas, B., Wu, N.Y., and Rosenthal, S.M. (2002). Early stimulation and late inhibition of extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation by IGF-I: a potential mechanism mediating the switch in IGF-I action on skeletal muscle cell differentiation. *Endocrinology* *143*, 511-516.

Alam, Z.I., Daniel, S.E., Lees, A.J., Marsden, D.C., Jenner, P., and Halliwell, B. (1997a). A generalised increase in protein carbonyls in the brain in Parkinson's but not incidental Lewy body disease. *Journal of neurochemistry* *69*, 1326-1329.

Alam, Z.I., Jenner, A., Daniel, S.E., Lees, A.J., Cairns, N., Marsden, C.D., Jenner, P., and Halliwell, B. (1997b). Oxidative DNA damage in the parkinsonian brain: an apparent selective increase in 8-hydroxyguanine levels in substantia nigra. *Journal of neurochemistry* *69*, 1196-1203.

Altman, J. (1962). Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science* *135*, 1127-1128.

Ansari, M.A., and Scheff, S.W. (2010). Oxidative stress in the progression of Alzheimer disease in the frontal cortex. *Journal of neuropathology and experimental neurology* *69*, 155-167.

Aranda, P.S., Lajoie, D.M., and Jorcyk, C.L. (2012). Bleach gel: a simple agarose gel for analyzing RNA quality. *Electrophoresis* *33*, 366-369.

Arsenault, J., Cuijpers, S.A., Ferrari, E., Niranjana, D., Rust, A., Leese, C., O'Brien, J.A., Binz, T., and Davletov, B. (2014). Botulinum protease-cleaved SNARE fragments induce cytotoxicity in neuroblastoma cells. *Journal of neurochemistry* *129*, 781-791.

Bachmann, R.A., Kim, J.H., Wu, A.L., Park, I.H., and Chen, J. (2006). A nuclear transport signal in mammalian target of rapamycin is critical for its cytoplasmic signaling to S6 kinase 1. *The Journal of biological chemistry* *281*, 7357-7363.

Ballester, J., Dominguez, J., Munoz, M.C., Sensat, M., Rigau, T., Guinovart, J.J., and Rodriguez-Gil, J.E. (2005). Tungstate treatment improves Leydig cell function in streptozotocin-diabetic rats. *Journal of andrology* *26*, 706-715.

Barbera, A., Fernandez-Alvarez, J., Truc, A., Gomis, R., and Guinovart, J.J. (1997). Effects of tungstate in neonatally streptozotocin-induced diabetic rats: mechanism leading to normalization of glycaemia. *Diabetologia* *40*, 143-149.

Barbera, A., Gomis, R.R., Prats, N., Rodriguez-Gil, J.E., Domingo, M., Gomis, R., and Guinovart, J.J. (2001). Tungstate is an effective antidiabetic agent in streptozotocin-induced diabetic rats: a long-term study. *Diabetologia* *44*, 507-513.

Barbera, A., Rodriguez-Gil, J.E., and Guinovart, J.J. (1994). Insulin-like actions of tungstate in diabetic rats. Normalization of hepatic glucose metabolism. *The Journal of biological chemistry* *269*, 20047-20053.

Bentzinger, C.F., Wang, Y.X., and Rudnicki, M.A. (2012). Building muscle: molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* *4*.

Berchtold, D., and Walther, T.C. (2009). TORC2 plasma membrane localization is essential for cell viability and restricted to a distinct domain. *Molecular biology of the cell* *20*, 1565-1575.

Berlett, B.S., and Stadtman, E.R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *The Journal of biological chemistry* *272*, 20313-20316.

Bhatnagar, S., Kumar, A., Makonchuk, D.Y., Li, H., and Kumar, A. (2010). Transforming growth factor-beta-activated kinase 1 is an essential regulator of myogenic differentiation. *The Journal of biological chemistry* *285*, 6401-6411.

Bigbee, J.W., Sharma, K.V., Chan, E.L., and Bogler, O. (2000). Evidence for the direct role of acetylcholinesterase in neurite outgrowth in primary dorsal root ganglion neurons. *Brain research* *861*, 354-362.

Black, B.L., and Olson, E.N. (1998). Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annual review of cell and developmental biology* *14*, 167-196.

Blais, A., Tsikitis, M., Acosta-Alvear, D., Sharan, R., Kluger, Y., and Dynlacht, B.D. (2005). An initial blueprint for myogenic differentiation. *Genes & development* *19*, 553-569.

Bodine, S.C., Latres, E., Baumhueter, S., Lai, V.K., Nunez, L., Clarke, B.A., Poueymirou, W.T., Panaro, F.J., Na, E., Dharmarajan, K., *et al.* (2001). Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* *294*, 1704-1708.

Bonaldo, P., and Sandri, M. (2013). Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Disease models & mechanisms* *6*, 25-39.

Bonini, N.M., and Giasson, B.I. (2005). Snaring the function of alpha-synuclein. *Cell* *123*, 359-361.

- Breusing, N., and Grune, T. (2008). Regulation of proteasome-mediated protein degradation during oxidative stress and aging. *Biological chemistry* 389, 203-209.
- Browne, S.E., Ferrante, R.J., and Beal, M.F. (1999). Oxidative stress in Huntington's disease. *Brain pathology* 9, 147-163.
- Brugarolas, J., Lei, K., Hurley, R.L., Manning, B.D., Reiling, J.H., Hafen, E., Witters, L.A., Ellisen, L.W., and Kaelin, W.G., Jr. (2004). Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes & development* 18, 2893-2904.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J., and Greenberg, M.E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857-868.
- Budanov, A.V., and Karin, M. (2008). p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. *Cell* 134, 451-460.
- Butcher, L.L., Oh, J.D., Woolf, N.J., Edwards, R.H., and Roghani, A. (1992). Organization of central cholinergic neurons revealed by combined in situ hybridization histochemistry and choline-O-acetyltransferase immunocytochemistry. *Neurochemistry international* 21, 429-445.
- Buttke, T.M., and Sandstrom, P.A. (1994). Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunology today* 15, 7-10.
- Cabane, C., Coldefy, A.S., Yeow, K., and Derijard, B. (2004). The p38 pathway regulates Akt both at the protein and transcriptional activation levels during myogenesis. *Cellular signalling* 16, 1405-1415.
- Circu, M.L., and Aw, T.Y. (2010). Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free radical biology & medicine* 48, 749-762.
- Claret, M., Corominola, H., Canals, I., Saura, J., Barcelo-Batllo, S., Guinovart, J.J., and Gomis, R. (2005). Tungstate decreases weight gain and adiposity in obese rats through increased thermogenesis and lipid oxidation. *Endocrinology* 146, 4362-4369.
- Cleveland, D.W., and Rothstein, J.D. (2001). From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nature reviews Neuroscience* 2, 806-819.
- Cohen, S., Brault, J.J., Gygi, S.P., Glass, D.J., Valenzuela, D.M., Gartner, C., Latres, E., and Goldberg, A.L. (2009). During muscle atrophy, thick, but not thin, filament components are degraded by MuRF1-dependent ubiquitylation. *The Journal of cell biology* 185, 1083-1095.

Coleman, M.E., DeMayo, F., Yin, K.C., Lee, H.M., Geske, R., Montgomery, C., and Schwartz, R.J. (1995). Myogenic vector expression of insulin-like growth factor I stimulates muscle cell differentiation and myofiber hypertrophy in transgenic mice. *The Journal of biological chemistry* 270, 12109-12116.

Colucci-D'Amato, L., Bonavita, V., and di Porzio, U. (2006). The end of the central dogma of neurobiology: stem cells and neurogenesis in adult CNS. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology* 27, 266-270.

Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M., and Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17, 1195-1214.

Cox, D.M., Du, M., Marback, M., Yang, E.C., Chan, J., Siu, K.W., and McDermott, J.C. (2003). Phosphorylation motifs regulating the stability and function of myocyte enhancer factor 2A. *The Journal of biological chemistry* 278, 15297-15303.

Chan, S.F., Huang, X., McKercher, S.R., Zaidi, R., Okamoto, S.I., Nakanishi, N., and Lipton, S.A. (2015). Transcriptional profiling of MEF2-regulated genes in human neural progenitor cells derived from embryonic stem cells. *Genomics data* 3, 24-27.

Chauvin, C., Koka, V., Nouschi, A., Mieulet, V., Hoareau-Aveilla, C., Dreazen, A., Cagnard, N., Carpentier, W., Kiss, T., Meyuhas, O., *et al.* (2014). Ribosomal protein S6 kinase activity controls the ribosome biogenesis transcriptional program. *Oncogene* 33, 474-483.

Chen, A.E., Ginty, D.D., and Fan, C.M. (2005). Protein kinase A signalling via CREB controls myogenesis induced by Wnt proteins. *Nature* 433, 317-322.

Chen, S.L., Loffler, K.A., Chen, D., Stallcup, M.R., and Muscat, G.E. (2002). The coactivator-associated arginine methyltransferase is necessary for muscle differentiation: CARM1 coactivates myocyte enhancer factor-2. *The Journal of biological chemistry* 277, 4324-4333.

Chen, Y., McMillan-Ward, E., Kong, J., Israels, S.J., and Gibson, S.B. (2008). Oxidative stress induces autophagic cell death independent of apoptosis in transformed and cancer cells. *Cell death and differentiation* 15, 171-182.

Cheng, K.C., Cahill, D.S., Kasai, H., Nishimura, S., and Loeb, L.A. (1992). 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G----T and A----C substitutions. *The Journal of biological chemistry* 267, 166-172.

Chinta, S.J., Mallajosyula, J.K., Rane, A., and Andersen, J.K. (2010). Mitochondrial alpha-synuclein accumulation impairs complex I function in dopaminergic neurons and results in increased mitophagy in vivo. *Neuroscience letters* 486, 235-239.

Cho, J.E., Fournier, M., Da, X., and Lewis, M.I. (2010). Time course expression of Foxo transcription factors in skeletal muscle following corticosteroid administration. *Journal of applied physiology* 108, 137-145.

Choi, J., Levey, A.I., Weintraub, S.T., Rees, H.D., Gearing, M., Chin, L.S., and Li, L. (2004). Oxidative modifications and down-regulation of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 associated with idiopathic Parkinson's and Alzheimer's diseases. *The Journal of biological chemistry* 279, 13256-13264.

Chong, Z.Z., Shang, Y.C., Wang, S., and Maiese, K. (2012). A Critical Kinase Cascade in Neurological Disorders: PI 3-K, Akt, and mTOR. *Future neurology* 7, 733-748.

Dalfo, E., and Ferrer, I. (2008). Early alpha-synuclein lipoxidation in neocortex in Lewy body diseases. *Neurobiology of aging* 29, 408-417.

De Angelis, L., Borghi, S., Melchionna, R., Berghella, L., Baccarani-Contri, M., Parise, F., Ferrari, S., and Cossu, G. (1998). Inhibition of myogenesis by transforming growth factor beta is density-dependent and related to the translocation of transcription factor MEF2 to the cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 12358-12363.

Dennis, P.B., Jaeschke, A., Saitoh, M., Fowler, B., Kozma, S.C., and Thomas, G. (2001). Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor. *Science* 294, 1102-1105.

Desai, B.N., Myers, B.R., and Schreiber, S.L. (2002). FKBP12-rapamycin-associated protein associates with mitochondria and senses osmotic stress via mitochondrial dysfunction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 4319-4324.

Dexter, D.T., Carter, C.J., Wells, F.R., Javoy-Agid, F., Agid, Y., Lees, A., Jenner, P., and Marsden, C.D. (1989). Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry* 52, 381-389.

Dexter, D.T., Holley, A.E., Flitter, W.D., Slater, T.F., Wells, F.R., Daniel, S.E., Lees, A.J., Jenner, P., and Marsden, C.D. (1994). Increased levels of lipid hydroperoxides in the parkinsonian substantia nigra: an HPLC and ESR study. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 9, 92-97.

Dibble, C.C., and Manning, B.D. (2013). Signal integration by mTORC1 coordinates nutrient input with biosynthetic output. *Nature cell biology* 15, 555-564.

- Dickey, C.A., De Mesquita, D.D., Morgan, D., and Pennypacker, K.R. (2004). Induction of memory-associated immediate early genes by nerve growth factor in rat primary cortical neurons and differentiated mouse Neuro2A cells. *Neuroscience letters* 366, 10-14.
- Dominguez, J.E., Munoz, M.C., Zafra, D., Sanchez-Perez, I., Baque, S., Caron, M., Mercurio, C., Barbera, A., Perona, R., Gomis, R., *et al.* (2003). The antidiabetic agent sodium tungstate activates glycogen synthesis through an insulin receptor-independent pathway. *The Journal of biological chemistry* 278, 42785-42794.
- Dorrello, N.V., Peschiaroli, A., Guardavaccaro, D., Colburn, N.H., Sherman, N.E., and Pagano, M. (2006). S6K1- and betaTRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth. *Science* 314, 467-471.
- Drenan, R.M., Liu, X., Bertram, P.G., and Zheng, X.F. (2004). FKBP12-rapamycin-associated protein or mammalian target of rapamycin (FRAP/mTOR) localization in the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. *The Journal of biological chemistry* 279, 772-778.
- Du, M., Perry, R.L., Nowacki, N.B., Gordon, J.W., Salma, J., Zhao, J., Aziz, A., Chan, J., Siu, K.W., and McDermott, J.C. (2008). Protein kinase A represses skeletal myogenesis by targeting myocyte enhancer factor 2D. *Molecular and cellular biology* 28, 2952-2970.
- Durackova, Z. (2010). Some current insights into oxidative stress. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 59, 459-469.
- Ebisuya, M., Kondoh, K., and Nishida, E. (2005). The duration, magnitude and compartmentalization of ERK MAP kinase activity: mechanisms for providing signaling specificity. *Journal of cell science* 118, 2997-3002.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology* 35, 495-516.
- Ernst, A., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Perl, S., Tisdale, J., Possnert, G., Druid, H., and Frisen, J. (2014). Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. *Cell* 156, 1072-1083.
- Espinet, C., Gonzalo, H., Fleitas, C., Menal, M.J., and Egea, J. (2015). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a neurotrophic approach. *Current drug targets* 16, 20-30.
- Esterbauer, H., Schaur, R.J., and Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free radical biology & medicine* 11, 81-128.

Ewton, D.Z., and Florini, J.R. (1981). Effects of the somatomedins and insulin on myoblast differentiation in vitro. *Developmental biology* 86, 31-39.

Fernandez-Marino, A.I., Ciudad, P., Zafra, D., Nocito, L., Dominguez, J., Oliván-Viguera, A., Kohler, R., Lopez-Lopez, J.R., Perez-Garcia, M.T., Valverde, M.A., *et al.* (2015). Tungstate-targeting of BK α channels tunes ERK phosphorylation and cell proliferation in human vascular smooth muscle. *PLoS one* 10, e0118148.

Ferrante, R.J., Browne, S.E., Shinobu, L.A., Bowling, A.C., Baik, M.J., MacGarvey, U., Kowall, N.W., Brown, R.H., Jr., and Beal, M.F. (1997). Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neurochemistry* 69, 2064-2074.

Fujino, G., Noguchi, T., Matsuzawa, A., Yamauchi, S., Saitoh, M., Takeda, K., and Ichijo, H. (2007). Thioredoxin and TRAF family proteins regulate reactive oxygen species-dependent activation of ASK1 through reciprocal modulation of the N-terminal homophilic interaction of ASK1. *Molecular and cellular biology* 27, 8152-8163.

Fukuda, I., Ito, A., Hirai, G., Nishimura, S., Kawasaki, H., Saitoh, H., Kimura, K., Sodeoka, M., and Yoshida, M. (2009). Ginkgolic acid inhibits protein SUMOylation by blocking formation of the E1-SUMO intermediate. *Chemistry & biology* 16, 133-140.

Gage, F.H., and Temple, S. (2013). Neural stem cells: generating and regenerating the brain. *Neuron* 80, 588-601.

Galbiati, F., Volonte, D., Engelman, J.A., Scherer, P.E., and Lisanti, M.P. (1999). Targeted down-regulation of caveolin-3 is sufficient to inhibit myotube formation in differentiating C2C12 myoblasts. Transient activation of p38 mitogen-activated protein kinase is required for induction of caveolin-3 expression and subsequent myotube formation. *The Journal of biological chemistry* 274, 30315-30321.

Gallagher, J.W., Kubica, N., Kimball, S.R., and Jefferson, L.S. (2008). Reduced eukaryotic initiation factor 2B ϵ -subunit expression suppresses the transformed phenotype of cells overexpressing the protein. *Cancer research* 68, 8752-8760.

Ge, X., Zhang, Y., and Jiang, H. (2013). Signaling pathways mediating the effects of insulin-like growth factor-I in bovine muscle satellite cells. *Mol Cell Endocrinol* 372, 23-29.

Gherzi, R., Trabucchi, M., Ponassi, M., Gallouzi, I.E., Rosenfeld, M.G., and Briata, P. (2010). Akt2-mediated phosphorylation of Pitx2 controls Ccnd1 mRNA decay during muscle cell differentiation. *Cell death and differentiation* 17, 975-983.

Ghibelli, L., Maresca, V., Coppola, S., and Gualandi, G. (1995). Protease inhibitors block apoptosis at intermediate stages: a compared analysis of DNA fragmentation and apoptotic nuclear morphology. *FEBS Lett* 377, 9-14.

Giron, M.D., Caballero, J.J., Vargas, A.M., Suarez, M.D., Guinovart, J.J., and Salto, R. (2003). Modulation of glucose transporters in rat diaphragm by sodium tungstate. *FEBS Lett* 542, 84-88.

Giron, M.D., Sevillano, N., Vargas, A.M., Dominguez, J., Guinovart, J.J., and Salto, R. (2008). 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* 51, 1285-1295.

Girón, M.D., Vílchez, J.D., Salto, R., Manzano, M., Sevillano, N., Campos, N., Argilés, J.M., Rueda, R., and López-Pedrosa, J.M. (2015). Conversion of leucine to β -hydroxy- β -methylbutyrate by α -keto isocaproate dioxygenase is required for a potent stimulation of protein synthesis in L6 rat myotubes. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*.

Gomez-Ramos, A., Dominguez, J., Zafra, D., Corominola, H., Gomis, R., Guinovart, J.J., and Avila, J. (2006). Sodium tungstate decreases the phosphorylation of tau through GSK3 inactivation. *Journal of neuroscience research* 83, 264-273.

Gong, X., Tang, X., Wiedmann, M., Wang, X., Peng, J., Zheng, D., Blair, L.A., Marshall, J., and Mao, Z. (2003). Cdk5-mediated inhibition of the protective effects of transcription factor MEF2 in neurotoxicity-induced apoptosis. *Neuron* 38, 33-46.

Gordon, B.S., Kelleher, A.R., and Kimball, S.R. (2013). Regulation of muscle protein synthesis and the effects of catabolic states. *The international journal of biochemistry & cell biology* 45, 2147-2157.

Greer, E.L., Oskoui, P.R., Banko, M.R., Maniar, J.M., Gygi, M.P., Gygi, S.P., and Brunet, A. (2007). The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor. *The Journal of biological chemistry* 282, 30107-30119.

Gregoire, S., Tremblay, A.M., Xiao, L., Yang, Q., Ma, K., Nie, J., Mao, Z., Wu, Z., Giguere, V., and Yang, X.J. (2006). Control of MEF2 transcriptional activity by coordinated phosphorylation and sumoylation. *The Journal of biological chemistry* 281, 4423-4433.

Gregoire, S., and Yang, X.J. (2005). Association with class IIa histone deacetylases upregulates the sumoylation of MEF2 transcription factors. *Molecular and cellular biology* 25, 2273-2287.

Gritti, A., Bonfanti, L., Doetsch, F., Caille, I., Alvarez-Buylla, A., Lim, D.A., Galli, R., Verdugo, J.M., Herrera, D.G., and Vescovi, A.L. (2002). Multipotent neural stem cells reside into the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22, 437-445.

Groenewoud, M.J., Goorden, S.M., Kassies, J., Pellis-van Berkel, W., Lamb, R.F., Elgersma, Y., and Zwartkruis, F.J. (2013). Mammalian target of rapamycin complex I (mTORC1) activity in ras homologue enriched in brain (Rheb)-deficient mouse embryonic fibroblasts. *PLoS one* 8, e81649.

Grune, T., Jung, T., Merker, K., and Davies, K.J. (2004). Decreased proteolysis caused by protein aggregates, inclusion bodies, plaques, lipofuscin, ceroid, and 'aggresomes' during oxidative stress, aging, and disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* 36, 2519-2530.

Gurney, M.E., Pu, H., Chiu, A.Y., Dal Canto, M.C., Polchow, C.Y., Alexander, D.D., Caliendo, J., Hentati, A., Kwon, Y.W., Deng, H.X., *et al.* (1994). Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 264, 1772-1775.

Gwinn, D.M., Shackelford, D.B., Egan, D.F., Mihaylova, M.M., Mery, A., Vasquez, D.S., Turk, B.E., and Shaw, R.J. (2008). AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Molecular cell* 30, 214-226.

Han, J., and Molkenstein, J.D. (2000). Regulation of MEF2 by p38 MAPK and its implication in cardiomyocyte biology. *Trends in cardiovascular medicine* 10, 19-22.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology* 166, 557-580.

Hannan, K.M., Brandenburger, Y., Jenkins, A., Sharkey, K., Cavanaugh, A., Rothblum, L., Moss, T., Poortinga, G., McArthur, G.A., Pearson, R.B., *et al.* (2003). mTOR-dependent regulation of ribosomal gene transcription requires S6K1 and is mediated by phosphorylation of the carboxy-terminal activation domain of the nucleolar transcription factor UBF. *Molecular and cellular biology* 23, 8862-8877.

Hara, K., Maruki, Y., Long, X., Yoshino, K., Oshiro, N., Hidayat, S., Tokunaga, C., Avruch, J., and Yonezawa, K. (2002). Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* 110, 177-189.

Hara, K., Yonezawa, K., Weng, Q.P., Kozlowski, M.T., Belham, C., and Avruch, J. (1998). Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism. *The Journal of biological chemistry* 273, 14484-14494.

Hedin, L., and Rosberg, S. (1983). Forskolin effects on the cAMP system and steroidogenesis in the immature rat ovary. *Mol Cell Endocrinol* 33, 69-80.

Heesom, K.J., and Denton, R.M. (1999). Dissociation of the eukaryotic initiation factor-4E/4E-BP1 complex involves phosphorylation of 4E-BP1 by an mTOR-associated kinase. *FEBS Lett* 457, 489-493.

Heron-Milhavet, L., Franckhauser, C., Rana, V., Berthenet, C., Fisher, D., Hemmings, B.A., Fernandez, A., and Lamb, N.J. (2006). Only Akt1 is required for proliferation, while Akt2 promotes cell cycle exit through p21 binding. *Molecular and cellular biology* 26, 8267-8280.

Heron-Milhavet, L., Mamaeva, D., Rochat, A., Lamb, N.J., and Fernandez, A. (2008). Akt2 is implicated in skeletal muscle differentiation and specifically binds Prohibitin2/REA. *Journal of cellular physiology* 214, 158-165.

Hershey, J.W., Sonenberg, N., and Mathews, M.B. (2012). Principles of translational control: an overview. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4.

Holterman, C.E., and Rudnicki, M.A. (2005). Molecular regulation of satellite cell function. *Seminars in cell & developmental biology* 16, 575-584.

Holz, M.K., Ballif, B.A., Gygi, S.P., and Blenis, J. (2005). mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell* 123, 569-580.

Hong, D.H., and Forsberg, N.E. (1995). Effects of dexamethasone on protein degradation and protease gene expression in rat L8 myotube cultures. *Mol Cell Endocrinol* 108, 199-209.

Hotchkiss, R.S., Strasser, A., McDunn, J.E., and Swanson, P.E. (2009). Cell death. *The New England journal of medicine* 361, 1570-1583.

Hribal, M.L., Nakae, J., Kitamura, T., Shutter, J.R., and Accili, D. (2003). Regulation of insulin-like growth factor-dependent myoblast differentiation by Foxo forkhead transcription factors. *The Journal of cell biology* 162, 535-541.

Hrvoj-Mihic, B., Bienvenu, T., Stefanacci, L., Muotri, A.R., and Semendeferi, K. (2013). Evolution, development, and plasticity of the human brain: from molecules to bones. *Frontiers in human neuroscience* 7, 707.

Inoki, K., Li, Y., Xu, T., and Guan, K.L. (2003). Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes & development* 17, 1829-1834.

Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J., and Guan, K.L. (2002). TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nature cell biology* 4, 648-657.

Inoki, K., Ouyang, H., Zhu, T., Lindvall, C., Wang, Y., Zhang, X., Yang, Q., Bennett, C., Harada, Y., Stankunas, K., *et al.* (2006). TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell* 126, 955-968.

Isobe, C., Abe, T., and Terayama, Y. (2010). Levels of reduced and oxidized coenzyme Q-10 and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in the CSF of patients with Alzheimer's disease demonstrate that mitochondrial oxidative damage and/or oxidative DNA damage contributes to the neurodegenerative process. *Journal of neurology* 257, 399-404.

Izumiya, Y., Hopkins, T., Morris, C., Sato, K., Zeng, L., Viereck, J., Hamilton, J.A., Ouchi, N., LeBrasseur, N.K., and Walsh, K. (2008). Fast/Glycolytic muscle fiber growth reduces fat mass and improves metabolic parameters in obese mice. *Cell metabolism* 7, 159-172.

Jacobs, B.L., Goodman, C.A., and Hornberger, T.A. (2014). The mechanical activation of mTOR signaling: an emerging role for late endosome/lysosomal targeting. *Journal of muscle research and cell motility* 35, 11-21.

Jewell, J.L., Russell, R.C., and Guan, K.L. (2013). Amino acid signalling upstream of mTOR. *Nature reviews Molecular cell biology* 14, 133-139.

Jiang, D., Jha, N., Boonplueang, R., and Andersen, J.K. (2001). Caspase 3 inhibition attenuates hydrogen peroxide-induced DNA fragmentation but not cell death in neuronal PC12 cells. *Journal of neurochemistry* 76, 1745-1755.

Johansen, T., and Lamark, T. (2011). Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy* 7, 279-296.

Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *The EMBO journal* 19, 5720-5728.

Kam, P.C., and Ferch, N.I. (2000). Apoptosis: mechanisms and clinical implications. *Anaesthesia* 55, 1081-1093.

Kang, J.S., Bae, G.U., Yi, M.J., Yang, Y.J., Oh, J.E., Takaesu, G., Zhou, Y.T., Low, B.C., and Krauss, R.S. (2008). A Cdo-Bnip-2-Cdc42 signaling pathway regulates p38alpha/beta MAPK activity and myogenic differentiation. *The Journal of cell biology* 182, 497-507.

- Karalaki, M., Fili, S., Philippou, A., and Koutsilieris, M. (2009). Muscle regeneration: cellular and molecular events. *In vivo* 23, 779-796.
- Kasler, H.G., Victoria, J., Duramad, O., and Winoto, A. (2000). ERK5 is a novel type of mitogen-activated protein kinase containing a transcriptional activation domain. *Molecular and cellular biology* 20, 8382-8389.
- Kato, Y., Kravchenko, V.V., Tapping, R.I., Han, J., Ulevitch, R.J., and Lee, J.D. (1997). BMK1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor MEF2C. *The EMBO journal* 16, 7054-7066.
- Kato, Y., Zhao, M., Morikawa, A., Sugiyama, T., Chakravorty, D., Koide, N., Yoshida, T., Tapping, R.I., Yang, Y., Yokochi, T., *et al.* (2000). Big mitogen-activated kinase regulates multiple members of the MEF2 protein family. *The Journal of biological chemistry* 275, 18534-18540.
- Keck, S., Nitsch, R., Grune, T., and Ullrich, O. (2003). Proteasome inhibition by paired helical filament-tau in brains of patients with Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry* 85, 115-122.
- Khiem, D., Cyster, J.G., Schwarz, J.J., and Black, B.L. (2008). A p38 MAPK-MEF2C pathway regulates B-cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 17067-17072.
- Kim, D.H., Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Latek, R.R., Guntur, K.V., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D.M. (2003). GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Molecular cell* 11, 895-904.
- Kim, D.K., Cho, E.S., and Um, H.D. (2000). Caspase-dependent and -independent events in apoptosis induced by hydrogen peroxide. *Experimental cell research* 257, 82-88.
- Kim, Y., Phan, D., van Rooij, E., Wang, D.Z., McAnally, J., Qi, X., Richardson, J.A., Hill, J.A., Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. (2008). The MEF2D transcription factor mediates stress-dependent cardiac remodeling in mice. *The Journal of clinical investigation* 118, 124-132.
- Klionsky, D.J., and Codogno, P. (2013). The mechanism and physiological function of macroautophagy. *Journal of innate immunity* 5, 427-433.
- Knaevelsrud, H., and Simonsen, A. (2010). Fighting disease by selective autophagy of aggregate-prone proteins. *FEBS Lett* 584, 2635-2645.

Kokoeva, M.V., Yin, H., and Flier, J.S. (2005). Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. *Science* 310, 679-683.

Komamura, K., Shirotani-Ikejima, H., Tatsumi, R., Tsujita-Kuroda, Y., Kitakaze, M., Miyatake, K., Sunagawa, K., and Miyata, T. (2003). Differential gene expression in the rat skeletal and heart muscle in glucocorticoid-induced myopathy: analysis by microarray. *Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy* 17, 303-310.

Komatsu, M., and Ichimura, Y. (2010). Physiological significance of selective degradation of p62 by autophagy. *FEBS Lett* 584, 1374-1378.

Kristensen, A.R., Gsponer, J., and Foster, L.J. (2013). Protein synthesis rate is the predominant regulator of protein expression during differentiation. *Molecular systems biology* 9, 689.

Kubica, N., Crispino, J.L., Gallagher, J.W., Kimball, S.R., and Jefferson, L.S. (2008). Activation of the mammalian target of rapamycin complex 1 is both necessary and sufficient to stimulate eukaryotic initiation factor 2Bvarepsilon mRNA translation and protein synthesis. *The international journal of biochemistry & cell biology* 40, 2522-2533.

Kuhla, B., Haase, C., Flach, K., Luth, H.J., Arendt, T., and Munch, G. (2007). Effect of pseudophosphorylation and cross-linking by lipid peroxidation and advanced glycation end product precursors on tau aggregation and filament formation. *The Journal of biological chemistry* 282, 6984-6991.

Kuiper, H.C., Bruno, R.S., Traber, M.G., and Stevens, J.F. (2011). Vitamin C supplementation lowers urinary levels of 4-hydroperoxy-2-nonenal metabolites in humans. *Free radical biology & medicine* 50, 848-853.

Kwon, S.H., Hong, S.I., Ma, S.X., Lee, S.Y., and Jang, C.G. (2015). 3',4',7-Trihydroxyflavone prevents apoptotic cell death in neuronal cells from hydrogen peroxide-induced oxidative stress. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 80, 41-51.

Lagirand-Cantaloube, J., Offner, N., Csibi, A., Leibovitch, M.P., Batonnet-Pichon, S., Tintignac, L.A., Segura, C.T., and Leibovitch, S.A. (2008). The initiation factor eIF3-f is a major target for atrogin1/MAFbx function in skeletal muscle atrophy. *The EMBO journal* 27, 1266-1276.

Lam, B.Y., and Chawla, S. (2007). MEF2D expression increases during neuronal differentiation of neural progenitor cells and correlates with neurite length. *Neuroscience letters* 427, 153-158.

Lauderback, C.M., Hackett, J.M., Huang, F.F., Keller, J.N., Szveda, L.I., Markesbery, W.R., and Butterfield, D.A. (2001). The glial glutamate transporter, GLT-1, is oxidatively modified by 4-hydroxy-2-nonenal in the Alzheimer's disease brain: the role of Abeta1-42. *Journal of neurochemistry* *78*, 413-416.

Lecker, S.H., Jagoe, R.T., Gilbert, A., Gomes, M., Baracos, V., Bailey, J., Price, S.R., Mitch, W.E., and Goldberg, A.L. (2004). Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* *18*, 39-51.

Lee, J.E., Lim, M.S., Park, J.H., Park, C.H., and Koh, H.C. (2015). S6K Promotes Dopaminergic Neuronal Differentiation Through PI3K/Akt/mTOR-Dependent Signaling Pathways in Human Neural Stem Cells. *Molecular neurobiology*.

Lei, K., and Davis, R.J. (2003). JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *100*, 2432-2437.

Li, H., Radford, J.C., Ragusa, M.J., Shea, K.L., McKercher, S.R., Zaremba, J.D., Soussou, W., Nie, Z., Kang, Y.J., Nakanishi, N., *et al.* (2008). Transcription factor MEF2C influences neural stem/progenitor cell differentiation and maturation in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 9397-9402.

Li, L., Du, J., Lian, Y., Zhang, Y., Li, X., Liu, Y., Zou, L., and Wu, T. (2015). Protective Effects of Coenzyme Q10 Against Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress in PC12 Cell: The Role of Nrf2 and Antioxidant Enzymes. *Cellular and molecular neurobiology*.

Li, L., Heller-Harrison, R., Czech, M., and Olson, E.N. (1992). Cyclic AMP-dependent protein kinase inhibits the activity of myogenic helix-loop-helix proteins. *Molecular and cellular biology* *12*, 4478-4485.

Li, M., Linseman, D.A., Allen, M.P., Meintzer, M.K., Wang, X., Laessig, T., Wierman, M.E., and Heidenreich, K.A. (2001). Myocyte enhancer factor 2A and 2D undergo phosphorylation and caspase-mediated degradation during apoptosis of rat cerebellar granule neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* *21*, 6544-6552.

Li, Z., Theus, M.H., and Wei, L. (2006). Role of ERK 1/2 signaling in neuronal differentiation of cultured embryonic stem cells. *Development, growth & differentiation* *48*, 513-523.

Lilienbaum, A. (2013). Relationship between the proteasomal system and autophagy. *International journal of biochemistry and molecular biology* 4, 1-26.

Lin, H.S., Jenner, A.M., Ong, C.N., Huang, S.H., Whiteman, M., and Halliwell, B. (2004). A high-throughput and sensitive methodology for the quantification of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: measurement with gas chromatography-mass spectrometry after single solid-phase extraction. *The Biochemical journal* 380, 541-548.

Ling, B.M., Gopinadhan, S., Kok, W.K., Shankar, S.R., Gopal, P., Bharathy, N., Wang, Y., and Taneja, R. (2012). G9a mediates Sharp-1-dependent inhibition of skeletal muscle differentiation. *Molecular biology of the cell* 23, 4778-4785.

Liu, L., Cavanaugh, J.E., Wang, Y., Sakagami, H., Mao, Z., and Xia, Z. (2003). ERK5 activation of MEF2-mediated gene expression plays a critical role in BDNF-promoted survival of developing but not mature cortical neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 8532-8537.

Liu, N., Nelson, B.R., Bezprozvannaya, S., Shelton, J.M., Richardson, J.A., Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. (2014). Requirement of MEF2A, C, and D for skeletal muscle regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 4109-4114.

Lofberg, E., Gutierrez, A., Wernerman, J., Anderstam, B., Mitch, W.E., Price, S.R., Bergstrom, J., and Alvestrand, A. (2002). Effects of high doses of glucocorticoids on free amino acids, ribosomes and protein turnover in human muscle. *European journal of clinical investigation* 32, 345-353.

Lokireddy, S., Wijesoma, I.W., Sze, S.K., McFarlane, C., Kambadur, R., and Sharma, M. (2012). Identification of atrogen-1-targeted proteins during the myostatin-induced skeletal muscle wasting. *American journal of physiology Cell physiology* 303, C512-529.

Lovell, M.A., Gabbita, S.P., and Markesbery, W.R. (1999). Increased DNA oxidation and decreased levels of repair products in Alzheimer's disease ventricular CSF. *Journal of neurochemistry* 72, 771-776.

Lovett, F.A., Cosgrove, R.A., Gonzalez, I., and Pell, J.M. (2010). Essential role for p38alpha MAPK but not p38gamma MAPK in Igf2 expression and myoblast differentiation. *Endocrinology* 151, 4368-4380.

Lu, Z., and Xu, S. (2006). ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis. *IUBMB life* 58, 621-631.

- Lledo, P.M., Alonso, M., and Grubb, M.S. (2006). Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nature reviews Neuroscience* 7, 179-193.
- Lluis, F., Ballestar, E., Suelves, M., Esteller, M., and Munoz-Canoves, P. (2005). E47 phosphorylation by p38 MAPK promotes MyoD/E47 association and muscle-specific gene transcription. *The EMBO journal* 24, 974-984.
- Ma, K., Chan, J.K., Zhu, G., and Wu, Z. (2005). Myocyte enhancer factor 2 acetylation by p300 enhances its DNA binding activity, transcriptional activity, and myogenic differentiation. *Molecular and cellular biology* 25, 3575-3582.
- Ma, L., Teruya-Feldstein, J., Bonner, P., Bernardi, R., Franz, D.N., Witte, D., Cordon-Cardo, C., and Pandolfi, P.P. (2007). Identification of S664 TSC2 phosphorylation as a marker for extracellular signal-regulated kinase mediated mTOR activation in tuberous sclerosis and human cancer. *Cancer research* 67, 7106-7112.
- Mammucari, C., Milan, G., Romanello, V., Masiero, E., Rudolf, R., Del Piccolo, P., Burden, S.J., Di Lisi, R., Sandri, C., Zhao, J., *et al.* (2007). FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell metabolism* 6, 458-471.
- Mandel, J.L., and Pearson, M.L. (1974). Insulin stimulates myogenesis in a rat myoblast line. *Nature* 251, 618-620.
- Mao, Z., Bonni, A., Xia, F., Nadal-Vicens, M., and Greenberg, M.E. (1999). Neuronal activity-dependent cell survival mediated by transcription factor MEF2. *Science* 286, 785-790.
- Mao, Z., and Wiedmann, M. (1999). Calcineurin enhances MEF2 DNA binding activity in calcium-dependent survival of cerebellar granule neurons. *The Journal of biological chemistry* 274, 31102-31107.
- Marshall, C.J. (1995). Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80, 179-185.
- Martinez, A., Portero-Otin, M., Pamplona, R., and Ferrer, I. (2010). Protein targets of oxidative damage in human neurodegenerative diseases with abnormal protein aggregates. *Brain pathology* 20, 281-297.
- Massari, M.E., and Murre, C. (2000). Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Molecular and cellular biology* 20, 429-440.
- Matsura, T., Kai, M., Fujii, Y., Ito, H., and Yamada, K. (1999). Hydrogen peroxide-induced apoptosis in HL-60 cells requires caspase-3 activation. *Free radical research* 30, 73-83.

Matsuzawa, A., and Ichijo, H. (2008). Redox control of cell fate by MAP kinase: physiological roles of ASK1-MAP kinase pathway in stress signaling. *Biochimica et biophysica acta* *1780*, 1325-1336.

McKinsey, T.A., Zhang, C.L., and Olson, E.N. (2002). MEF2: a calcium-dependent regulator of cell division, differentiation and death. *Trends in biochemical sciences* *27*, 40-47.

Mecocci, P., MacGarvey, U., and Beal, M.F. (1994). Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease. *Annals of neurology* *36*, 747-751.

Metsaars, W.P., Hauw, J.J., van Welsem, M.E., and Duyckaerts, C. (2003). A grading system of Alzheimer disease lesions in neocortical areas. *Neurobiology of aging* *24*, 563-572.

Mitsumoto, H., Santella, R.M., Liu, X., Bogdanov, M., Zipprich, J., Wu, H.C., Mahata, J., Kilty, M., Bednarz, K., Bell, D., *et al.* (2008). Oxidative stress biomarkers in sporadic ALS. *Amyotrophic lateral sclerosis : official publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases* *9*, 177-183.

Miyazaki, M., McCarthy, J.J., Fedele, M.J., and Esser, K.A. (2011). Early activation of mTORC1 signalling in response to mechanical overload is independent of phosphoinositide 3-kinase/Akt signalling. *The Journal of physiology* *589*, 1831-1846.

Mizushima, N. (2011). Autophagy in protein and organelle turnover. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* *76*, 397-402.

Mizushima, N., Yoshimori, T., and Levine, B. (2010). Methods in mammalian autophagy research. *Cell* *140*, 313-326.

Mizushima, N., Yoshimori, T., and Ohsumi, Y. (2011). The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annual review of cell and developmental biology* *27*, 107-132.

Mok, G.F., and Sweetman, D. (2011). Many routes to the same destination: lessons from skeletal muscle development. *Reproduction* *141*, 301-312.

Molkentin, J.D., Li, L., and Olson, E.N. (1996). Phosphorylation of the MADS-Box transcription factor MEF2C enhances its DNA binding activity. *The Journal of biological chemistry* *271*, 17199-17204.

Molkentin, J.D., and Olson, E.N. (1996). Combinatorial control of muscle development by basic helix-loop-helix and MADS-box transcription factors.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93, 9366-9373.

Montine, T.J., Montine, K.S., Reich, E.E., Terry, E.S., Porter, N.A., and Morrow, J.D. (2003). Antioxidants significantly affect the formation of different classes of isoprostanes and neuroprostanes in rat cerebral synaptosomes. *Biochemical pharmacology* 65, 611-617.

Morel, P., Tallineau, C., Pontcharraud, R., Piriou, A., and Huguet, F. (1998). Effects of 4-hydroxynonenal, a lipid peroxidation product, on dopamine transport and Na⁺/K⁺ ATPase in rat striatal synaptosomes. *Neurochemistry international* 33, 531-540.

Morris, G.E. (1978). The use of creatine kinase activity as an index of skeletal-muscle differentiation. *Biochemical Society transactions* 6, 509-511.

Mruk, D.D., and Cheng, C.Y. (2011). Enhanced chemiluminescence (ECL) for routine immunoblotting: An inexpensive alternative to commercially available kits. *Spermatogenesis* 1, 121-122.

Mukai, A., and Hashimoto, N. (2008). Localized cyclic AMP-dependent protein kinase activity is required for myogenic cell fusion. *Experimental cell research* 314, 387-397.

Nebbioso, A., Manzo, F., Miceli, M., Conte, M., Manente, L., Baldi, A., De Luca, A., Rotili, D., Valente, S., Mai, A., *et al.* (2009). Selective class II HDAC inhibitors impair myogenesis by modulating the stability and activity of HDAC-MEF2 complexes. *EMBO reports* 10, 776-782.

Nicklin, P., Bergman, P., Zhang, B., Triantafellow, E., Wang, H., Nyfeler, B., Yang, H., Hild, M., Kung, C., Wilson, C., *et al.* (2009). Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell* 136, 521-534.

Niedzielska, E., Smaga, I., Gawlik, M., Moniczewski, A., Stankowicz, P., Pera, J., and Filip, M. (2015). Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Molecular neurobiology*.

Niehrs, C. (2012). The complex world of WNT receptor signalling. *Nature reviews Molecular cell biology* 13, 767-779.

Nishimura, A., Morita, M., Nishimura, Y., and Sugino, Y. (1990). A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucleic acids research* 18, 6169.

Nocito, L., Zafra, D., Calbo, J., Dominguez, J., and Guinovart, J.J. (2012). Tungstate reduces the expression of gluconeogenic enzymes in STZ rats. *PloS one* 7, e42305.

Noguchi, T., Takeda, K., Matsuzawa, A., Saegusa, K., Nakano, H., Gohda, J., Inoue, J., and Ichijo, H. (2005). Recruitment of tumor necrosis factor receptor-associated factor family proteins to apoptosis signal-regulating kinase 1 signalosome is essential for oxidative stress-induced cell death. *The Journal of biological chemistry* 280, 37033-37040.

Ogata, M., Kaneya, D., Shin-Ya, K., Li, L., Abe, Y., Katoh, H., Seki, S., Seki, Y., Gonda, R., Urano, S., *et al.* (2005). Trapping effect of eugenol on hydroxyl radicals induced by L-DOPA in vitro. *Chemical & pharmaceutical bulletin* 53, 1167-1170.

Ohsumi, Y. (2001). Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nature reviews Molecular cell biology* 2, 211-216.

Olmsted, J.B., Carlson, K., Klebe, R., Ruddle, F., and Rosenbaum, J. (1970). Isolation of microtubule protein from cultured mouse neuroblastoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 65, 129-136.

Orlova, K.A., and Crino, P.B. (2010). The tuberous sclerosis complex. *Ann N Y Acad Sci* 1184, 87-105.

Orrenius, S. (2007). Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death. *Drug metabolism reviews* 39, 443-455.

Palacios, D., Mozzetta, C., Consalvi, S., Caretti, G., Saccone, V., Proserpio, V., Marquez, V.E., Valente, S., Mai, A., Forcales, S.V., *et al.* (2010). TNF/p38alpha/polycomb signaling to Pax7 locus in satellite cells links inflammation to the epigenetic control of muscle regeneration. *Cell stem cell* 7, 455-469.

Palmer, T.D., Ray, J., and Gage, F.H. (1995). FGF-2-responsive neuronal progenitors reside in proliferative and quiescent regions of the adult rodent brain. *Molecular and cellular neurosciences* 6, 474-486.

Palmer, T.D., Takahashi, J., and Gage, F.H. (1997). The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Molecular and cellular neurosciences* 8, 389-404.

Pantke, U., Volk, T., Schmutzler, M., Kox, W.J., Sitte, N., and Grune, T. (1999). Oxidized proteins as a marker of oxidative stress during coronary heart surgery. *Free radical biology & medicine* 27, 1080-1086.

Park, S.J., Jin, M.L., An, H.K., Kim, K.S., Ko, M.J., Kim, C.M., Choi, Y.W., and Lee, Y.C. (2015). Emodin induces neurite outgrowth through PI3K/Akt/GSK-3beta-mediated signaling pathways in Neuro2a cells. *Neuroscience letters* 588, 101-107.

Pavitt, G.D. (2005). eIF2B, a mediator of general and gene-specific translational control. *Biochemical Society transactions* 33, 1487-1492.

Pearce, L.R., Huang, X., Boudeau, J., Pawlowski, R., Wullschleger, S., Deak, M., Ibrahim, A.F., Gourlay, R., Magnuson, M.A., and Alessi, D.R. (2007). Identification of Protor as a novel Rictor-binding component of mTOR complex-2. *The Biochemical journal* 405, 513-522.

Perdiguero, E., Ruiz-Bonilla, V., Gresh, L., Hui, L., Ballestar, E., Sousa-Victor, P., Baeza-Raja, B., Jardí, M., Bosch-Comas, A., Esteller, M., *et al.* (2007). Genetic analysis of p38 MAP kinases in myogenesis: fundamental role of p38alpha in abrogating myoblast proliferation. *The EMBO journal* 26, 1245-1256.

Peterson, T.R., Laplante, M., Thoreen, C.C., Sancak, Y., Kang, S.A., Kuehl, W.M., Gray, N.S., and Sabatini, D.M. (2009). DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell* 137, 873-886.

Potthoff, M.J., and Olson, E.N. (2007). MEF2: a central regulator of diverse developmental programs. *Development* 134, 4131-4140.

Pownall, M.E., Gustafsson, M.K., and Emerson, C.P., Jr. (2002). Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos. *Annual review of cell and developmental biology* 18, 747-783.

Prakasam, A., Ghose, S., Oleinik, N.V., Bethard, J.R., Peterson, Y.K., Krupenko, N.I., and Krupenko, S.A. (2014). JNK1/2 regulate Bid by direct phosphorylation at Thr59 in response to ALDH1L1. *Cell death & disease* 5, e1358.

Puck, T.T., Cieciura, S.J., and Robinson, A. (1958). Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *The Journal of experimental medicine* 108, 945-956.

Qiao, J., Paul, P., Lee, S., Qiao, L., Josifi, E., Tiao, J.R., and Chung, D.H. (2012). PI3K/AKT and ERK regulate retinoic acid-induced neuroblastoma cellular differentiation. *Biochemical and biophysical research communications* 424, 421-426.

Rabelo, T.K., Zeidan-Chulia, F., Caregnato, F.F., Schnorr, C.E., Gasparotto, J., Serafini, M.R., de Souza Araujo, A.A., Quintans-Junior, L.J., Moreira, J.C., and Gelain, D.P. (2015). In Vitro Neuroprotective Effect of Shikimic Acid Against Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress. *Journal of molecular neuroscience : MN* 56, 956-965.

Radi, E., Formichi, P., Battisti, C., and Federico, A. (2014). Apoptosis and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 42 Suppl 3, S125-152.

- Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., and Dhama, K. (2014). Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *BioMed research international* 2014, 761264.
- Rashid, A.J., Cole, C.J., and Josselyn, S.A. (2014). Emerging roles for MEF2 transcription factors in memory. *Genes, brain, and behavior* 13, 118-125.
- Read, D.E., and Gorman, A.M. (2009). Involvement of Akt in neurite outgrowth. *Cell Mol Life Sci* 66, 2975-2984.
- Reed, T.T. (2011). Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. *Free radical biology & medicine* 51, 1302-1319.
- Reinheckel, T., Sitte, N., Ullrich, O., Kuckelkorn, U., Davies, K.J., and Grune, T. (1998). Comparative resistance of the 20S and 26S proteasome to oxidative stress. *The Biochemical journal* 335 (Pt 3), 637-642.
- Reynolds, B.A., and Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255, 1707-1710.
- Richler, C., and Yaffe, D. (1970). The in vitro cultivation and differentiation capacities of myogenic cell lines. *Developmental biology* 23, 1-22.
- Richter, J.D., and Sonenberg, N. (2005). Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature* 433, 477-480.
- Rommel, C., Bodine, S.C., Clarke, B.A., Rossman, R., Nunez, L., Stitt, T.N., Yancopoulos, G.D., and Glass, D.J. (2001). Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nature cell biology* 3, 1009-1013.
- Sambrook, J.F., E.F.; Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sancak, Y., Peterson, T.R., Shaul, Y.D., Lindquist, R.A., Thoreen, C.C., Bar-Peled, L., and Sabatini, D.M. (2008). The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* 320, 1496-1501.
- Sanchez, A.M.J., Candau, R.B., and Bernardi, H. (2014). FoxO transcription factors: their roles in the maintenance of skeletal muscle homeostasis. *Cell Mol Life Sci* 71, 1657-1671.

Sandri, M. (2013). Protein breakdown in muscle wasting: role of autophagy-lysosome and ubiquitin-proteasome. *The international journal of biochemistry & cell biology* 45, 2121-2129.

Sarker, K.P., and Lee, K.Y. (2004). L6 myoblast differentiation is modulated by Cdk5 via the PI3K-AKT-p70S6K signaling pathway. *Oncogene* 23, 6064-6070.

Sayre, L.M., Lin, D., Yuan, Q., Zhu, X., and Tang, X. (2006). Protein adducts generated from products of lipid oxidation: focus on HNE and one. *Drug metabolism reviews* 38, 651-675.

Schakman, O., Kalista, S., Barbe, C., Loumaye, A., and Thissen, J.P. (2013). Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy. *The international journal of biochemistry & cell biology* 45, 2163-2172.

Schiwy, N., Brazda, N., and Muller, H.W. (2009). Enhanced regenerative axon growth of multiple fibre populations in traumatic spinal cord injury following scar-suppressing treatment. *The European journal of neuroscience* 30, 1544-1553.

Sedelnikova, O.A., Redon, C.E., Dickey, J.S., Nakamura, A.J., Georgakilas, A.G., and Bonner, W.M. (2010). Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis. *Mutation research* 704, 152-159.

Seguin, R., and Nelson, M.E. (2003). The benefits of strength training for older adults. *American journal of preventive medicine* 25, 141-149.

Shamoto-Nagai, M., Maruyama, W., Hashizume, Y., Yoshida, M., Osawa, T., Riederer, P., and Naoi, M. (2007). In parkinsonian substantia nigra, alpha-synuclein is modified by acrolein, a lipid-peroxidation product, and accumulates in the dopamine neurons with inhibition of proteasome activity. *Journal of neural transmission* 114, 1559-1567.

Shi, X., and Garry, D.J. (2006). Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes & development* 20, 1692-1708.

Shiizaki, S., Naguro, I., and Ichijo, H. (2013). Activation mechanisms of ASK1 in response to various stresses and its significance in intracellular signaling. *Advances in biological regulation* 53, 135-144.

Shimizu, N., Yoshikawa, N., Ito, N., Maruyama, T., Suzuki, Y., Takeda, S., Nakae, J., Tagata, Y., Nishitani, S., Takehana, K., *et al.* (2011). Crosstalk between glucocorticoid receptor and nutritional sensor mTOR in skeletal muscle. *Cell metabolism* 13, 170-182.

Singh, K., and Dilworth, F.J. (2013). Differential modulation of cell cycle progression distinguishes members of the myogenic regulatory factor family of transcription factors. *The FEBS journal* *280*, 3991-4003.

Skalhegg, B.S., and Tasken, K. (1997). Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* *2*, d331-342.

Skrypina, N.A., Timofeeva, A.V., Khaspekov, G.L., Savochkina, L.P., and Beabealashvili, R. (2003). Total RNA suitable for molecular biology analysis. *Journal of biotechnology* *105*, 1-9.

Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* *150*, 76-85.

Sonenberg, N., and Hinnebusch, A.G. (2009). Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* *136*, 731-745.

Sorolla, M.A., Reverter-Branchat, G., Tamarit, J., Ferrer, I., Ros, J., and Cabiscol, E. (2008). Proteomic and oxidative stress analysis in human brain samples of Huntington disease. *Free radical biology & medicine* *45*, 667-678.

Spangenburg, E.E. (2009). Changes in muscle mass with mechanical load: possible cellular mechanisms. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme* *34*, 328-335.

Srikanthan, P., and Karlamangla, A.S. (2011). Relative muscle mass is inversely associated with insulin resistance and prediabetes. Findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* *96*, 2898-2903.

Stadtman, E.R., and Levine, R.L. (2003). Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino acids* *25*, 207-218.

Subbarao, K.V., Richardson, J.S., and Ang, L.C. (1990). Autopsy samples of Alzheimer's cortex show increased peroxidation in vitro. *Journal of neurochemistry* *55*, 342-345.

Subczynski, W.K., and Hyde, J.S. (1983). Concentration of oxygen in lipid bilayers using a spin-label method. *Biophysical journal* *41*, 283-286.

Subramaniam, R., Roediger, F., Jordan, B., Mattson, M.P., Keller, J.N., Waeg, G., and Butterfield, D.A. (1997). The lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-trans-nonenal, alters the conformation of cortical synaptosomal membrane proteins. *Journal of neurochemistry* *69*, 1161-1169.

- Tanaka, K., Kanazawa, I., and Sugimoto, T. (2015). Reduction in Endogenous Insulin Secretion is a Risk Factor of Sarcopenia in Men with Type 2 Diabetes Mellitus. *Calcified tissue international* 97, 385-390.
- Tang, X., Wang, X., Gong, X., Tong, M., Park, D., Xia, Z., and Mao, Z. (2005). Cyclin-dependent kinase 5 mediates neurotoxin-induced degradation of the transcription factor myocyte enhancer factor 2. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25, 4823-4834.
- Thanan, R., Oikawa, S., Hiraku, Y., Ohnishi, S., Ma, N., Pinlaor, S., Yongvanit, P., Kawanishi, S., and Murata, M. (2015). Oxidative stress and its significant roles in neurodegenerative diseases and cancer. *International journal of molecular sciences* 16, 193-217.
- Tintignac, L.A., Lagirand, J., Batonnet, S., Sirri, V., Leibovitch, M.P., and Leibovitch, S.A. (2005). Degradation of MyoD mediated by the SCF (MAFbx) ubiquitin ligase. *The Journal of biological chemistry* 280, 2847-2856.
- Tobiume, K., Saitoh, M., and Ichijo, H. (2002). Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 by the stress-induced activating phosphorylation of pre-formed oligomer. *Journal of cellular physiology* 191, 95-104.
- Tortorella, L.L., Milasincic, D.J., and Pilch, P.F. (2001). Critical proliferation-independent window for basic fibroblast growth factor repression of myogenesis via the p42/p44 MAPK signaling pathway. *The Journal of biological chemistry* 276, 13709-13717.
- Tounekti, O., Belehradec, J., Jr., and Mir, L.M. (1995). Relationships between DNA fragmentation, chromatin condensation, and changes in flow cytometry profiles detected during apoptosis. *Experimental cell research* 217, 506-516.
- Truant, R., Atwal, R., and Burtnik, A. (2006). Hypothesis: Huntingtin may function in membrane association and vesicular trafficking. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 84, 912-917.
- Tumaneng, K., Schlegelmilch, K., Russell, R.C., Yimlamai, D., Basnet, H., Mahadevan, N., Fitamant, J., Bardeesy, N., Camargo, F.D., and Guan, K.L. (2012). YAP mediates crosstalk between the Hippo and PI(3)K-TOR pathways by suppressing PTEN via miR-29. *Nature cell biology* 14, 1322-1329.
- Tunez, I., Sanchez-Lopez, F., Aguera, E., Fernandez-Bolanos, R., Sanchez, F.M., and Tasset-Cuevas, I. (2011). Important role of oxidative stress biomarkers in Huntington's disease. *Journal of medicinal chemistry* 54, 5602-5606.

Tureckova, J., Wilson, E.M., Cappalunga, J.L., and Rotwein, P. (2001). Insulin-like growth factor-mediated muscle differentiation: collaboration between phosphatidylinositol 3-kinase-Akt-signaling pathways and myogenin. *The Journal of biological chemistry* 276, 39264-39270.

Vaidya, T.B., Rhodes, S.J., Taparowsky, E.J., and Konieczny, S.F. (1989). Fibroblast growth factor and transforming growth factor beta repress transcription of the myogenic regulatory gene MyoD1. *Molecular and cellular biology* 9, 3576-3579.

Valavanidis, A., Vlachogianni, T., and Fiotakis, C. (2009). 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *Journal of environmental science and health Part C, Environmental carcinogenesis & ecotoxicology reviews* 27, 120-139.

van der Velden, J.L., Langen, R.C., Kelders, M.C., Wouters, E.F., Janssen-Heininger, Y.M., and Schols, A.M. (2006). Inhibition of glycogen synthase kinase-3beta activity is sufficient to stimulate myogenic differentiation. *American journal of physiology Cell physiology* 290, C453-462.

van der Velden, J.L., Schols, A.M., Willems, J., Kelders, M.C., and Langen, R.C. (2008). Glycogen synthase kinase 3 suppresses myogenic differentiation through negative regulation of NFATc3. *The Journal of biological chemistry* 283, 358-366.

Vander Haar, E., Lee, S.I., Bandhakavi, S., Griffin, T.J., and Kim, D.H. (2007). Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nature cell biology* 9, 316-323.

Volpicelli, F., Perrone-Capano, C., Da Pozzo, P., Colucci-D'Amato, L., and di Porzio, U. (2004). Modulation of nurr1 gene expression in mesencephalic dopaminergic neurones. *Journal of neurochemistry* 88, 1283-1294.

Vyas, D.R., Spangenburg, E.E., Abraha, T.W., Childs, T.E., and Booth, F.W. (2002). GSK-3beta negatively regulates skeletal myotube hypertrophy. *American journal of physiology Cell physiology* 283, C545-551.

Waddell, D.S., Baehr, L.M., van den Brandt, J., Johnsen, S.A., Reichardt, H.M., Furlow, J.D., and Bodine, S.C. (2008). The glucocorticoid receptor and FOXO1 synergistically activate the skeletal muscle atrophy-associated MuRF1 gene. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 295, E785-797.

Wang, X., Li, W., Williams, M., Terada, N., Alessi, D.R., and Proud, C.G. (2001). Regulation of elongation factor 2 kinase by p90(RSK1) and p70 S6 kinase. *The EMBO journal* 20, 4370-4379.

- Wang, X., She, H., and Mao, Z. (2009). Phosphorylation of neuronal survival factor MEF2D by glycogen synthase kinase 3beta in neuronal apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 284, 32619-32626.
- Wang, X., Tang, X., Li, M., Marshall, J., and Mao, Z. (2005). Regulation of neuroprotective activity of myocyte-enhancer factor 2 by cAMP-protein kinase A signaling pathway in neuronal survival. *The Journal of biological chemistry* 280, 16705-16713.
- Wang, X., Wang, Z., Yao, Y., Li, J., Zhang, X., Li, C., Cheng, Y., Ding, G., Liu, L., and Ding, Z. (2011a). Essential role of ERK activation in neurite outgrowth induced by alpha-lipoic acid. *Biochimica et biophysica acta* 1813, 827-838.
- Wang, Z., Wang, J., Li, J., Wang, X., Yao, Y., Zhang, X., Li, C., Cheng, Y., Ding, G., Liu, L., *et al.* (2011b). MEK/ERKs signaling is essential for lithium-induced neurite outgrowth in N2a cells. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 29, 415-422.
- Weigl, L.G. (2012). Lost in translation: regulation of skeletal muscle protein synthesis. *Curr Opin Pharmacol* 12, 377-382.
- White, R.B., and Thomas, M.G. (2012). Moving beyond tyrosine hydroxylase to define dopaminergic neurons for use in cell replacement therapies for Parkinson's disease. *CNS & neurological disorders drug targets* 11, 340-349.
- Wing, S.S. (2013). Deubiquitinases in skeletal muscle atrophy. *The international journal of biochemistry & cell biology* 45, 2130-2135.
- Winter, B., and Arnold, H.H. (2000). Activated raf kinase inhibits muscle cell differentiation through a MEF2-dependent mechanism. *Journal of cell science* 113 Pt 23, 4211-4220.
- Winter, B., Braun, T., and Arnold, H.H. (1993). cAMP-dependent protein kinase represses myogenic differentiation and the activity of the muscle-specific helix-loop-helix transcription factors Myf-5 and MyoD. *The Journal of biological chemistry* 268, 9869-9878.
- Winter, J.N., Jefferson, L.S., and Kimball, S.R. (2011). ERK and Akt signaling pathways function through parallel mechanisms to promote mTORC1 signaling. *American journal of physiology Cell physiology* 300, C1172-1180.
- Withers, D.J., Ouwens, D.M., Nave, B.T., van der Zon, G.C., Alarcon, C.M., Cardenas, M.E., Heitman, J., Maassen, J.A., and Shepherd, P.R. (1997). Expression, enzyme activity, and subcellular localization of mammalian target of rapamycin in insulin-

responsive cells. *Biochemical and biophysical research communications* 241, 704-709.

Wong, M.L., and Medrano, J.F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques* 39, 75-85.

Wu, P.Y., Lin, Y.C., Chang, C.L., Lu, H.T., Chin, C.H., Hsu, T.T., Chu, D., and Sun, S.H. (2009). Functional decreases in P2X7 receptors are associated with retinoic acid-induced neuronal differentiation of Neuro-2a neuroblastoma cells. *Cellular signalling* 21, 881-891.

Xu, J., Ji, J., and Yan, X.H. (2012). Cross-talk between AMPK and mTOR in regulating energy balance. *Critical reviews in food science and nutrition* 52, 373-381.

Yamamoto, K., Ichijo, H., and Korsmeyer, S.J. (1999). BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Molecular and cellular biology* 19, 8469-8478.

Yanaka, N., Nogusa, Y., Fujioka, Y., Yamashita, Y., and Kato, N. (2007). Involvement of membrane protein GDE2 in retinoic acid-induced neurite formation in Neuro2A cells. *FEBS Lett* 581, 712-718.

Yang, Q., She, H., Gearing, M., Colla, E., Lee, M., Shacka, J.J., and Mao, Z. (2009). Regulation of neuronal survival factor MEF2D by chaperone-mediated autophagy. *Science* 323, 124-127.

Young, S.H., Ye, J., Frazer, D.G., Shi, X., and Castranova, V. (2001). Molecular mechanism of tumor necrosis factor- α production in 1 \rightarrow 3-beta-glucan (zymosan)-activated macrophages. *The Journal of biological chemistry* 276, 20781-20787.

Zafra, D., Nocito, L., Dominguez, J., and Guinovart, J.J. (2013). Sodium tungstate activates glycogen synthesis through a non-canonical mechanism involving G-proteins. *FEBS Lett* 587, 291-296.

Zetser, A., Gredinger, E., and Bengal, E. (1999). p38 mitogen-activated protein kinase pathway promotes skeletal muscle differentiation. Participation of the Mef2c transcription factor. *The Journal of biological chemistry* 274, 5193-5200.

Zhang, X., Tang, N., Hadden, T.J., and Rishi, A.K. (2011). Akt, FoxO and regulation of apoptosis. *Biochimica et biophysica acta* 1813, 1978-1986.

Zhao, B., Tumaneng, K., and Guan, K.L. (2011). The Hippo pathway in organ size control, tissue regeneration and stem cell self-renewal. *Nature cell biology* 13, 877-883.

Zhao, J., Brault, J.J., Schild, A., Cao, P., Sandri, M., Schiaffino, S., Lecker, S.H., and Goldberg, A.L. (2007). FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell metabolism* 6, 472-483.

Zhao, J., Brault, J.J., Schild, A., and Goldberg, A.L. (2008). Coordinate activation of autophagy and the proteasome pathway by FoxO transcription factor. *Autophagy* 4, 378-380.

Zheng, B., Ohkawa, S., Li, H., Roberts-Wilson, T.K., and Price, S.R. (2010). FOXO3a mediates signaling crosstalk that coordinates ubiquitin and atrogen-1/MAFbx expression during glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24, 2660-2669.

Zhu, B., Ramachandran, B., and Gulick, T. (2005). Alternative pre-mRNA splicing governs expression of a conserved acidic transactivation domain in myocyte enhancer factor 2 factors of striated muscle and brain. *The Journal of biological chemistry* 280, 28749-28760.

Zhu, S., Goldschmidt-Clermont, P.J., and Dong, C. (2004). Transforming growth factor-beta-induced inhibition of myogenesis is mediated through Smad pathway and is modulated by microtubule dynamic stability. *Circulation research* 94, 617-625.

Zhuang, S., Lynch, M.C., and Kochevar, I.E. (1999). Caspase-8 mediates caspase-3 activation and cytochrome c release during singlet oxygen-induced apoptosis of HL-60 cells. *Experimental cell research* 250, 203-212.