



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Mecanismos neuroprotectores de la eritropoyetina (NeuroEPO) en enfermedades neurodegenerativas

Fernando Garzón Gómez

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

MECANISMOS NEUROPROTECTORES DE LA
ERITROPOYETINA (NeuroEPO) EN
ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

FERNANDO GARZÓN GÓMEZ

TESIS DOCTORAL

2018



**Mecanismos neuroprotectores de la eritropoyetina
(NeuroEPO) en enfermedades neurodegenerativas**

Fernando Garzón Gómez

Tesis doctoral

2018

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE BIOLOGIA
DEPARTAMENT DE BIOLOGIA CEL·LULAR, FISIOLOGIA I IMMUNOLOGIA

**Mecanismos neuroprotectores de la eritropoyetina
(NeuroEPO) en enfermedades neurodegenerativas**

Fernando Garzón Gómez

Barcelona, 10 de septiembre de 2018

PROGRAMA DE DOCTORADO DE BIOMEDICINA
UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE BIOLOGIA
DEPARTAMENT DE BIOLOGIA CEL·LULAR, FISIOLOGIA I IMMUNOLOGIA

Mecanismos neuroprotectores de la eritropoyetina (NeuroEPO) en enfermedades neurodegenerativas

Memoria presentada por Fernando Garzón Gómez, Médico Veterinario, para optar al grado de Doctor por la Universidad de Barcelona.

Directores

Dr. Ramón Rama Bretón

Dra. Norma Alva Bocanegra

Tutor

Dra. Teresa Carbonell

El candidato a Doctor,

Fernando Garzón Gómez

DEDICATORIA

*A ti, mi amado hijo DANIEL ALEJANDRO
Razón de ser y de vivir. Quien ha tenido que sufrir mi
abandono temporal para cursar este Postgrado; y quien,
con su alegría y risa de niño, todo lo transforma en luz.
Gracias por tu amor incondicional.*

*A ti, mi amada esposa LUISA
Fuente de inspiración en todo lo que emprendo,
compañera de vida y del camino. Amor de mi vida,
apoyo y aliento para continuar. Gracias por estar
siempre allí, donde has sido fundamental.*

*A mis padres ERNESTO † y CARMEN ROSA †
Por quien soy hoy en día. Por sus cuidados y desvelos,
por la confianza depositada en mí y que hoy da frutos
buenos. Gracias por ser ese par de angelitos que me
cuidan y me impulsan muy lejos.*

AGRADECIMIENTOS

A todos quienes han hecho posible este logro en mi vida, a quienes han puesto ese granito de arena para hacer realidad este sueño de infancia y creyeron en mí. Especialmente a:

A mis padres que me apoyaron todo el tiempo antes, ahora y siempre.

A mis hermanos que amo y abrazo cada que me es posible.

A mis maestros en la Universidad Nacional de Colombia, por tantas enseñanzas y momentos inolvidables.

A mis amigos entrañables que han marcado mi existir, especialmente Bolívar Lagos de la Universidad de Nariño y al Grupo Coyaima de la Universidad Nacional de Colombia (José, Carlos, Rubén, Ember, Sacha, Sonia, Claudia, Néstor, Mónica, Andrea, Alfredo y Dámaris).

A mis directores, tutores y asesores de tesis doctoral por sus enseñanzas, orientación y dedicación en esta investigación: Dr. Ramón Rama, Dra. Teresa Carbonell, Dra. Norma Alva, Débora Coimbra.

A mis compañeros de laboratorio quienes me han guiado y orientado en el día a día de este proceso investigativo.

Al Dr. Eduardo Soriano y al Dr. Antoni Parcerisas, quienes con su amable y atenta colaboración marcaron mi aprendizaje y el feliz término de la investigación.

A la Universidad de Barcelona, Institución que se ha convertido en mi segunda *Alma mater*.

A la Fundación Carolina, por la confianza depositada al otorgarme la beca para este doctorado.

A la Universidad de Nariño, por haberme otorgado la Comisión de Estudios y con ello facilitar la realización.

“Las neuronas son células de formas delicadas y elegantes, las misteriosas mariposas del alma, cuyo batir de alas quién sabe si esclarecerá algún día el secreto de la vida mental.”

Santiago Ramón y Cajal

Resumen

La eritropoyetina (EPO) es una glucoproteína inicialmente identificada como una hormona sintetizada y secretada por el riñón que regula la eritropoyesis. Muchos estudios experimentales muestran que la EPO tiene una acción neuroprotectora en el cerebro. En trastornos neurológicos agudos y crónicos, particularmente en apoplejía, lesión cerebral traumática, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica y en accidente cerebro vascular, tiene efectos neuroprotectores. El objetivo de este estudio, utilizando un modelo in vitro, fue determinar cómo NeuroEPO, una variante de EPO con un bajo contenido de ácido siálico, protege a las neuronas de la acción excitotóxica del glutamato. Se utilizaron cultivos neuronales primarios que se obtuvieron de la corteza cerebral de embriones de rata Wistar después de 17 días de gestación. La excitotoxicidad se indujo después de nueve días de cultivo in vitro mediante tratamiento con un medio que contenía glutamato 100 μ M durante 15 minutos, para luego ser tratado con 100 ng / ml de NeuroEPO. Después de 24 h, el tratamiento mostró una disminución significativa ($p < 0,01$) en la mortalidad, en comparación con las células tratadas con glutamato solo. El tratamiento NeuroEPO disminuyó la mortalidad y las células tendieron a reproducir las características morfológicas del control. Las imágenes obtenidas mediante microscopía de contraste de fases muestran que las neuronas tratadas con glutamato muestran una contracción corporal, pérdida de dendritas que no hacen contacto con las células vecinas y que NeuroEPO es capaz de preservar las características morfológicas del control. El estrés oxidativo inducido por el glutamato se reduce después del tratamiento con NeuroEPO. Las pruebas por inmunocitoquímica muestran que el cultivo es esencialmente puro en las neuronas, que el glutamato causa mortalidad celular, y que esto se evita parcialmente cuando en el medio de cultivo se añade NeuroEPO. Se analizó también la activación de las vías apoptóticas intrínsecas. La disminución en la relación Bcl-2 / Bax, fue determinante en la liberación de citocromo c desde la mitocondria hacia el citosol y en la expresión y la actividad de caspasa-3 observada en las células tratadas solo con glutamato. Estas alteraciones fueron evitadas en las células bajo tratamiento con NeuroEPO posterior al glutamato. Estos resultados permiten aseverar que NeuroEPO ejerce su función neuroprotectora actuando directamente sobre las neuronas una vez que se ha inducido la excitotoxicidad del glutamato, puede atenuar sustancialmente los cambios morfológicos causados por la excitotoxicidad inducida por glutamato en las neuronas, reduciendo el efecto neurotóxico que éste ejerce sobre la viabilidad neuronal, protege a las neuronas del estrés oxidativo y de la apoptosis inducidos por el glutamato mediante el manteniendo el equilibrio entre proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2) y pro-apoptóticas (Bax), evitando la liberación al citosol del citocromo c y reduciendo la actividad de la caspasa-3. Los bajos niveles de ácido siálico de la NeuroEPO comparados con la rhEPO al parecer no afectan a la actividad neuroprotectora de la NeuroEPO.

Summary

Erythropoietin (EPO) is a glycoprotein initially identified as a hormone synthesized and secreted by the kidney that regulates erythropoiesis. Many experimental studies show that EPO has a neuroprotective action in the brain. In acute and chronic neurological disorders, particularly in stroke, traumatic brain injury, Alzheimer's disease, Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis, it has neuroprotective effects. The objective of this study, using an *in vitro* model, was to determine how NeuroEPO, a variant of EPO with a low content of sialic acid, protects neurons from the toxic action of glutamate. Primary neuronal cultures that were obtained from the cerebral cortex of Wistar rat embryos after 17 days of gestation were used. The excitotoxicity was induced after nine days of *in vitro* culture by treatment with a medium containing 100 μ M glutamate for 15 minutes. After 24 h, treatment with 100 ng of NeuroEPO / ml showed a significant decrease ($p < 0.01$) in mortality, compared to cells treated with glutamate alone. The NeuroEPO treatment decreased mortality and tended to reproduce the morphological characteristics of the control. The oxidative stress induced by glutamate is reduced after treatment with NeuroEPO. The images obtained by phase contrast microscopy show that neurons treated with glutamate show a body contraction, loss of dendrites that do not make contact with neighboring cells, and NeuroEPO is capable of preserving the morphological characteristics of the control. Immunocytochemistry tests show that the culture is essentially pure in neurons, that glutamate causes cell mortality, and that this is partially avoided when NeuroEPO is added to the culture medium. The activation of the intrinsic apoptotic pathways was also analyzed. The decrease in the Bcl-2 / Bax ratio was decisive in the release of cytochrome from the mitochondria to the cytosol and in the expression and activity of caspase-3 observed in the cells treated with glutamate. These alterations were avoided in the cells under treatment with NeuroEPO. These results confirm that NeuroEPO has a protective effect against the neuronal damage induced by excitotoxicity, improving the antioxidant activity in the neuron and protecting it from oxidative stress; In addition, they show that NeuroEPO protects cortical neurons from glutamate-induced apoptosis by up-regulating Bcl-2 and inhibits the activation of caspase-3 induced by excitotoxicity due to glutamate.

Índice

	Pág.
1. Introducción	8
1.1. Neurodegeneración	9
1.1.1. Enfermedad de Alzheimer	9
1.1.2. Enfermedad de Parkinson	11
1.1.3. Esclerosis lateral amiotrófica (ELA)	12
1.1.4. Ictus – Accidente cerebro-vascular	14
1.2. Excitotoxicidad	16
1.2.1. Glutamato	16
1.2.2. Glutamato y sus receptores	17
1.2.3. Calcio y excitotoxicidad	19
1.3. Estrés oxidativo	27
1.3.1. Radicales libres	28
1.3.2. Actividad antioxidante	30
1.4. Disfunción mitocondrial	34
1.5. Apoptosis	36
1.6. Neuroprotección y neuroregeneración	37
1.6.1. Eritropoyetina	37
1.6.2. Derivados de EPO sin actividad eritroide	39
2. Objetivos	41
3. Materiales y Métodos	43
3.1 Cultivo celular cortical	44
3.2 Exposición a glutamato (Inducción de excitotoxicidad)	45
3.3 Efecto de la NeuroEPO	45
3.4 Cuantificación de proteínas	47
3.5 Determinación del estrés oxidativo	47
3.5.1 Determinación de Antioxidantes Totales	47
3.5.2 Determinación de Especies Reactivas de Oxígeno y de Nitrógeno	49

3.6 Método de Western Blot	50
3.7 Inmunocitoquímica	53
3.8 Actividad de Caspasas-3	56
3.9 Análisis estadístico	57
4. Resultados	58
4.1 Viabilidad / mortalidad neuronal tras exposición a glutamato y posterior tratamiento con NeuroEPO	59
4.1.1 Efecto de diferentes concentraciones de glutamato sobre la mortalidad celular	59
4.1.2 Efecto de NeuroEPO sobre la viabilidad celular	60
4.1.3. Efecto de NeuroEPO sobre la viabilidad neuronal cortical, tras la exposición a glutamato	61
4.2 Efectos protectores del Neuro-Epo contra la excitotoxicidad del glutamato: análisis citológico	62
4.2.1 Efecto de NeuroEPO sobre los cambios morfológicos inducidos por la excitotoxicidad del glutamato en el cultivo neuronal	62
4.2.2 Análisis inmunocitoquímico de las células expuestas a neurotoxicidad por glutamato y tratadas posteriormente con NeuroEPO	63
4.2.3. Tinción por inmuno-fluorescencia de neuronas y núcleos en células corticales expuestas al glutamato seguido del tratamiento con NeuroEPO	64
4.2.4 Apoptosis inducida por glutamato y efecto mitigado por NeuroEPO en cultivo primario de células corticales	66
4.3 Estrés oxidativo tras la exposición a glutamato y el posterior tratamiento con NeuroEPO	67
4.3.1. Efecto de NeuroEPO sobre el estrés oxidativo en células corticales primarias tratadas con glutamato	67

4.4 Efecto protector de NeuroEPO contra la excitotoxicidad del glutamato: análisis bioquímico	69
4.4.1 Expresión de proteínas antiapoptóticas (Bcl-2) y apoptóticas (Bax) inducidas por excitotoxicidad de glutamato en neuronas corticales de rata	69
4.4.1.1 Expresión de proteínas anti-apoptóticas Bcl-2	69
4.4.1.2 Expresión de proteínas pro-apoptóticas Bax	70
4.4.1.3 Relación Bcl-2 / Bax	71
4.4.2 Expresión de proteínas pro-apoptóticas (Citocromo-c y Caspasas-3) inducidas por excitotoxicidad de glutamato en neuronas corticales de rata	72
4.4.2.1 Liberación de citocromo c en el citoplasma de las neuronas corticales	74
4.4.2.2 El glutamato aumenta la expresión de Caspasas-3	73
4.4.2.3 El glutamato aumenta la actividad de Caspasas-3	74
5. Discusión	76
6. Conclusiones	87
7. Bibliografía	89
8. Anexos	103

Abreviaturas

Aβ	Péptido β -amiloide
ACV	Accidente cerebro-vascular
ADN	Ácido Desoxiribunocleico
AEM	Atrofia espinal muscular
AMPA	Ácido alfaamino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasol propionico/kainato
Apaf-1	Factor 1 activador de la proteasa apoptótica
Ara-C	Arabioside Citocine
ATP	Trifosfato de adenosina
Bcl-2	Proteínas de linfoma-2 de células B
BSA	Blood Serum Albumina
CAD	DNAsa activada por Caspasas
Ca²⁺	Ión Calcio
DA	Dopamina
DAPI	Tinción fluorescente dihidrocloruro de 4'6-diamidino-2-fenil-indol
DIV	Días in vitro
DFF	Factor de fragmentación del ADN
D.O.	Densidad óptica
EA	Enfermedad de Alzheimer
EAAT-2	Transportador de glutamato
EH	Enfermedad de Huntington
ELA	Esclerosis lateral amiotrófica,
EP	Enfermedad de Parkinson
EPO	Eritropoyetina

EPOR	Receptor Epo
ERK	Extracellular signal related kinase
FAD	Flavín adenín dinucleótido
GABA	Ácido gama amino butírico
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
htt	Proteína huntingtin
ICAD	Sustratos celulares inhibidores de CAD
JAK-2	Janus kinasa 2
KA	Ácido kaínico
KDa	Kilo-Daltons
LDH	Lactato-deshidrogenasa
MAGUK	Guanilato quinasas asociadas a la membrana´
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno
MAP-2	Microtubule Associated Protein 2
mGluR5	Receptor de glutamato metabotrópico 5
MPTP	Poros de transición de la permeabilidad mitocondrial
MSN	Neuronas espinosas medianas
MTT	3-(4,5dimetiltiazol-2-ilo) -2,5difeniltetrazol
NeuroEPO	Neuro-eritopoyetina
NHS	Normalhorseserum

nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal
NMDA	Glutamato N-metil-D-aspartato
NMDAR	Receptor NMDA de Glutamato
NO	Óxido nítrico
NOX	NADPH oxidasa
O₂:	Oxígeno molecular
O₂•-	Radical superóxido
OH•-	Radical hidroxilo
ONOO:-	Anión peroxinitrito
ONF	Ovillos neurofibrilares intracelulares
PARP	Poli (ADP-ribosa) polimerasa
PBS	Phosphate Buffered Saline
PI3K	Fosfoinositol 3'-quinasa
PKC	Proteína quinasa C dependiente del ADN
pNA	Cromoforo p-nitroanilina
PVDF	Membrana de Polyvinilidene fluoride
rhEPO	Eritropoyetina recombinante humana
RNS	Radicales libres derivados del óxido nítrico
ROS	Especies Reactivas de oxígeno
rtPA	Activador plasminógeno tisular recombinante
SDS	Dodecyl sulfato de sodio
SNC	Sistema nervioso central
SOD1	Superóxido dismutasa
STAT-5	Activador de transcripción 5
XO	Xantina oxidasa

1. Introducción

1.1. Neurodegeneración.

Las enfermedades neurodegenerativas son un grupo heterogéneo de enfermedades con distintos fenotipos clínicos, tales como la afectación de las motoneuronas en la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), del control motor en la enfermedad de Parkinson (EP), factores genéticos dominantes como en la enfermedad de Huntington (EH) y trastornos de la memoria como en la enfermedad de Alzheimer (EA). Actualmente las enfermedades neurodegenerativas suponen la mayor causa de muerte y de incapacidad a nivel mundial. Esta situación se ve agravada por el hecho de que desde ya hace varias décadas hay un aumento en la esperanza de vida prácticamente en todos los países. Para el año 2050 las previsiones son que haya más de 1.500 millones de personas con más de 65 años y el gasto sanitario por enfermedades neurodegenerativas como consecuencia del envejecimiento de la población y las consiguientes enfermedades neurodegenerativas, consumirá todo el producto nacional bruto de los países occidentales (Prince, 2013).

Estudios experimentales y clínicos confirman que las enfermedades neurodegenerativas agudas, especialmente el ictus y la lesión traumática cerebral, y las neurodegenerativas crónicas, principalmente Alzheimer, Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), aunque son originadas por causas diferentes, tienen a la excitotoxicidad como un mecanismo fisiopatológico común que desempeña un papel importante en los procesos neurodegenerativos que llevan a la muerte neuronal (Choi, 1988; Lipton & Rosenberg, 1994; Doble, 1999; Dong et al., 2015; Meldrum, & Garthwaite, 1990). La creciente evidencia indica que la acumulación de proteínas aberrantes o mal plegadas, la formación de protofibrillas, la disfunción del sistema ubiquitina-proteasoma, el insulto excitotóxico, el estrés oxidativo y nitrosativo, la lesión mitocondrial, la insuficiencia sináptica, la homeostasis metálica alterada y el fracaso del transporte axonal y dendrítico representan eventos unificadores en muchos trastornos neurodegenerativos progresivos (Bossy-Wetzel et al., 2004).

1.1.1. Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo del sistema nervioso central asociado a una pérdida progresiva de la memoria y patrones cognitivos. Las características moleculares de la enfermedad son las deposiciones extracelulares del péptido β -amiloide ($A\beta$) en forma de placas seniles, la aparición de ovillos neurofibrilares intracelulares (ONF), déficit

colinérgico, pérdida neuronal extensa y sináptica en corteza cerebral, hipocampo y otras áreas del cerebro, esenciales para las funciones cognitivas y de la memoria. La patogénesis de AD es iniciada por la sobreproducción y la deposición extracelular de A β y la deposición intracelular de ONF. Estas deposiciones sirven como factores iniciadores de múltiples vías neurotóxicas, que pueden incluir excitotoxicidad, estrés oxidativo, agotamiento de la energía, inflamación y apoptosis. La señalización glutamatérgica se ve comprometida por la modulación inducida por A β de los receptores de glutamato sinápticos en regiones cerebrales específicas, en paralelo a los déficits cognitivos tempranos. Todos estos eventos intracelulares convergen en las vías ubicuas de necrosis y apoptosis. Además, el estrés oxidativo y la peroxidación lipídica han sido implicados en la neurotoxicidad inducida por glutamato y A β . Hay una creciente evidencia de que las perturbaciones en los sistemas que emplean el aminoácido excitatorio L-glutamato pueden ser la base de los mecanismos patogénicos de la neurodegeneración crónica en la EA (Hynd, et al., 2004). En condiciones crónicas y patológicas en la EA, la pérdida de potencial de membrana mitocondrial y la liberación de proteínas apoptóticas como el citocromo c y el factor inductor de apoptosis contribuyen a la apoptosis neuronal. El estrés oxidativo es otro factor importante en la EA: utilizando cultivos neuronales del hipocampo, se descubrió que el A β estimula la formación excesiva de ROS a través de un mecanismo que requiere la activación de NMDAR. Por lo tanto, La degeneración causada por A β también se ha relacionado con la activación excesiva de los receptores NMDA, la desregulación de la actividad de NMDAR y el estrés oxidativo pueden tener papel deletéreo en EA (Dong et al., 2009).

Todavía no está claro cómo A β hace daño, pero se han propuesto varios mecanismos. Una vista sugiere que las protofibrillas A β activan la microglía, lo que incita a una respuesta inflamatoria y a la liberación de citoquinas neurotóxicas. Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID), incluido el ibuprofeno, parecen retrasar la aparición de AD20. Además, los AINE reducen la producción de A β 42. Una segunda posibilidad es que, las protofibrillas A β desencadenan una liberación excesiva de aminoácidos excitadores como el glutamato de las células gliales que pueden lesionar las neuronas cercanas por excitotoxicidad. La activación de los receptores de glutamato del N-metil-D-aspartato, el subtipo (NMDA) produce un aumento del Ca²⁺ intracelular, que activa la óxido nítrico sintasa neuronal y genera óxido nítrico (NO). Cuando se genera en exceso, NO se combina con anión superóxido (O₂⁻), formando el producto altamente reactivo y neurotóxico peroxinitrito (ONOO⁻), lo que conduce a un mayor estrés oxidativo y nitrosativo en parte a través de

la lesión mitocondrial. De hecho, los ensayos humanos en fase III positivos del bloqueador del canal del receptor NMDA no competitivo, memantina, llevaron a su aprobación reciente para el tratamiento de AD; En resumen, la disfunción mitocondrial y los déficits energéticos resultantes pueden contribuir a una disminución del aclaramiento de los agregados proteicos y la disfunción neuronal, afectando la actividad del canal iónico y la bomba, la neurotransmisión y el transporte axonal y dendrítico (Bossy-Wetzel et al., 2004).

1.1.2. Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurológico causado por la degeneración de las neuronas dopaminérgicas nigrales y la consecuente caída masiva de contenido de dopamina (DA) en el cuerpo estriado. Aunque las causas están pendientes de ser esclarecidas, un creciente conjunto de pruebas respalda un papel esencial para el estrés oxidativo en la iniciación y la progresión del proceso de lesión que libera radicales libres y daña las proteínas celulares, los lípidos y los elementos de ADN. (Dong et al., 2009).

Según se sabe, la neurotoxicidad mediada por glutamato es un efecto secundario de susceptibilidad dopaminérgica de las neuronas, defectos moleculares / bioenergéticos, así como la neurotransmisión alterada asociada con la muerte celular en el núcleo nigro-estriatal en enfermedad de Parkinson (EP). La vulnerabilidad intrínseca de las neuronas dopaminérgicas, está asociada con un deterioro mitocondrial, unas ineficientes defensas antioxidantes y la maquinaria proteolítica desestructurada, que representa el fondo perfecto para la activación de los fenómenos excitotóxicos mediados por Ca^{2+} y la progresión hacia la muerte nigro-estriatal. Se demostró que la inhibición del Complejo I de la cadena de transporte de electrones, desencadena la acumulación de glutamato en cultivos primarios de astrocitos. Asimismo, que la proteína α -sinucleína agregada, el principal sello patológico en EP, aumenta la frecuencia de corrientes sinápticas en miniatura mediadas por receptores de glutamato para aumentar la transmisión pre y postsináptica, lo que agrava la perturbación la homeostasis de Ca^{2+} intracelular en cultivos neuronales. A pesar de su papel fisiológico no es claramente entendido, se piensa que la α -sinucleína juega un papel crítico en el mantenimiento del conjunto de vesículas sinápticas y liberación de neurotransmisores. Además, en un modelo de ratón transgénico EP, se observó que la sobreexpresión de α -sinucleína induce un aumento en la expresión del receptor mGluR5 (receptor de glutamato metabotrópico 5) y la acción

excitotóxica en el cuerpo estriado, posiblemente como resultado de un aumento concomitante en la señalización “downstream”. La neuroinflamación junto con la activación de la microglia contribuyen a la liberación de glutamato y potencian las respuestas mediadas por el receptor de glutamato (en particular NMDAR), lo que conduce a la exacerbación de fenómenos excitotóxicos. Los niveles crecientes de glutamato pueden activar la microglia y mantener procesos inflamatorios. La evidencia sugiere claramente que la neuroinflamación y excitotoxicidad mediada por glutamato recíprocamente pueden sostenerse mutuamente y crear un círculo vicioso, que eventualmente empeora la degeneración nigroestriatal en la EP. En paralelo, la pérdida de terminales dopaminérgicas nigroestriatales y el agotamiento de la dopamina resultante contribuyen a la reorganización de la conectividad sináptica en el cuerpo estriado, que representa el desarrollo de la patología EP y sus características clínicas. Una creciente evidencia indica que, en particular para la neurotransmisión glutamatérgica, los cambios significativos ocurren durante la progresión de la enfermedad. Cambios en los niveles de transportadores de glutamato, así como en la composición de subunidades y patrón de fosforilación de NMDAR, se observaron en los ganglios basales de diferentes modelos animales de EP; estos cambios varían de acuerdo con el grado de denervación en el estriado y la pérdida de dopamina endógena en los cerebros de pacientes con EP. La pérdida de neuronas dopaminérgicas nigrales y agotamiento de la dopamina del estriado afecta el equilibrio entre neurotransmisores excitadores e inhibidores y plasticidad sináptica. Es probable que los cambios afecten el umbral para la inducción de glutamato y plasticidad sináptica dependiente de Ca^{2+} en el cuerpo estriado. Por ejemplo, una denervación nigroestriatal parcial, causando déficits motores leves en ratas, afecta a NMDA-dependiente LTP (Potenciación a largo plazo; un aumento duradero en la amplitud de los potenciales postsinápticos excitadores como resultado de la estimulación de alta frecuencia (tetánica) de las vías aferentes), pero no LTD (depresión a largo plazo) y altera la composición de NMDAR en la densidad postsináptica, lo que compromete la organización óptima de circuitos nigroestriatales y neurotransmisión (Ambrosi et al., 2014).

1.1.3. Esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

La ELA es una enfermedad neurodegenerativa de progresión rápida con pérdida de motoneuronas superiores e inferiores la cual es considerada la principal característica patológica y la causa de los signos clínicos que presentan los pacientes. Las formas esporádicas representan 90% de

los casos mientras que una pequeña proporción de las formas familiares (10%) contienen un factor de tipo genético, asociado a mutaciones en el cromosoma 21 en la región del gen que codifica para la superóxido dismutasa (SOD1) dependiente de Cu/Zn produciendo una disminución de la función antioxidante. El mecanismo patogénico preciso no está claro, pero están implicados en la disfunción de la neurona motora y la muerte agregación, transporte axonal defectuoso, disfunción mitocondrial y excitotoxicidad a través de la recaptación defectuosa de glutamato en las células gliales. La evidencia estructural reciente sugiere que algunas mutaciones de SOD1 de Cu / Zn dan como resultado la desestabilización de los dímeros normales de la enzima y la agregación sustrato, formando amiloide o poros dependiendo de las condiciones (Bossy-Wetzel et al., 2004). La etiología es desconocida, pero existen diferentes hipótesis para explicar el mecanismo de daño y estas incluyen: factores ambientales, fenómenos de autoinmunidad, estrés oxidativo, excitotoxicidad, infecciones virales, anormalidades en el citoesqueleto y pérdida del soporte para el tráfico intracelular, siendo de particular interés el estrés y la excitotoxicidad para las cuales existen múltiples evidencias. Los procesos de degeneración involucrados son disparados por estrés oxidativo cuando la progresión involucra indudablemente excitotoxicidad. Existen anormalidades producto del daño oxidativo en proteínas de la corteza y espina lumbar de muestras post mortem de pacientes con ELA. Las primeras evidencias de la excitotoxicidad en la ELA fueron propuestas formalmente por Plaitakis en estudios donde demuestra cambios en los niveles de glutamato en plasma, fluido cerebro espinal y en cerebros de pacientes post mortem con ELA. Más recientemente, los trabajos realizados por el grupo de Rothstein (1995) demuestran alteraciones en la recaptura del glutamato en preparaciones de tejido post mortem de corteza motora y de espina lumbar, debida a la pérdida selectiva de uno de los subtipos del transportador de glutamato, EAAT-2, el cual es expresado únicamente en células gliales. Entre las hipótesis de radicales libres (RL) y excitotoxicidad en la etiología de la ELA, hay evidencias que cuestionan si las alteraciones en el metabolismo del glutamato son causa o consecuencia de la enfermedad (Martínez L. et al., 2010). Un informe reciente sobre ALS esporádica (que representa la gran mayoría de los casos) reveló una modificación anormal del ARN en las subunidades GluR2 de los receptores de glutamato, produciendo una mayor entrada de Ca^{2+} en las neuronas. Este mecanismo puede contribuir a la muerte neuronal sugiriendo posibles objetivos terapéuticos que disminuyan la activación excesiva de receptores de glutamato permeables al Calcio (Bossy-Wetzel et al., 2004).

1.1.4. Ictus – Accidente cerebro-vascular (ACV).

El accidente cerebrovascular (ACV) o ataque cerebral, consiste en un déficit neurológico repentino atribuido a una interrupción de la irrigación sanguínea cerebral de manera localizada. Éste puede ser isquémico, causado el bloqueo de un vaso sanguíneo por trombosis o embolia, 80 % de los casos de ACV, y hemorrágico con menos frecuencia (<15%), causado por hemorragia debida a la ruptura de un vaso y la acumulación de sangre en el parénquima cerebral (Sacco RL. et al. 2013; Moskowitz et. al 2010). Los signos clínicos varían dependiendo de la magnitud y ubicación del infarto, pudiendo causar muerte súbita, debilidad repentina (paresia) de extremidades o el rostro, parálisis, dificultad para hablar o entender el habla, pérdida de la visión, dolor de cabeza o mareos (García J.C. 2011; Hankey, G. 2017). Clínicamente se caracteriza por un episodio agudo de disfunción que dura más de 24 h, o de cualquier duración si las imágenes (CT o MRI) o autopsia muestran infarto focal o hemorragia relevante para los síntomas, incluyendo hemorragia subaracnoidea (Moskowitz et. al 2010). El ACV Constituye la segunda causa más común de muerte en el mundo, después del infarto isquémico de miocardio y la tercera causa más común de discapacidad en adultos en todo el planeta (Hankey 2017). Según la Organización Mundial de la Salud, 15 millones de personas lo sufren cada año a nivel global. De estos, 5 millones mueren y otros 5 millones quedan permanentemente discapacitados. El ictus es la tercera causa de muerte en los países industrializados y la causa principal que lleva a incapacidad en adultos. (Bhalla et al. 2013; Moskowitz et al. 2010).

El ictus no solamente representa un enorme problema de salud pública sino también representa un serio problema económico para los sistemas de salud gubernamentales. A pesar de los importantes esfuerzos realizados para hacer frente a esta patología, hasta el momento ningún ensayo clínico realizado con diferentes potenciales fármacos ha pasado de la fase III. La única terapia aprobada hasta el momento por la US Food and Drug Administration es la aplicación intravenosa del activador plasminógeno tisular recombinante (rtPA), una serina proteinasa que ha demostrado ser eficaz en el tratamiento del ictus isquémico en ensayos clínicos. La trombolisis después de la administración de rtPA ocurre como resultado de que el plasminógeno se convierte en plasmina por rtPA. La plasmina luego participa en la degradación de la fibrina para restaurar el flujo sanguíneo en las zonas distales a la oclusión (García J.C. 2011). Desafortunadamente, pocos pacientes son tratados con rtPA, en parte debido a su corta ventana terapéutica de 4.5 horas (con respecto a los retrasos en el

reconocimiento de síntomas, transporte y triaje) después del inicio isquémico. Además, rtPA no es eficaz para todos los pacientes tratados (García J.C. 2011).

La fisiopatología de los ACV es compleja e involucra mecanismos de excitotoxicidad, vías inflamatorias, daño oxidativo, el plegamiento incorrecto de proteínas, desequilibrios iónicos y apoptosis (Woodruff et.al. 2011) que no obstante conducir a la pérdida de células neuronales, muchas de estas vías allanan finalmente el camino para la recuperación. Los estados deletéreos son inmediatamente contrarrestados por mecanismos de protección locales y sistémicos que trabajan para mitigar el daño tisular y restablecer la homeostasis (George & Steinberg. 2015). Tras un accidente cerebro vascular, se pueden observar plenamente dos a áreas marcadamente distintas entre sí, con diferencias claras desde el punto de vista estructural, funcional y de pronóstico: el “núcleo isquémico” o la zona que, por estar directamente irrigada por el vaso obstruido, no recibe ningún flujo sanguíneo durante el ictus y se puede definir como el área del cerebro que sufre un daño estructural irreversible.

La isquemia disminuye la entrega de oxígeno y glucosa al cerebro, lo que conduce a una producción reducida de trifosfato de adenosina (ATP) y, por tanto, a una falla de los receptores de membrana, canales iónicos y bombas iónicas dependientes de energía, ocurre el colapso del potencial trans-membrana ya que iones como sodio (Na^+), potasio (K^+) y calcio (Ca^{2+}) fluyen libremente por sus gradientes de concentración, lo que lleva a la despolarización anóxica y la liberación de neurotransmisores excitatorios adicionales (principalmente glutamato) (García J.C. 2011). La muerte selectiva de células neuronales ocurre después de una isquemia de solo 2 a 5 minutos. Luego de aproximadamente 5 a 10 minutos, se puede observar el llamado fenómeno de no retorno en algunas áreas del cerebro (Carden & Granger. 2000). Alrededor del núcleo isquémico, se encuentra una banda de tejido denominada “zona de penumbra”, en la cual el flujo sanguíneo se conserva parcialmente debido a la circulación colateral redundante. Si bien este tejido es algo isquémico, las neuronas aquí pueden salvarse de la muerte mediante re-perfusión o tratamientos neuroprotectores poco después del inicio de la isquemia. El cerebro mantiene umbrales independientes para la integridad funcional y la integridad estructural, manteniendo así un gradiente de células viabilidad después de insultos isquémicos. El umbral para la integridad funcional y el de la integridad estructural se rigen por dos factores clave: el flujo residual de sangre y la duración del flujo reducido (Heiss y Graf, 1994). Dado

que el umbral para la integridad funcional es más alto que el de la integridad estructural, las neuronas en la penumbra son eléctricamente silenciosas pero capaces de mantener la homeostasis iónica y la integridad estructural (Astrup et al., 1981; Ferrer y Planas, 2003; Heiss y Graf, 1994; Hossmann, 1994). Con respecto al daño resultante, hay un vínculo estrecho entre el grado y la duración de la hipoperfusión. La viabilidad en la penumbra es variable y dependiente del tiempo, y varios procesos conducen a la muerte celular y la expansión del núcleo del infarto a la penumbra. Tres de estos factores son: las despolarizaciones peri-infarto, la inflamación y la apoptosis. (García J.C. 2011).

1.2 Excitotoxicidad.

La excitotoxicidad ha sido definida como la muerte celular causada por la excesiva o prolongada activación de receptores de aminoácidos excitadores (Olney, 1969). Debido a que el glutamato es el principal neurotransmisor excitador en el sistema nervioso central de los mamíferos, la excitotoxicidad generalmente se refiere a la muerte neuronal inducida por la presencia de cantidades excesivas de glutamato en el espacio intercelular que puede causar la apertura de un excesivo número de receptores de glutamato (Choi, 1992).

1.2.1. Glutamato

En mamíferos, el glutamato está presente principalmente en el Sistema Nervioso Central (SNC) donde juega un papel como neurotransmisor en las sinapsis químicas y desempeña un papel prominente en la plasticidad sináptica, en el aprendizaje y memoria, y en otras funciones cognitivas. De hecho, casi todas las células del cerebro usan glutamato como neurotransmisor. Además, el glutamato puede servir como fuente de energía para el cerebro en ausencia de glucosa (Okubo, et al., 2010). La liberación estrechamente regulada del glutamato de una neurona, junto con su detección por los receptores de glutamato en la neurona adyacente, forma la base de la transmisión sináptica en muchas de las $\sim 10^{14}$ sinapsis en el cerebro humano. La especificidad de la señalización sináptica por el glutamato en el espacio y el tiempo es conferida por el posicionamiento preciso de las sinapsis y por la expresión específica por la neurona de un subconjunto de genes que codifican los receptores de glutamato. En el cerebro, el glutamato actúa en tres compartimentos diferentes; en la zona presináptica, en la zona postsináptica y dentro de las células gliales. Durante la actividad sináptica, el glutamato es liberado desde las terminales presinápticas al espacio extracelular, principalmente en la hendidura sináptica donde actúa a través de su unión con los receptores y de donde es captado por los

astrocitos y convertido en glutamina por la glutamina sintetasa. La glutamina es entonces almacenada en las células gliales en forma inactiva desde donde el glutamato es regenerado vía glutaminasa, un enzima mitocondrial, y liberado en vesículas desde donde es incorporado a la terminal pre-sináptica por el transportador de glutamato vesicular (Mehta et al., 2013). Casi al mismo tiempo que eran caracterizadas las propiedades excitadoras del glutamato (Curtis, Phillis, & Watkins, 1959) también era descrita la neurotoxicidad de la exposición sostenida del glutamato en neuronas de la retina (Lucas, R. & Newhouse, 1957). Posteriormente se descubrió que la neurotoxicidad del glutamato no se limitaba a las neuronas de la retina, también podría afectar a cualquier neurona que expresara receptores para glutamato (Olney 1969). La presencia de concentraciones excesivas de glutamato en el medio extracelular inicia un ciclo de retroalimentación positiva, con activación de receptores de glutamato en neuronas vecinas, que lleva a más entrada de Na^+ a las neuronas a través de canales de iones monovalentes, con la consiguiente disminución de los gradientes iónicos, despolarización de la membrana y liberación de más glutamato. Un aumento marcado y prolongado de glutamato en el cerebro mata a las neuronas (Choi 1988; Dong, Wang, Qin, 2009) La excitotoxicidad conduce a una serie de consecuencias nocivas, que incluyen deterioro de la homeostasis del Calcio celular, aumento de la generación de radicales libres y estrés oxidativo, aumento de la permeabilidad mitocondrial y activación de varios factores de transcripción y su expresión genética, que actúan sinérgicamente y causan la muerte neuronal.

1.2.2. Glutamato y sus receptores.

El glutamato lleva a cabo su función como neurotransmisor mediante la unión con su receptor, localizado en la membrana de la neurona. Conocemos dos clases de receptores para el glutamato: receptores ionotrópicos, donde el ligando y el canal iónico son parte del mismo complejo molecular y receptores metabotrópicos, en los que el ligando y el canal regulado por el glutamato forman parte de complejos moleculares distintos, donde la unión del glutamato al receptor activa proteínas G que regulan otros canales (Nakanishi, 1992). Existen tres clases receptores ionotrópicos definidos por su agonista específico conocidos como receptores ácido α - amino - 3 - hidroxí - 5 - metilo - 4 - isoxazolpropionico (AMPA), receptores de kainato y receptores N-metil-D-aspartato (NMDA). Al igual que otras moléculas, el efecto del glutamato sobre las funciones en las que participa no es dependiente de la naturaleza química del glutamato sino de cómo las células están

programadas para responder cuando son expuestas a glutamato (Yu, et al., 2008). Aunque prácticamente todos los receptores de glutamato participan en los procesos excitotóxicos, el NMDAR es el iniciador principal del daño excitotóxico (Waxman, & Lynch, 2005; Hardingham, et al., 2002; Zhou, et al., 2013). Sin embargo, al mismo tiempo que se conocía el efecto neurotóxico del glutamato mediado por la actividad de receptores NMDA, otros estudios mostraban que la supervivencia de varios tipos de neuronas depende de la actividad y de la función sináptica del receptor NMDA (Hetma, & Kharebava, 2006; Hardingham, 2006). Por lo tanto, la activación de receptores NMDA es importante para la supervivencia de las células, pero también puede llevar a la muerte neuronal.

En condiciones fisiológicas, la despolarización de la membrana en las terminales glutaminérgicas lleva a la apertura de canales que facilitan la entrada de Ca^{2+} en la terminal iniciándose los mecanismos que llevan a la liberación de glutamato en el espacio extracelular. El glutamato entonces actúa sobre los receptores post-sinápticos. Los receptores NMDA son inusuales canales iónicos controlados por ligando pues la activación no solo requiere la unión de dos agonistas, glicina y glutamato, sino que también requiere la liberación del bloqueo del canal por Mg^{2+} mediante la despolarización de la membrana. En un primer momento, la acción del glutamato sobre los receptores ionotrópicos, principalmente sobre el receptor AMPA, causa la apertura de canales que permiten, en función del gradiente iónico, la entrada de Na^+ que lleva a la despolarización de la membrana post-sináptica generando un potencial local. La coincidencia de la despolarización y la presencia de glutamato en el receptor NMDA lleva a la liberación del ion Mg^{2+} , que en condiciones de potencial de membrana de reposo bloquea el canal del receptor NMDA, y a la apertura del canal del receptor NMDA permitiendo, en función de su gradiente iónico, la entrada de Ca^{2+} en la neurona post-sináptica. Los receptores AMPA son normalmente expresados junto con los receptores NMDA pues la eficacia del glutamato para regular el canal del receptor NMDA pasa por desbloquear el canal del receptor bloqueado por el ion Mg^{2+} lo cual requiere de la despolarización local de la membrana, función que corresponde al receptor AMPA activado por glutamato. La activación de receptores NMDA y la consiguiente entrada de Ca^{2+} inicia la activación de vías de señalización intracelulares dependientes de Ca^{2+} al tiempo que modulan la expresión de receptores AMPA en la membrana post-sináptica, un mecanismo que causa cambios en la fuerza sináptica y consecuentemente regula las diferentes formas de plasticidad sináptica.

El receptor NMDA es un mediador esencial para muchas formas de plasticidad sináptica, así como de aspectos del desarrollo y transmisión sináptica (Bliss, 1993). En los últimos años, el papel de la estructura de los receptores de glutamato NMDA (NMDAR) en la excitotoxicidad ha causado un gran interés terapéutico. Los NMDAR son combinaciones heterotetrámeras complejas de tres subfamilias principales de subunidades: la subunidad NR1 ubicuamente expresada junto con una de las cuatro subunidades posibles NR2 (A-D) y, en algunos casos, dos subunidades NR3 (A y B) (Madden, 2002; Paoletti, & Neyton 2007). La subunidad NR1 contiene el sitio donde el glutamato se une al receptor, mientras que la subunidad NR2 contiene el sitio donde se une la glicina (Clements, Westbrook, 1991). La combinación de subunidades y el corte y empalme alternativo determinan las propiedades funcionales de los receptores. Las diferencias en las propiedades de los subtipos de receptores NMDA están determinadas en gran medida por el tipo de subunidad NR2 incorporada en el complejo heterómero NR1/NR2 (Lynch, & Guttman, 2001; Furukawa & Singh, 2005). NR2A y NR2B son las subunidades NR que predominan en los receptores NMDA en las neuronas del cerebro adulto. Se ha sugerido que la excitotoxicidad se desencadena por la activación selectiva de NMDAR que contienen la subunidad NR2B y se observó una correlación entre la expresión de NR2B, un aumento del Calcio citosólico y la excitotoxicidad en las neuronas corticales (Chen, et al., 2008; Zhou & Baudry, 2006). Receptores NMDA que contienen la subunidad NR2A han sido propuestos como implicados en favorecer la supervivencia celular mientras que los receptores NMDA que contienen la subunidad NR2B estarían implicados en la muerte neuronal (Furukawa H, et al., 2005; Zhou, Baudry, 2006).

1.2.3. Calcio y excitotoxicidad

En estudios pioneros sobre la excitotoxicidad, pronto esta fue asociada con alteraciones de la homeóstasis del Ca^{2+} en las neuronas, donde el NMDAR era determinante en la alteración por ser la principal puerta de entrada del Ca^{2+} extracelular (Choi, 1987; Tymianski, et al., 1993). Durante años se pensó que el grado de entrada de Ca^{2+} a través de NMDAR era el único responsable de estas diferencias en el resultado celular: los niveles moderados de actividad de NMDAR se consideraban beneficiosos para las neuronas, mientras que la activación excesiva de NMDAR, y la posterior sobrecarga de Ca^{2+} neuronal son perjudiciales. De acuerdo con este modelo, tanto la activación excesiva como la activación muy pequeña de receptores NMDA es potencialmente dañina

(Hardingham, & Bading, 2003). Más recientemente, resultados de nuevos estudios han llevado a una explicación alternativa según la cual es la localización de los receptores NMDA quien determina si el glutamato activa señales que causan supervivencia o muerte de la neurona (Hardingham, & Bading 2010). Además de su localización en las sinapsis, receptores NMDA son encontrados en lugares extra-sinápticos y peri-sinápticos. En neuronas inmaduras del hipocampo la presencia de receptores NMDA extra-sinápticos representan $\frac{3}{4}$ del total de los receptores NMDA y aunque la proporción de receptores NMDA localizados en las sinapsis aumenta durante el desarrollo, un número elevado de receptores NMDA extra-sinápticos permanece en el cerebro adulto. Solo alrededor de $\frac{1}{4}$ del total de receptores NMDA extra-sinápticos en adultos se clasifican como peri-sinápticos (es decir, dentro de las 100 nm de la PSD), el resto se localiza en dendritas o en partes no peri-sinápticas de la columna vertebral. De los NMDAR extra-sinápticos localizados en las dendritas, alrededor de $\frac{1}{3}$ son adyacentes a los procesos de tipo glía y alrededor de la mitad son adyacentes con los axones. Esta distribución de los receptores NMDA parece jugar un papel esencial en el efecto excitotóxico del glutamato (Hardingham, & Bading 2010). NMDAR localizados en las sinapsis activan vías de supervivencia celular mientras que NMDAR localizados fuera de las sinapsis activan vías que llevan a la muerte celular (Fig. 1).

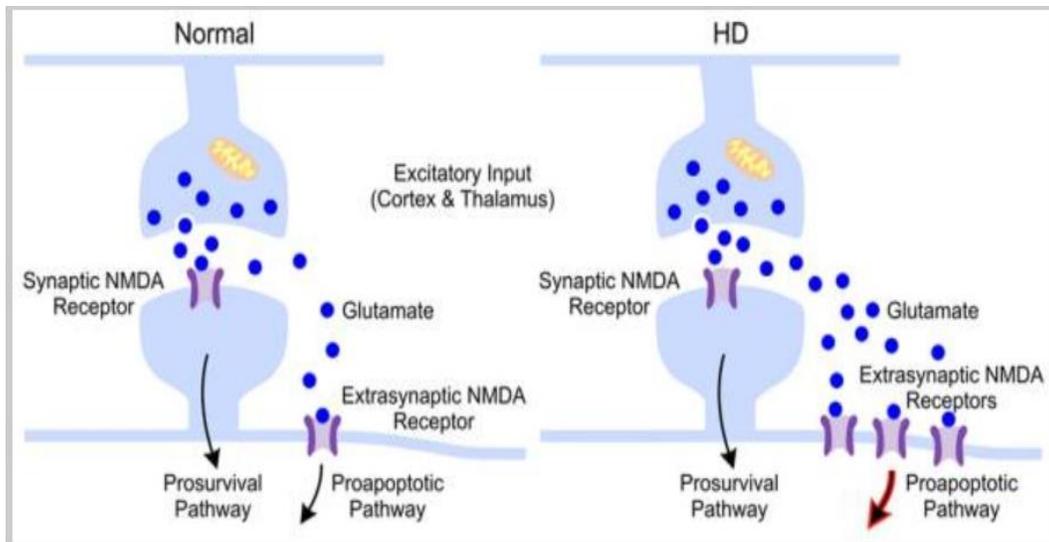


Fig. 1. Receptores sinápticos y extrasinápticos en la enfermedad de Huntington (HD). El lado izquierdo muestra receptores NMDA sinápticos y extrasinápticos que funcionan de manera equilibrada en condiciones normales. A la derecha en HD hay un aumento en la función del receptor NMDA extrasináptico debido al aumento en el número de receptores y / o un aumento en el glutamato extracelular que cambia el equilibrio funcional hacia los receptores extrasinápticos que mejoran la vía proapoptótica. (Tomado de Levine et al., 2010).

Así, el balance de la actividad o el número de cada uno de los tipos de NMDAR en cada ubicación pueden influir en el resultado entre la supervivencia celular y la muerte celular. A este respecto, ha sido observado que la activación de receptores NMDA localizados en la sinapsis induce la expresión de proteínas que favorecen la supervivencia de las neuronas, como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), mientras que la activación de receptores NMDA localizados en partes extrasinápticas lleva a la expresión de proteínas pro-apoptóticas y a la supresión de la activación de vías de supervivencia celular (Léveillé, et al., 2008). Sin embargo, también se ha sugerido que las diferencias aparentes en la excitotoxicidad mediada por NMDAR podrían deberse a diferencias en la composición molecular entre los NMDAR sinápticos/ extrasinápticos en oposición a la ubicación de los receptores per se. En el cerebro adulto, los NMDAR ubicados en las sinapsis contienen predominantemente el subtipo NR2A mientras que los NMDAR extrasinápticos contienen predominantemente NR2B (Martel, et al 2009; Tu, et al. 2010). Aunque hay evidencia de que las diferencias en la composición de subunidades explican los diferentes efectos del glutamato en el funcionamiento de la ubicación sináptica o extrasináptica del NMDAR, la activación de NMDAR que contienen subunidades NR2B tiende a promover la muerte neuronal, independientemente de la ubicación, mientras que la activación de NMDAR que contienen subunidades NR2A promueve la supervivencia (Liu, et al. 2007). Sin embargo, NR2A-NMDARs son capaces de mediar la excitotoxicidad (von Engelhardt J, et al., 2007) y NR2B-NMDARs son capaces de mediar tanto en señalización de supervivencia y de muerte, dependiendo del paradigma de estimulación (Martel MA, et al., 2009). Así, la activación de receptores NMDA sinápticos induce neuroprotección, mientras que activación de receptores NMDAR extra-sinápticos preferentemente inician vías que llevan a la muerte celular (Hardingham, et al., 2002; Leveille, et al., 2008). Por lo tanto, el destino de las neuronas frente a la activación por glutamato no está determinado únicamente por el grado de actividad general de los receptores NMDA, sino por el grado en que se activan los receptores NMDA sinápticos y extrasinápticos. De acuerdo con este concepto, no es la sobrecarga de Ca^{2+} “per se” la única determinante de la toxicidad, sino más bien el flujo de Ca^{2+} a través de los receptores NMDA ubicados fuera de la sinapsis que es particularmente dañino para las neuronas.

La actividad sináptica del NMDAR es de naturaleza fásica, mientras que la activación extrasináptica se logra mediante el agonismo crónico, pero cuando las concentraciones totales equivalentes de Ca^{2+} son desencadenadas por receptores NMDA sinápticos y extrasinápticos, causan

una cascada de eventos sorprendentemente diferentes (Hardingham, et al., 2002). La entrada de Ca^{2+} producida por la intensa activación sináptica de NMDAR no solo es bien tolerada por las neuronas del hipocampo (es decir, no causa perturbaciones en el potencial de la membrana mitocondrial), sino que también desencadena procesos genómicos que hacen que las neuronas sean más resistentes a la apoptosis y agresiones oxidativas (Soriano, et al. 2006). En marcado contraste, la entrada Ca^{2+} a niveles comparables inducidos por la activación de receptores NMDA extrasinápticos, ya sea por sí mismos o en presencia de activación sináptica de NMDAR, desencadenan la disfunción mitocondrial y la muerte celular (Hardingham, et al., 2002) La activación sináptica y extrasináptica de NMDAR que conducen a la supervivencia y la muerte, siguen vías de señalización diferentes (Leveille, et al., 2008) destacando la importancia de los NMDAR extrasinápticos en la excitotoxicidad (Martin, & Wang, 2010; Stanika, et al., 2009). Los receptores NMDA interactúan con múltiples proteínas intracelulares y del citoesqueleto, principalmente a través los extremos C citoplasmático de las subunidades NR1 y NR2 (Niethammer, et al., 1996; Sattler & Tymianski. 2000). El microscopio electrónico permitió descubrir la existencia de estructuras de alta densidad electrónica en el lado post-sináptico conocidas como densidades postsinápticas (PSD) y que consisten de numerosas proteínas del citoesqueleto y proteínas reguladoras, de las cuales algunas hacen contacto con dominios citoplasmáticos de los canales iónicos en la membrana postsináptica (Ziff, 1997). Los NMDAR existen en forma de complejos multiproteicos que determinan la eficacia con la que su activación conduce a eventos de señalización específicos en la neurona. Se ha propuesto además que la señalización letal del Ca^{2+} a través de NMDARs está determinada por la interacción entre el complejo molecular y el NMDAR (Sattler, et al. 1998). En la sinapsis, los receptores NMDAR se encuentran localizados dentro de estructuras PSD, donde forman grandes y dinámicos complejos multiproteicos de señalización (Sattler, et al. 1999; Kim, & Sheng. 2004). El PSD es un complejo multiproteico que incluye un grupo de proteínas llamadas guanilato quinasas asociadas a la membrana (MAGUK) (Kornau, et al. 1995; Niethammer, et al., 1996).

Las proteínas MAGUK contienen varios dominios PDZ (“postsynaptic density-95/large/área occludens-1 disks”). Estos dominios consisten en 80-90 aminoácidos, que participan en la formación de grandes complejos proteicos en las células (Kim & Sheng 2004). Un dominio PDZ, el PSD-95 (densidad-95 postsináptica), está involucrado junto con la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) en la señalización intracelular del complejo NMDAR. La proteína PSD-95 hace posible la translocación

de nNOS del citosol a la membrana donde se une a NMDAR formando el complejo NMDAR-PSD95-nNOS (Brenman, et al.,1996). La entrada de Ca^{2+} a través de NMDAR activa nNOS, lo que conduce a la producción de óxido nítrico (NO) (Sattler, et al., 1999). El NO puede reaccionar con el peróxido de hidrógeno producido por la enzima superóxido dismutasa (SOD) y formar peroxinitrito, un radical libre altamente reactivo capaz de causar daño celular y finalmente la muerte neuronal (Ladecola, 1997; Bolaños & Almeida. 1999). Por lo tanto, en condiciones excitotóxicas, la entrada de Ca^{2+} a través del receptor NMDAR promueve la muerte celular más eficientemente que a través de otros canales de Ca^{2+} (Arundine & Tymianski. 2003), lo que sugiere que el canal de iones NMDAR está involucrado en la excitotoxicidad. La eficiencia mediante la cual los iones de Calcio activan señales excitotóxicas a través de moléculas tales como nNOS se puede reducir mediante la disrupción de los complejos NMDAR-PSD-95 o nNOS-PSD-95. La supresión de PSD-95 bloquea selectivamente la producción de NO inducida por glutamato en NMDAR sin expresión de NOS en las neuronas corticales (Sattler, et al., 1999).

En animales de experimentación, el uso de péptidos pequeños que alteraron la interacción de NMDAR con PSD-95 mejora la resistencia de las neuronas a la isquemia cerebral focal (Aarts, et al., 2002). La importancia de la interacción del complejo NMDAR / PSD-95 en la isquemia cerebral se ve reforzada por los resultados que muestran que la inhibición de la unión de PSD-95 con NMDAR previene el daño cerebral isquémico, mientras que la función fisiológica del NMDAR permanece intacta (Sun, et al., 2008). En cultivos de neuronas, el bloque de interacciones proteína-proteína de NMDAR / PSD-95 usando péptidos pequeños que se unen a los dominios PDZ de PSD-95 que modifican su estructura molecular protegieron a las neuronas de la excitotoxicidad. Cuando se usan estos péptidos pequeños en ratas sometidas a isquemia cerebral focal transitoria, se observó una reducción importante del tamaño del área infartada junto con una mejora de las funciones neurológicas. El tratamiento fue efectivo cuando se aplicó antes o 1 h después del inicio de la excitotoxicidad tanto *in vitro* como en la isquemia cerebral *in vivo* (Sun, et al., 2008).

La vulnerabilidad de las neuronas a excitotoxicidad se redujo cuando las interacciones NMDAR/PSD-95 se alteraron utilizando péptidos pequeños que comprenden la subunidad NR2B. El análisis proteómico y bioquímico de todas las PDZ humanas examinadas muestra que solo las neuronas que carecían de PSD-95 o nNOS exhibían una vulnerabilidad excitotóxica reducida. Solo

PSD-95 y nNOS participaron significativamente en la señalización de excitotoxicidad. Por lo tanto, se ha demostrado que a pesar de la ubicuidad de las proteínas que contienen el dominio PDZ, PSD-95 y nNOS juegan un papel más importante en la mediación de excitotoxicidad dependiente de NMDAR que cualquier otra proteína PDZ (Hardingham, et al., 2002). En resumen, el receptor NMDA forma parte de un complejo multimolecular que consiste en NMDAR, PSD-95, nNOS y otras moléculas asociadas. La excitotoxicidad implica la activación del NMDAR que induce la señalización de vías neurotóxicas específicas mediante el acoplamiento de la actividad del receptor con vías neurotóxicas actuando el Ca^{2+} como segundo mensajero (Stanika, et al., 2009; Berliochi, et al., 2005; Szydłowska, & Tymianski. 2010; Dong, et al., 2009).

Trastornos como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, la esclerosis múltiple, la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), son causados por diferentes mecanismos, pero pueden compartir una vía final común a la lesión neuronal debida a la sobre-estimulación de los receptores de glutamato. Los trastornos agudos, como el ictus, el trauma del sistema nervioso central (SNC) y las convulsiones, también manifiestan un componente de excitotoxicidad. Por lo tanto, los antagonistas de NMDAR podrían ser de beneficio terapéutico en una serie de trastornos neurológicos. Varios antagonistas del receptor NMDA como memantine y MK-801 han sido ensayados como neuroprotectores frente a la excitotoxicidad (Fox, et al., 2012; Grossberg, et al. 2013). Sin embargo, estos resultados no eran confirmados por otros estudios (Matsunaga, et al., 2015; Schneider, et al., 2011). Un posible motivo podría ser que otros receptores como ácido caínico y AMPA también pueden tener un papel importante en la excitotoxicidad porque contribuyen a aumentar la entrada de Calcio en las células. (Zheng, et al., 2011).

En condiciones fisiológicas, uno de los eventos más prominentes, es el rápido y transitorio aumento de los niveles de Calcio en las neuronas. Este aumento local en la concentración de Ca^{2+} está asociado a un número de alteraciones sináptica específicas a corto y largo plazo. Estas incluyen la inserción o eliminación de subunidades específicas en los canales de Ca^{2+} en o desde la membrana y la modificación post-transcripcional o degradación de proteínas sinápticas [Catterall & Few. 2008]. Al lado de estos eventos locales en la sinapsis, el aumento del Ca^{2+} en las neuronas post-sinápticas activa una cascada de señales que regulan la expresión de genes y que son esenciales para vida de las neuronas y para la plasticidad sináptica (Berridge, et al., 2003). El Calcio es un segundo mensajero

intracelular que controla una variedad de procesos celulares. A diferencia de otros sistemas de segundo mensajero, el Ca^{2+} no se puede metabolizar, y su concentración se controla principalmente mediante transportes a través de las membranas. En condiciones fisiológicas normales en células eucariotas, el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ extruye Ca^{2+} del citoplasma a cambio de la entrada de Na^+ y de este modo participa en la homeostasis del Calcio celular. Cuando la homeostasis falla, y las concentraciones de Ca^{2+} son disreguladas, da como resultado el daño celular y la muerte, que son el preludio de las consecuencias patológicas de enfermedades neurodegenerativas.

En condiciones de reposo, los niveles de Ca^{2+} libre en el citosol de las neuronas es mantenido alrededor de 200 nM. En condiciones de estimulación eléctrica o a través de receptor, los niveles de Ca^{2+} aumentan a unos pocos μM por entrada de Ca^{2+} extracelular por liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares. Varios mecanismos celulares mantienen el nivel Ca^{2+} libre en el citosol $[\text{Ca}^{2+}]_c$ estrechamente regulado en sus niveles homeostáticos. La mitocondria y el retículo endoplasmático juegan un papel muy importante en el mantenimiento de los niveles homeostáticos de $[\text{Ca}^{2+}]_c$. La pérdida de la homeostasis de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ lleva a consecuencias desastrosas para la célula. Toda una ma de funciones celulares está regulada por la concentración de Ca^{2+} citosólico libre (Missiaen, et al., 2000). La perturbación de la homeostasis del Ca^{2+} ha sido observada en las principales patologías neurodegenerativas, incluyendo Alzheimer (Green & LaFerla. 2008; Bezprozvanny & Mattson. 2008) Parkinson (Surmeier, 2007; Levy, et al. 2009), ELA (von Lewinsk & Keller: 2005, 28:494-500) e ictus (Szydłowska, & Tymianski. 2010).

La acumulación excesiva de Calcio libre en el citosol inicia una serie de eventos bioquímicos y moleculares que culminan en la muerte de la neurona (Stanika, et al., 2009; Berliochi, et al., 2005; Szydłowska, & Tymianski. 2010). La activación excesiva del NMDAR conduce a un aumento del Ca^{2+} intracelular (Lipton, & Rosenberg. 1994; Choi, 1988; Meldrum, & Garthwaite 1990). Los niveles de Ca^{2+} intracelular ha de mantenerse sobre un umbral metabólico para satisfacer las necesidades metabólicas y por debajo de un umbral tóxico para evitar la activación de proteasas, lipasas e endonucleasas que inician una sería de procesos bioquímicos y moleculares que culminan en la muerte neuronal (Stanika, et al., 2009; Berliochi, et al., 2005; Szydłowska, & Tymianski. 2010).

Los principales eventos excitotóxicos, promovidos por la sobre carga de Calcio en el

citoplasma causado por la activación excesiva de los receptores glutamérgicos, incluyen la formación de un estado oxidativo/nitrosactivo, activación de calpaína y disfunción mitocondrial que cada uno o sinérgicamente pueden llevar a la muerte neuronal por necrosis y apoptosis. Sin embargo, como ocurre con muchos otros eventos fisiológicos dependientes de Ca^{2+} , una comprensión moderna de la neurotoxicidad dependiente de Ca^{2+} incluye la apreciación de que la neurotoxicidad dependiente de Ca^{2+} ocurre a través de vías de señalización específicas desencadenadas por sustratos moleculares dependientes de Ca^{2+} vinculados con receptores específicos de la membrana plasmática. Por lo tanto, el principal determinante de la vulnerabilidad de las neuronas a la muerte celular mediada por Ca^{2+} no es una pérdida generalizada de su homeostasis causada por un exceso global de iones Ca^{2+} en la célula. Más bien, es la ruta de entrada de Ca^{2+} en la neurona y su infraestructura molecular asociada. Por lo tanto, la muerte celular desencadenada por NMDARs durante una agresión excitotóxica probablemente no sea causada únicamente por la capacidad de este receptor para causar grandes aumentos en la concentración de iones Ca^{2+} intracelular, sino más bien debido a la activación de moléculas de señalización asociadas a NMDAR (Sattler, & Tymianski. 2000).

Dentro de la complejidad de los mecanismos que intervienen en procesos excitotóxicos, dos son los mecanismos aceptados como los principales que llevan a la muerte neuronal, el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial (Fig. 2).

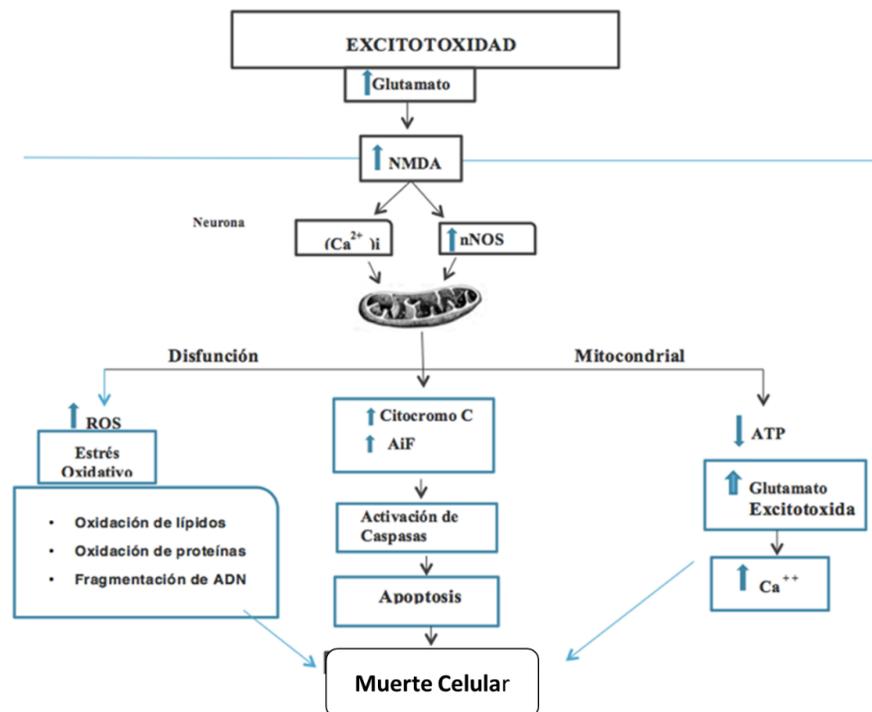


Fig. 2 Mecanismo de excitotoxicidad en la neurona.

1.3. Estrés oxidativo.

Uno de los efectos más importantes atribuidos a la excitotoxicidad es el de causar estrés oxidativo. El estrés oxidativo, ha sido redefinido como “una alteración en el equilibrio de la capacidad anti-oxidante y pro-oxidante a favor de la primera, asociado con una interrupción del circuito redox y con daño molecular en la célula” (Jones, 2006). El estrés oxidativo describe una situación celular donde la producción de radicales libres es mayor que su inactivación por los sistemas de defensa antioxidante (Yu. 1994; Halliwell. 2006). Esto puede ocurrir por una producción excesiva de radicales libres, por la pérdida de la capacidad antioxidante o por ambos. Cuando la producción de oxidantes excede la capacidad a la que la actividad antioxidante endógena, la presencia de radicales libres pueden causar daños a las estructuras de proteínas, lípidos y ADN que lleva al deterioro de la arquitectura estructural celular y finalmente a la muerte celular (Halliwell, 2006, Avery, 2011; Avery. 2011). El estrés oxidativo aparece implicado en las principales patologías neurodegenerativas, entre otras el Parkinson, Alzheimer, Esclerosis amiotrófica lateral, ictus (Roberts et al. 2009; Shukla et al., 2012).

En condiciones fisiológicas el mantenimiento redox es resultado de un equilibrio entre la capacidad antioxidante (en las neuronas, principalmente la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) y del sistema glutatión) y la capacidad pro-oxidante celular (producción de radicales libres). Un "radical libre" es cualquier especie química (átomo, molécula) capaz de existir independiente y que tiene uno o más electrones desapareados. Este electrón no apareado (s) por lo general da un grado considerable de la reactividad a la de los radicales libres. Radicales derivados de oxígeno y radicales derivados de óxido nítrico, conocidas como especies de oxígeno reactivas (ROS) y especies de nitrógeno reactivas (RNS), representan la clase de especies de radicales más importante generados en los sistemas vivos que intervienen en el daño celular causado por el estrés oxidativo (Halliwell, 2006; Valko y col., 2007). Los radicales libres pueden destruir irreversiblemente o alterar la función de las macromoléculas y dañar la arquitectura estructural celular y finalmente causar la muerte celular. Indirectamente, los radicales libres también pueden iniciar reacciones, que finalmente pueden conducir a la muerte de las neuronas. Estas reacciones incluyen principalmente la disfunción mitocondrial (Ott, et al., 2007), la activación de la cascada apoptótica (Chong, et al., 2004) y la activación de las vías de transducción de señales (Ray et al., 2012). Muchas líneas de evidencia

demuestran que los radicales libres desempeñan un papel fundamental en la muerte excitotóxica en el cerebro (Schulz, et al., 1995; Gonsette 2008; Rama &, García. 2013).

1.3.1. Radicales libres

La presencia de radicales libres es parte del metabolismo normal y participan en importantes funciones fisiológicas como por ejemplo en la defensa contra agentes infecciosos, en la función de sistemas de señalización celular y en la inducción de la respuesta mitógena (Dröge 2002; Valko et al., 2007). Los radicales libres más comunes son derivados moleculares del oxígeno y el óxido nítrico, llamados especies reactivas del oxígeno (ROS) y especies reactivas del nitrógeno (RNS), respectivamente. ROS es un término colectivo que describe las especies químicas que se forman después de la reducción incompleta de oxígeno. Aunque el oxígeno molecular es un di-radical muy poco reactivo, su reducción univalente conduce a la formación de especies químicamente más reactivas. Estos incluyen el radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$), el radical hidroxilo (OH^{\bullet}) y ciertos compuestos no radicales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El NO juega un papel clave tanto en procesos fisiológicos normales y en estados de enfermedad. Bajo ciertas circunstancias, NO puede ser neurotóxico. Aunque el NO en sí mismo no es un radical, en presencia de H_2O_2 y $O_2^{\bullet -}$, el NO reacciona con $O_2^{\bullet -}$ para formar OH^{\bullet} y $ONOO^-$, ambos considerados como los radicales más dañinos para la arquitectura celular. En situaciones de excitotoxicidad, la producción de NO en el cerebro aumenta dramáticamente debido a la acción de la activación de la NOS neuronal y de las isoformas inducibles de la NOS (Bolaños y Almeida, 1999). NO tiene una gran afinidad hacia el anión superóxido en un proceso llamado reacción de Haber-Weis, que combina H_2O_2 y $O_2^{\bullet -}$ para formar el radical hidroxilo y el peroxinitrito ($ONOO^-$) (Bolaños y Almeida, 1999). Estos dos últimos radicales son los radicales libres más reactivos producidos en sistemas biológicos. $ONOO^-$ se genera en niveles altos durante la hipoxia (Lipton, 1999) y contribuye fuertemente a daño cerebral y la peroxidación lipídica de la membrana (Bolaños y Almeida, 1999). En las sinapsis, los NMDRs activados por glutamato, principalmente a través de las subunidades NR1 y NR2, interactúan con la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) (Sattler et al., 1999). La activación de nNOS por NMDRs lleva a la producción excesiva de óxido nítrico que, si bien en condiciones fisiológicas es un segundo mensajero intracelular, en cantidades mayores es un sustrato para la producción de radicales libres como peroxinitritos que promueven el daño celular (Bolaños y Almeida, 1999) (Fig. 3).

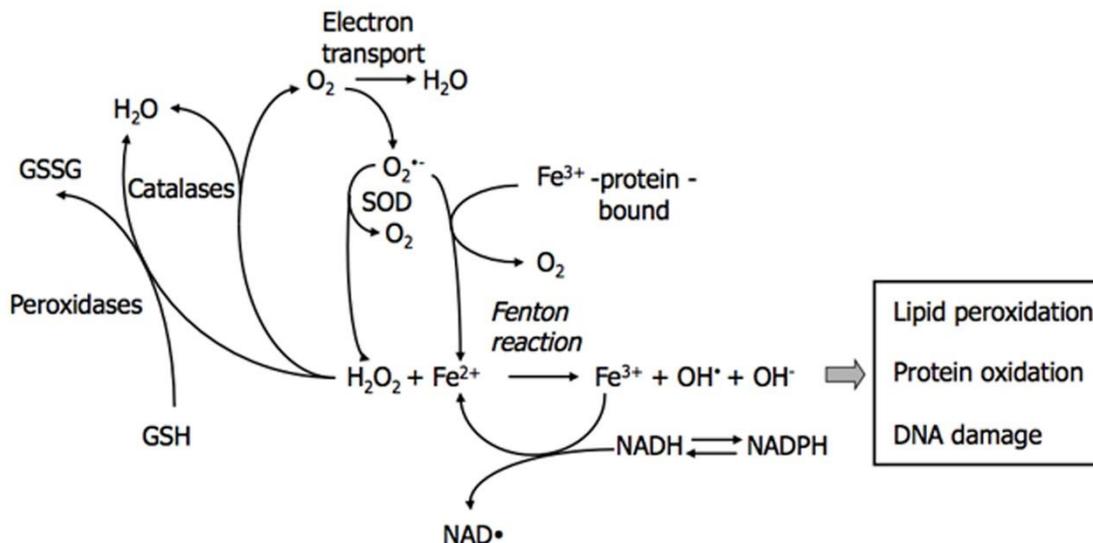


Fig. 3 Esquema de mecanismos antioxidantes y oxidantes (Tomado de Carbonell & Rama, 2009).

Durante la fosforilación oxidativa en las mitocondrias un número reducido de electrones, abandona la cadena de transporte electrónica (ETC) mitocondrial y reaccionan con el oxígeno para formar radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$) un miembro del grupo de ROS, que es rápidamente convertido en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ya sea espontáneamente, particularmente a pH bajo, o catalizado por el enzima superóxido dismutasa (Boveris y Chance, 1973). A su vez, el H_2O_2 puede ser, por la reacción de Haber-Weiss, convertido en el radical hidroxilo ($\cdot OH$), el radical libre más reactivo producido por los sistemas biológicos o reducido a agua por la catálisis de GSH peroxidasa. En condiciones fisiológicas, la capacidad antioxidante celular es suficiente para mantener los niveles de radicales libres, los principales ejecutores del estrés oxidativo, por debajo del umbral tóxico (Dröge 2002).

Tres mecanismos distintos generan ROS en las neuronas. En las células, las principales fuentes de ROS son la cadena respiratoria mitocondrial y los enzimas NAD(P)H oxidasa y xantina oxidasa (Avery, 2011). La mitocondria es la principal fuente fisiológica de ROS y es al mismo tiempo objetivo de los ROS. El complejo NADPH oxidasa que produce superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en condiciones de normoxia, se ha implicado en la generación de ROS durante la isquemia y la reperfusión. Otra fuente de generación de ROS, la xantina oxidasa (XO), también ha demostrado ser un importante productor de radicales libres durante la isquemia-reperfusión. Inhibidores de la xantina oxidasa atenúan la lesión cerebral.

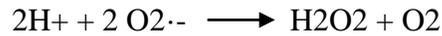
La formación de superóxido y el peróxido de hidrógeno es apenas detectable en mitocondrias que respiran normalmente (sin inhibición). Sin embargo, una alteración en la cadena de transporte electrónico mitocondrial lleva favorecer la producción de ROS y consecuentemente estrés oxidativo y apoptosis. Actualmente la producción de radicales libres por NAD(P)H oxidasa y XO han sido propuestas como fuentes importantes del aumento de radicales libres en la hipoxia. Como conclusión, se puede decir que la producción de niveles bajos de ROS son una señal de que la función mitocondrial está intacta, mientras que el aumento de la producción de ROS, es una señal de que la célula está en riesgo de daño oxidativo.

1.3.2. Actividad antioxidante

Para el mantenimiento del equilibrio redox celular, las células disponen de un sistema antioxidante que les permite eliminar el exceso de $O_2^{\bullet -}$, de $\cdot OH$, de H_2O_2 y de NO (Sies, et al., 2017). La continua producción de radicales libres de oxígeno por el metabolismo aerobio celular hace necesaria la existencia de mecanismos antioxidantes endógenos, de tipo enzimático y no enzimático, para proteger las células del estrés oxidativo y mantener el equilibrio redox celular. Las células han desarrollado tanto mecanismos enzimáticos como no-enzimáticos para protegerse de los efectos tóxicos de los oxidantes. Mecanismos enzimáticos que incluyen superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, y catalasa y los antioxidantes no enzimáticos que incluyen al glutatión, ascorbato y α -tocopherol (vitamina E) están entre los sistemas antioxidantes celulares más importante. En condiciones fisiológicas, antioxidantes y oxidantes operan juntos para mantener la homeóstasis de los radicales libres. De los tipos principales de ROS - radical superóxido, peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo-, sólo existen enzimas detoxificadoras para neutralizar los dos primeros. No obstante, eliminando estos dos radicales libres se limita la formación del radical hidroxilo.

Superóxido dismutasa (SOD). La superóxido dismutasa fue descrita por primera vez por los investigadores McCord y Fridovich en 1969. Se encarga de eliminar el radical superóxido catalizando su dismutación para generar peróxido de hidrógeno y oxígeno, siendo esta reacción cuatro veces más rápida que la dismutación no enzimática de este radical.

SOD



Es una enzima que presenta varias isoformas repartidas por los diferentes compartimentos celulares, su localización preferentemente es citosólica, aunque también se ha detectado su presencia en otros orgánulos, como la mitocondria o los glicosomas. Químicamente se caracteriza por ser capaz de incluir ciertos cationes metálicos en su estructura. Tradicionalmente las SODs se han clasificado en tres tipos de acuerdo con el cofactor metálico al que aparecen unidas, los metales que contienen o su localización celular: Cu-ZnSOD (SOD1), MnSOD (SOD2), EC-SOD (SOD3).

La enzima CuZnSOD (SOD1), de localización citosólica, es un homodímero de 32kDa, con un átomo de cobre y otro de zinc en cada una de sus subunidades. El átomo de cobre parece ser responsable de la actividad catalítica mientras que el átomo de zinc tendría una función estabilizadora de la estructura.

La enzima MnSOD (SOD2), se localiza en la mitocondria y contiene cuatro subunidades idénticas con un átomo de manganeso en cada una de ellas. El estrés oxidativo conduce a la inactivación o disminución de la actividad de esta enzima, debido a la acumulación del anión superóxido a nivel de la mitocondria, y más tarde, a la muerte celular de este orgánulo.

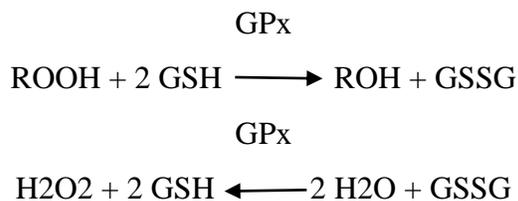
La enzima EC-SOD (SOD3), de localización extracelular, es una glicoproteína tetramérica de 132 KDa y está formada por iones de cobre y zinc en su estructura. En el cerebro, la cantidad de esta enzima es mucho menor que las dos isoformas anteriores.

Glutación. El glutatión, descubierto en un extracto de levadura *Saccharomyces cerevisiae* en 1888 por Rey-Pailhade, es un antioxidante no enzimático hidrosoluble, presente en numerosos tejidos, que juega un papel muy importante en el balance redox de la célula al constituir una fuente principal de poder reductor de la misma. Estructuralmente el glutatión es un tripéptido formado por los aminoácidos: ácido glutámico, cisteína y glicina, el cual se encuentra en el cerebro a concentraciones bajas (1-3 mM), y tiene una gran relevancia protegiendo frente al estrés oxidativo, actuando como un secuestrador de ROS. Existen dos formas, la reducida (GSH) y la oxidada

(GSSG), en condiciones fisiológicas, predomina la forma reducida. El glutatión es generado, a nivel cerebral, por la glutatión reductasa (GR). Estudios indican la presencia de enzimas que metabolizan el glutatión en cerebro (GR y GPx), aunque son menores que en otros tejidos, como el riñón e hígado.

El equilibrio entre las dos formas de glutatión es fundamental, dado que el coeficiente de GSH/GSSG es un indicador del estrés oxidativo de un tejido. Cuando este coeficiente disminuye, es un indicador de que el tejido está sometido a un estrés oxidativo que hace que El equilibrio entre las dos formas de glutatión es fundamental, dado que el coeficiente de GSH/GSSG es un indicador del estrés oxidativo de un tejido. Cuando este coeficiente disminuye, es un indicador de que el tejido está sometido a un estrés oxidativo que hace que predomine la forma oxidada del glutatión. Por lo tanto, es esencial para la célula mantener elevado el coeficiente GSH/GSSG para contrarrestar los efectos dañinos de los ROS y fomentar la citoprotección.

Glutatión peroxidasa (GPx). La glutatión peroxidasa se descubrió por primera vez en eritrocitos en el siglo XX (Mills, 1957). Mayoritariamente se localiza en el citosol aunque algunas isoformas se localizan en la mitocondria y en las membranas celulares. Cataliza la reacción de reducción de hidroperóxidos inespecíficos procedentes de fuentes diversas (orgánicas, lípidos de membrana y restos nucleicos) a través de la oxidación del glutatión. También es el sistema que se encarga de la detoxificación del peróxido de hidrógeno a concentraciones intracelulares bajas.

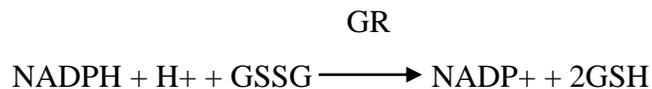


El sistema peroxidasa requiere para su funcionamiento la presencia de dos moléculas de glutatión en forma reducida (GSH), que actúan como cofactor específico de dicha enzima, cediendo hidrógeno y cuyo producto, la forma oxidada, sería objeto de la acción de un nuevo enzima, la glutatión reductasa (GR), que permitirá la regeneración de la forma reducida gracias a la oxidación simultánea de NADPH (Fig. 4). Encontramos dos isoformas; GPx dependiente e independiente de selenio. En este estudio hemos cuantificado la actividad de la enzima glutatión peroxidasa

dependiente de selenio.

La enzima GPx dependiente de selenio es una enzima tetramérica que contiene 4 átomos de selenio en su centro activo unidos covalentemente en forma de selenocisteína. Se localiza en el citosol y en la mitocondria. En cambio, la enzima GPx independiente de selenio es dimérica y presenta un lugar de unión para GSH y otro para los sustratos electrofílicos, la cual encontramos en el citosol, mitocondria y en las membranas celulares. Esta enzima juega un papel protector en el cerebro en respuesta a un aumento de los niveles de H₂O₂. Estudios experimentales han demostrado que, si existen alteraciones en dicha enzima, el cerebro es más sensible al daño oxidativo.

Glutación reductasa (GR). La enzima glutatión reductasa es homodimérica (120 kDa) y está constituida por dos subunidades que se unen por medio de un puente disulfuro. Contiene un sitio de unión al NADPH y un sitio catalítico formado por flavín adenín dinucleótido (FAD) y un grupo disulfuro (Schulz et al., 1978). Tiene una localización citoplasmática y mitocondrial. Su función es catalizar la conversión de glutatión oxidado (GSSG) en glutatión reducido (GSH), utilizando NADPH como cof (Mannervik, 1999). Esta reacción consta de dos pasos: el primero implica la reducción del sitio catalítico por NADPH, y el segundo, en la que el grupo ditiol resultante reacciona con GSSG generándose dos moléculas de GSH.



La importancia del estudio se centra en analizar las defensas de antioxidantes en tejido cerebral, ya que son de vital importancia para disminuir los daños celulares producidos por la hipoxia/reoxigenación, además de analizar el daño oxidativo que provocan los ROS sobre biomoléculas como proteínas o lípidos, los cuales alteran las funciones que desempeñan dentro de la célula poniendo en riesgo la homeostasis celular y pudiendo, con ello, provocar la muerte.

1.4. Disfunción mitocondrial

Las mitocondrias son esenciales para garantizar numerosos procesos fisiológicos fundamentales, como la energía celular, el equilibrio redox, la modulación de la señalización de Ca²⁺

y las vías biosintéticas importantes. La forma, el volumen, el número y la distribución de las mitocondrias dentro de las células están estrictamente controlados. La regulación de estos parámetros tiene un impacto en la función mitocondrial, especialmente en el sistema nervioso central, donde el tráfico de mitocondrias es crítico para su distribución intracelular estratégica, presumiblemente de acuerdo con las demandas locales de energía. Por lo tanto, el mantenimiento de una población mitocondrial saludable es esencial para evitar el deterioro de los procesos que regulan: para este fin, las células han desarrollado mecanismos que implican un complejo sistema de control de calidad para eliminar las mitocondrias dañadas o para renovarlas. Los defectos de estos procesos deterioran la función mitocondrial y conducen a la función celular desordenada, es decir, a un estado de enfermedad. La función mitocondrial dañada tiene efectos pleiotrópicos en los organismos multicelulares, lo que resulta en diversas condiciones patológicas, que van desde la isquemia cardíaca y cerebral a las enfermedades neurodegenerativas. Los aumentos moderados en la concentración mitocondrial de Ca^{2+} son necesarios y suficientes para ajustar la producción de ATP a la demanda celular, pero la sobrecarga intracelular de Ca^{2+} conduce inequívocamente a la disrupción de la integridad de la membrana mitocondrial, transición de permeabilidad, daño oxidativo irreversible y pérdida de producción de ATP. Un aumento en la concentración de Ca^{2+} citosólico por encima de $0,5 \mu\text{M}$ aumenta la captación mitocondrial de Ca^{2+} , lo que provoca la apertura secuencial de los poros de transición de permeabilidad mitocondrial, colapso del potencial de membrana mitocondrial interna, falla de fosforilación oxidativa y generación de especies reactivas de nitrógeno y oxígeno (RONS) (Nguyen et al. 2014). La acumulación de Ca^{2+} activan múltiples vías de señalización que contribuyen a la muerte celular, incluido el incremento en la producción de óxido nítrico (NO). El aumento la acumulación de Calcio por las mitocondrias, en respuesta a la entrada excesiva de Calcio inducida por el glutamato, promueve la pérdida del potencial de la membrana mitocondrial debido a la alteración de los mecanismos que regulan la integridad de la membrana mitocondrial externa (Abramov & Duchon 2008). El mantenimiento del potencial de membrana mitocondrial es esencial para que las mitocondrias realicen sus funciones y eviten la activación de la vía apoptótica intrínseca (Kroemer 2003; Li & Dewson 2015). La alteración de los mecanismos que regulan la apertura de los poros de transición de la permeabilidad mitocondrial (MPTP) se considera el principal evento importante que conduce a la disfunción mitocondrial. La permeabilización de la membrana mitocondrial determina si las células van a sucumbir o sobrevivirán a la lesión y representa un "punto de no retorno" en la muerte de las células.

El aumento en la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa tiene dos consecuencias fisiopatológicamente importantes. La descomposición del gradiente electroquímico interfiere con la respiración mitocondrial y, en consecuencia, la fosforilación oxidativa de los nucleótidos de adenina. Además, el equilibrio de los gradientes de iones mitocondriales causa hinchazón de la matriz mitocondrial, lo que eventualmente causará la disrupción de la membrana mitocondrial externa y la liberación de proteínas mitocondriales pro-apoptóticas (Hossmann. 2006). Dicho de otro modo, el exceso de Ca^{2+} desencadena la permeabilización de la membrana mitocondrial (MMP) causando disipación del potencial mitocondrial transmembrana ($\Delta\psi_m$), lo que lleva a una crisis bioenergética que se caracteriza por desacoplamiento de la cadena respiratoria, detención de síntesis de ATP y sobre-generación de especies de oxígeno reactivo. La permeabilización de la membrana mitocondrial (MMP) permite la liberación de varias proteínas que normalmente están confinadas dentro del espacio intermembrana mitocondrial (IMS). Brevemente, bajo condiciones fisiológicas, la permeabilización de la membrana mitocondrial está controlada por el linfoma-2 de células B (Bcl-2), una familia de proteínas con actividad pro-apoptótica y anti-apoptótica que, a través de su compleja interacción entre ellas, funcionan como los principales reguladores de la integridad de la membrana externa mitocondrial frente a los insultos apoptóticos. El papel principal de los miembros de la familia Bcl-2 es la regulación de la apoptosis que actúa directamente sobre la membrana externa mitocondrial. Las proteínas antiapoptóticas, principalmente Bcl-2 y Bcl-xl, actúan sobre las mitocondrias estabilizando la integridad de la membrana y evitando la apertura del MPTP, mientras que varios miembros pro-apoptóticos (Bax y Bak) la promueven. Los procesos apoptóticos neuronales se inician cuando la actividad anti-apoptótica Bcl-2 disminuye y la actividad Bax pro-apoptótica aumenta. Si este desequilibrio entre las proteínas antiapoptóticas y proapoptóticas está a favor en el segundo, provoca la apertura del MPTP en la membrana externa mitocondrial, lo que facilita la liberación del citocromo c de la mitocondria al citosol. Una vez en el citosol, el citocromo c en presencia de (d) ATP se une con el factor 1 activador de la proteasa apoptótica (Apaf-1) formando un "apoptosoma" que recluta y activa la Caspasas 9, que a su vez activa la Caspasas 3, el efector Caspasas de la vía apoptótica intrínseca, asegurando la muerte celular (Li, & Dewson 2015).

1.5. Apoptosis

La apoptosis es una forma de muerte celular programada que está implicada en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas, tales como (EA), Parkinson's (EP), Huntington's (EH) diseases, Esclerosis lateral amiotrófica (ELA), Atrofia espinal muscular (AEM) e ictus. Entre los mecanismos mediante los cuales la excitotoxicidad participa en los procesos neurogenerativos, la inducción de apoptosis es uno de los principales. Las células mamíferas poseen dos principales vías de señalización apoptótica, que se conocen como vía intrínsecamente y vía extrínseca. En esta vía la disfunción mitocondrial ocupa un papel central. La excitotoxicidad activa la vía intrínseca, que implica un aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa que conduce a la liberación de varias proteínas desde el espacio intermembrana al citoplasma y la activación de la cascada de las caspasas.

Aunque han sido descritas varias vías apoptóticas activadas ROS (Circu, & Aw 2010), hasta ahora el mecanismo apoptótico asociado con enfermedades neurodegenerativas es el que procede de la activación de la vía intrínseca mitocondrial. La vía de señalización apoptótica intrínseca se debe a la alteración del potencial transmembrana mitocondrial, que puede ser inducida a través de múltiples vías proapoptóticas (Ferri & Kroemer, 2001).

1.6. Neuroprotección y neuroregeneración

En sentido amplio, la neuroprotección es la preservación de la integridad estructural y funcional del cerebro mediante cualquier tipo de intervención que interfiera con los efectos que inducen el daño neuronal. La neuroregeneración tiene como objetivo la recuperación de la función perdida por la acción de los procesos neurodegenerativos. Por la importancia social actual y de futuro ya reseñada, ambos procesos están entre los objetivos principales de la actividad sanitaria. Sin ninguna duda, podemos afirmar que los intentos llevados a cabo hasta el momento han llevado a una cierta frustración sobre el potencial de la medicina regenerativa y en particular sobre la referente a las enfermedades neurodegenerativas.

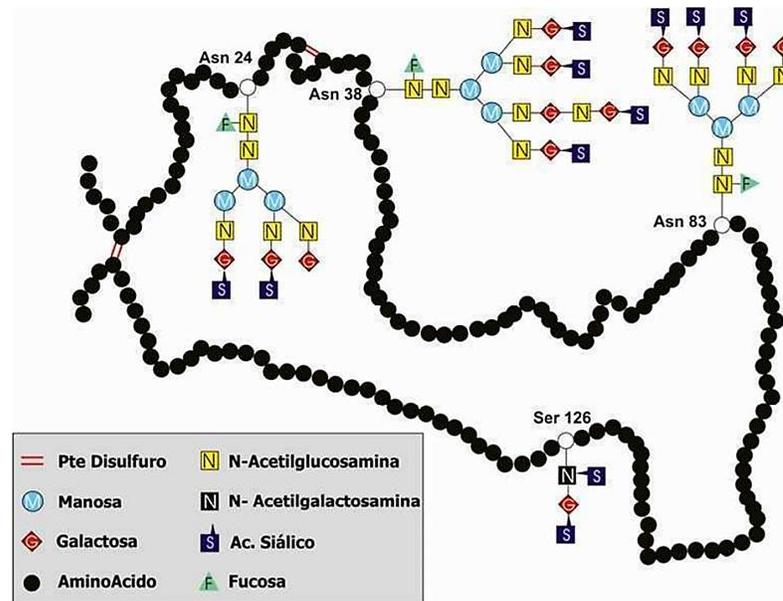
1.6.1. Eritropoyetina

Durante los últimos 30 años, la eritropoyetina (EPO) ha mejorado la calidad de vida de más

de un millón de pacientes con anemia debido a insuficiencia renal crónica (Esbach, et al., 1987). La EPO es una glucoproteína de 30,4 kDa aislada por primera vez en 1977 (Miyake, et al., 1977). El gen Epo humano se encuentra en el cromosoma 7 y después de la modificación postraduccional, la proteína tiene 165 aminoácidos (Lombardero, et al. 2011). La cadena polipeptídica está plegada en cuatro hélices α que están unidas por dos puentes disulfuro entre las cisteínas 6 y 161, y entre las cisteínas 29 y 33 (Lai, et al., 1986) con una masa molecular de 30 kDa, dependiendo del contenido de carbohidratos. La composición de EPO es aproximadamente 60% de proteína y 40% de carbohidrato, que contiene cuatro cadenas glicosiladas que incluyen tres cadenas laterales oligosacáridas ácidas en N y una enlazada en O. Los sitios de glicosilación unidos a N se producen en las posiciones 24, 38 y 83 de los residuos de aspartilo, mientras que el sitio de glicosilación unido a O se encuentra en la serina 126 (Sasaki, et al., 1987). Cada sitio de N y O-glicosilación puede acomodar hasta cuatro y dos residuos de ácido siálico, respectivamente (Wen, et al., 1994; Higuchi, et al., 1992). Inicialmente conocido por su papel esencial en la regulación de la eritropoyesis, muchos estudios han demostrado que la EPO también posee otras funciones biológicas, incluyendo efectos antioxidantes, antiapoptóticos y de protección de los tejidos (Sasaki, et al., 2001; Jelkmann 2007; Arcasoy 2008; Noguchi, et al., 2008).

Los efectos neuroprotectores de la EPO ha sido encontrados estudios preclínicos para una variedad de patologías neurodegenerativas, que incluyen enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica e ictus (Sakanaka, et al., 1998; Rabie, & Marti 2008; Siren, et al., 2009; Sargin, et al., 2010). Todos ellos son neuropatologías que difieren en las causas que los originan, pero todos comparten la excitotoxicidad como uno de los principales mecanismos que conducen a la muerte de las neuronas. Estos efectos neuroprotectores de la EPO sobre las células del sistema nervioso y el hecho de que la EPO ya se usa ampliamente en la práctica clínica, especialmente para el tratamiento en pacientes con anemia asociada a insuficiencia renal crónica (Jelkmann. 2007), hace de la EPO un candidato altamente atractivo para la neuroprotección/ neuroregeneración. Sin embargo, aunque EPO es una molécula prometedora para neuroprotección, el uso de EPO en el tratamiento de enfermedades neurológicas requiere altas dosis y una aplicación prolongada, que puede producir un aumento en el hematocrito y la viscosidad de la sangre y puede conducir a eventos cardiovasculares graves tales como infarto o accidente cerebrovascular (Corwin, et al., 2007; Chateauvieux, et al., 2011). Por lo tanto, la EPO convencional debido a la diafonía con la

actividad hematopoyética puede no ser adecuada para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos (Rabie, & Marti. 2008) (Fig. 4).



Estructura de la Eritropoyetina

Fig. 4. Estructura química de la eritropoyetina (EPO). Tomado de (Pregi, 2008).

1.6.2. Derivados de EPO sin actividad eritroide

Para abordar este problema, un enfoque puede ser el uso de derivados de EPO no hematopoyéticos que producen protección tisular (Leist, et al., 2004; Yuan, et al., 2015). En los últimos años, los análogos EPO no hematopoyéticos, que incluyen asialoeritropoyetina (asialoEPO) (Erbayraktar, et al., 2003), EPO carbamilada (CEPO) (Leist, et al., 2004) y rHU-EPO con un bajo contenido de ácido siálico (NeuroEPO) (Rodríguez, et al., 2010) y que no muestran actividad eritropoyética, han sido probados en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

NeuroEPO es una glicoproteína humana recombinante producida en células de ovario de hámster chino (CHO) (no es un producto comercial; la patente es PCT / cu2006 / 000001, patente 20050138) suministrada por el Centro de Inmunología Molecular (CIM) (La Habana, Cuba). Se caracteriza por su bajo contenido de ácido siálico, lo que significa que NeuroEPO carece de actividad eritropoyética y exhibe propiedades neuroprotectoras (Rodríguez, et al., 2010). NeuroEPO puede alcanzar rápidamente el cerebro después de la administración intranasal (Garcia, & Sosa 2009), y en realidad ha demostrado ser eficaz en diferentes biomodelos de enfermedades neurodegenerativas en

estudios preclínicos. Se ha demostrado que NeuroEPO ejerce efectos neuroprotectores tales como la mejora de la viabilidad, el estado neurológico y las funciones cognitivas en modelos animales de accidente cerebrovascular (Rodríguez, et al., 2010). Además, este compuesto se utiliza actualmente en modelos murinos transgénicos y no transgénicos de la enfermedad de Alzheimer (Rodríguez, et al. 2016; Maurice, et al., 2013). Con el objetivo valorar el posible uso de NeuroEPO como neuroprotector, primero es fundamental comprender las vías celulares que pueden mediar la lesión neuronal y que posteriormente son susceptibles a la modulación por NeuroEPO. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio es investigar el efecto neuroprotector de NeuroEPO contra la apoptosis inducida por excitotoxicidad en un modelo in vitro utilizando el cultivo neuronal cortical y los posibles mecanismos para estos efectos. (Fig. 5).

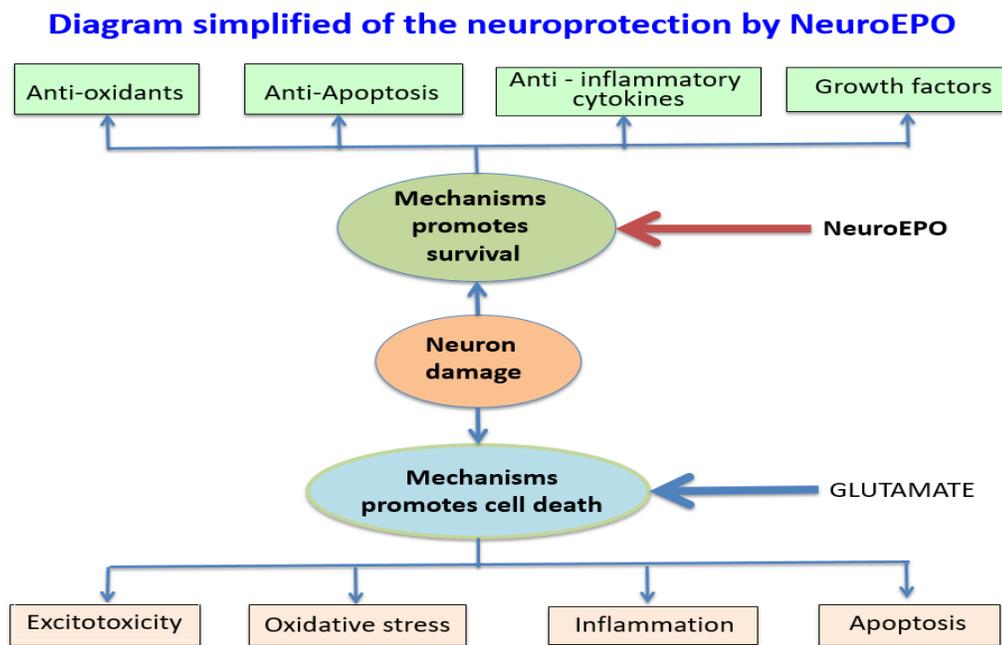


Fig. 5. Diagrama simplificado de neuroprotección por NeuroEPO.

2. Objetivos

El objetivo central de esta tesis es investigar el posible efecto neuroprotector de la NeuroEPO en un modelo "in vitro" de excitotoxicidad neuronal, propio de algunas patologías neurodegenerativas tales como el ictus, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y lesión cerebral traumática, entre otras; dilucidando los mecanismos celulares y moleculares que median su acción y la interacción de los mismos con las vías de señalización celular implicadas, en neuronas expuestas a concentraciones excitotóxicas de glutamato. Para responder a esta cuestión, la tesis se ha sido dividido en objetivos más concretos, a saber:

- 1 – Obtener un cultivo primario puro en neuronas, para evaluar el efecto directo que el tratamiento con NeuroEPO ejerce sobre ellas, una vez que han sido expuestas a la excitotoxicidad con glutamato.
- 2 – Establecer si NeuroEPO puede reducir el efecto excitotóxico del glutamato sobre la viabilidad neuronal y determinar los mecanismos implicados en ello.
- 3 – Determinar si NeuroEPO es capaz de proteger a las neuronas del estrés oxidativo después que el glutamato consigue inducirlo mediante excitotoxicidad.
- 4 – Evaluar si NeuroEPO previene la apoptosis neuronal, mediante el mantenimiento del equilibrio entre la expresión de proteínas antiapoptóticas y pro apoptóticas, que evita la liberación al citosol de citocromo-c y la activación de caspasas-3.
- 5 – Analizar si NeuroEPO con bajo nivel de ácido siálico conserva la actividad neuroprotectora que le ha sido atribuida a la EPOrh.

3. Materiales y Métodos

Los protocolos experimentales utilizados en esta Tesis Doctoral fueron revisados y aprobados por el Comité Ético Institucional para el Cuidado e Investigación con Animales de la Universidad de Barcelona y están en concordancia con la normativa del Consejo Directivo de la Comunidad Económica Europea del 24 de noviembre de 1986 (86/609/EEC) publicado en “Principales cuidados de los animales de laboratorio” (Publicación NIH No. 85-23, revisada en 1985), así como las leyes nacionales españolas (Ley 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio). Todos los procedimientos se han ajustado a la legislación europea vigente (2010/63/UE).

3.1 Cultivo celular cortical.

Los cultivos primarios neuronales han sido obtenidos del hemisferio cerebral de fetos de ratas Wistar de 16 - 17 días de gestación. Las ratas fueron sacrificadas con CO₂ y los fetos por decapitación. La disección de las cortezas cerebrales fetales y su posterior corte en trozos pequeños (1mm³ aprox.) se hicieron en PBS – Glucosa al 3 %. La suspensión se incubó a 37 ° C. por 10 min luego de la adición de Tripsina-EDTA en proporción 1:10, para después inactivar la proteólisis adicionando “Suero Normal de Caballo” (NHS) en proporción 1:2 (NHS : Suspensión). Se agregó DNasa en concentración final de 10 U/mL y se incubó nuevamente a 37 ° C. por 5 min. Luego se disgregó la suspensión mecánicamente pipeteando arriba y abajo con pipeta de 1mL por al menos 50 veces. Una vez centrifugada a 800 rpm durante 5 minutos a 4 ° C. y descartado el sobrenadante, se re-suspendió el precipitado con medio de cultivo para neuronas (medio Neurobasal® (Gibco®) completo 100 mL + 1 mL antibiótico (Penicilina 10000UI / Estreptomina 110mg/mL) + 1 X de GlutaMAX® (Gibco®) + 2 % antioxidante B27 (AO) + 1/5 de medio para neuronas condicionado por al menos 15 días en cultivo confluyente de astrocitos). Se realizó conteo de células utilizando microscopio invertido de contraste de fase y cámara de “Neubauer”. Las neuronas se plantaron en diferentes concentraciones y superficies según fue conveniente: Si se requería muestras para western blott, se plantaron 1-2 X 10⁶ células / pocillo de 35 mm de diámetro de placas de 6 pozos. En caso de necesitar muestras para inmunocitoquímica, se plantaron 150.000 neuronas en láminas cubreobjetos de 12 mm de diámetro. Las superficies de adhesión celular, cristal y plástico, recibieron un tratamiento previo con Poli-D-Lisina 0.5 y 0.05 mg / ml respectivamente durante al menos 1 hora con 3 posteriores lavados en agua bidestilada estéril y secado con Luz UV. Las células se incubaron a

37 ° C y 5% de CO₂ por 9 *días in vitro* (DIV 9), 48 horas después de establecido el cultivo, se añadió al medio Arabinoside Citocine (Ara-C) 10 µM /ml con el fin de evitar la proliferación de astrocitos y otras células gliales, ya que el propósito era experimentar con cultivos puros de neuronas, sin hacer ningún cambio total o parcial del medio de hasta DIV 9 (Fig. 1)

3.2 Exposición a glutamato (Inducción de excitotoxicidad)

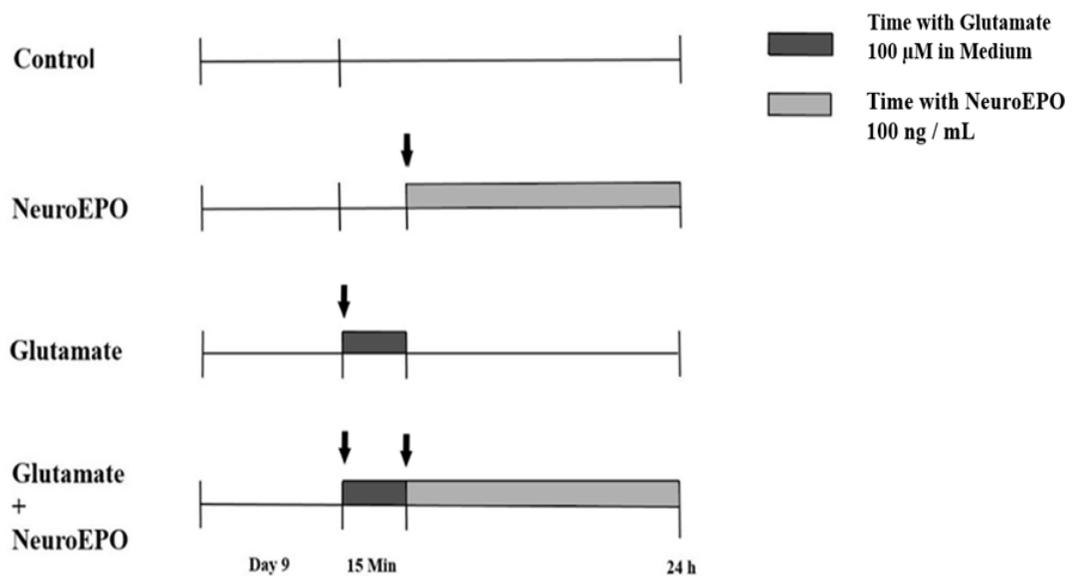
Para reproducir *in vitro* el efecto excitotóxico de la liberación excesiva del glutamato, que hace parte de la fisiopatología de algunas enfermedades neurodegenerativas, los cultivos de neuronas de 9 días fueron tratados con diferentes concentraciones de glutamato (25, 50, 100 y 150 µM) durante 15 minutos, con el propósito de establecer la concentración y el tiempo de exposición más adecuada para causar muerte por excitotoxicidad entre el 40 y 60 % de las células. Luego el medio que contiene glutamato fue eliminado y reemplazado por medio de cultivo para neuronas, arriba descrito. Luego de 24 h, las neuronas fueron fotografiadas, el medio retirado y luego de un lavado con PBS, se añadió tampón de homogeneización 500 µl / pocillo (Sucrosa 0,3 M en PBS 0,1 M con cóctel inhibidor de proteasas (1:25) (que contiene aprotinina, leupeptina, pepstatina, dithiothreitol, iodoacetamida, flourido de fenilmetilsulfonil y ortovanadato de sodio); Cat. No. P2714-BTL, Sigma-Aldrich) por 10 ml, y separado de la placa con un “cell lifter” (Sigma Cat. No. SIAL0008. Las células se congelaron a -80 ° C hasta un análisis posterior. La mortalidad neuronal fue determinada valorando la cantidad de enzima lactato-deshidrogenasa LDH disuelta en los homogeneizados de las muestras y en el medio de cultivo retirado (Fig. 1).

3.3 Efecto de la NeuroEPO.

Una vez caracterizado el daño por excitotoxicidad, las neuronas afectadas con el glutamato fueron expuestas a diferentes concentraciones de NeuroEPO. En cultivos primarios de DIV 9, divididos en 7 grupos, se expusieron inicialmente todos ellos (excepto el control), a 100 µM de glutamato durante 15 minutos en incubadora a 37 ° C. de temperatura y 5 % de CO₂, tras lo cual se realizó un cambio de medio de cultivo por un medio de cultivo para neuronas que contenía las diferentes concentraciones de NeuroEPO a probar (0, 10, 25, 50, 75 y 100 ng / ml). Todos los cultivos se mantuvieron en incubadora por 24 horas antes de medir la viabilidad celular por medio

del método MTT Assay que mide la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5dimetiltiazol-2-ilo)-2,5difeniltetrazol (MTT) por la succinato deshidrogenasa mitocondrial en formazán (color azul), en donde, la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido, que se determina espectrofotométricamente. (Mosmann 1983. modificado por Denizot y Lang 1986). La lesión neuronal se estudió morfológicamente (microscopía de contraste de fase) en una repetición del mismo protocolo de tratamiento con NeuroEPO y al igual que con las muestras anteriormente expuestas a glutamato fueron congeladas a -80°C (Fig.1).

Representación esquemática de los experimentos in vitro con células neuronales cultivadas corticalmente.



Después de 9 días de cultivo (DIV9), las células se incubaron en: medio Neurobasal (Grupo Control); cultivo cuyo medio contiene una concentración final de NeuroEPO de 100 ng / ml (Grupo NeuroEPO); grupo en el que el medio contenía una concentración final de glutamato 100 μM durante 15 minutos y que después fue reemplazado por medio Neurobasal (Grupo Glutamato) y el cultivo cuyo medio contenía una concentración final de glutamato 100 μM durante 15 minutos, que después fue reemplazado por medio con una concentración final de NeuroEPO de 100 ng / ml (Grupo Glutamato + NeuroEPO). Las células fueron cultivadas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO_2 . Las neuronas fueron recogidas a las 24 h posteriores a los procedimientos experimentales. Los resultados corresponden a 3 experimentos independientes realizados en diferentes fechas. Cada dato es el resultado de tres experimentos con 3 pozos para cada grupo en cada experimento (control, glutamato, NeuroEPO y glutamato más NeuroEPO), como se indica en la figura, y la medición por triplicado de las muestras de cada pocillo.

3.4 Cuantificación de proteínas

El día de su procesamiento, las células se descongelaron y se homogeneizaron durante 3 min usando un “Pellet-Pestle” (cat. N° 2359947, Sigma-Aldrich) y su motor (cat. N.º de 2359971, Sigma-Aldrich), luego se centrifugaron durante 10 minutos a 10.000 x g, a 4°C en una centrífuga 5415 R (Eppendorf®). El sobrenadante se recogió y la concentración de proteína se determinó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976), (kit de ensayo de proteínas Bio-Rad) y utilizando un espectrofotómetro El método de Bradford el cual nos permite determinar la concentración de proteína soluble a través de la unión del colorante ácido con la solución de proteínas, y posteriormente midiendo la absorbancia en el espectrofotómetro. Los valores obtenidos se comparan con una curva estándar de BSA (Blood Serum Albumine) con valores de 0 a 2.4 µg/mL. En una placa se colocó la serie de diluciones sucesivas de la muestra patrón de BSA junto con las muestras a determinar y a continuación se añadió el reactivo BIORAD (Cat.No.500-0006) y seguidamente se leyó la placa en el lector TECAN Tecan (Quad4 Monochromators - Infinite® 200. Tecan® Group, Ltd) a 595 nm. A la hora de realizar los cálculos se aplicó la ecuación obtenida a partir de la recta patrón para obtener las concentraciones en mg de proteína/mL de homogeneizado.

3.5 Determinación del estrés oxidativo.

Las células corticales cultivadas en placas de 6 pocillos (10^6 células / pocillo) DIV9, se expusieron a glutamato (100 µM) por 15 minutos, seguido de tratamiento con NeuroEPO (100 ng / ml) durante 24 h. El estrés oxidativo se analizó midiendo la actividad oxidante y antioxidante en células corticales no tratadas y en aquellas tratadas con glutamato solo o con glutamato más NeuroEPO. La actividad antioxidante total se midió utilizando el ensayo: capacidad antioxidante total (Oxiselect® STA-360) y la actividad oxidante total a través del ensayo in vitro ROS / RNS (Especies reactivas de Nitrógeno y de Oxígeno): (Oxiselect® STA-347).

3.5.1 Determinación de Antioxidantes Totales.

Las soluciones de homogeneizados de las neuronas cultivadas de los diferentes grupos (control, glutamato 100µM/ 15 min y NeuroEPO 100ng/24 h posterior al glutamato) en PBS con un

coctel de anti-proteasas, descrito anteriormente, fueron usadas para medir la concentración de antioxidantes totales (Total Antioxidant Capacity Assay Kiy Oxiselect® STA-360).

Fundamento: El ensayo capacidad Antioxidante Total (TAC) se basa en la capacidad que tiene una muestra de reducir el cobre (II) a cobre (I) mediante la transferencia de un electrón. Tras la reducción, el ion de cobre (I) reacciona adicionalmente con un reactivo cromogénico de acoplamiento que produce un color con una absorbancia máxima a 490 nm. Los valores de absorbancia neta de los antioxidantes se comparan con una curva estándar de ácido úrico conocida y son proporcionales a la capacidad reductora total de la muestra. Los resultados se expresan como "Equivalentes reductores de cobre μM " o "Equivalentes de ácido úrico mM ".

Protocolo de ensayo:

- Se agrega 20 μL de las muestras problema y de las sucesivas diluciones de una muestra estándar de ácido úrico en una placa de micro-titulación de 96 pocillos.
- Se añade 180 μL de 1 X de Tampón de Reacción a cada pocillo usando una pipeta multicanal o una placa. Se mezcla bien.
- Se hace una lectura inicial de absorbancia en espectrofotómetro a 490 nm.
- Se cargan 50 μL del reactivo que contiene iones de cobre en cada pocillo, lo cual da inicio a la reacción.
- Incubación por 5 minutos en agitación orbital.
- Se adiciona 50 μL de 1 X solución que finaliza la reacción a cada pocillo.
- Se hace una lectura final de absorbancia en espectrofotómetro a 490 nm.

En el cálculo e interpretación de los resultados, se resta el blanco a las dos lecturas de absorbancia y se obtiene una lectura neta al restar la lectura inicial de la lectura final. Se elabora una recta patrón con los resultados de las diluciones sucesivas de la muestra estándar de concentración conocida de ácido úrico, para luego extrapolar los resultados de las muestras problema usando la ecuación que arroja la recta patrón. Los resultados se indican como equivalentes de Ácido Úrico (mM).

3.5.2 Determinación de Especies Reactivas de Oxígeno y de Nitrógeno

Las soluciones de homogeneizados de las neuronas cultivadas de los diferentes grupos (control, glutamato 100 μ M/ 15 min y NeuroEPO 100ng/24 h posterior al glutamato) en PBS con un coctel de anti-proteasas, descrito anteriormente, fueron usadas para medir la concentración de especies reactivas de nitrógeno y de oxígeno presentes (In vitro ROS / RNS Assay Kit Oxiselect® STA-347).

Fundamento: El ensayo in vitro para medir la actividad total de radicales libres ROS / RNS se basa en la detección del contenido de radicales libres presentes en una muestra. El ensayo emplea una sonda fluorogénica inactivada, diclorodihidrofluorescina DiOxyQ (DCFH-DiOxyQ), que es una sonda ROS / RNS específica basada en una química similar al popular diacetato 2', 7'-diclorodihidrofluoresceína. La sonda DCFH-DiOxyQ se ceba primero con un reactivo de eliminación de inactivación, y posteriormente se estabiliza en la forma de DCFH altamente reactiva. En este estado reactivo, las especies ROS y RNS pueden reaccionar con DCFH, que se oxida rápidamente a la altamente fluorescente 2', 7'-diclorodihidrofluoresceína (DCF). La intensidad de la fluorescencia es proporcional a los niveles totales de ROS / RNS dentro de la muestra. La sonda DCFH-DiOxyQ puede reaccionar con el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el radical peroxilo (ROO·), el óxido nítrico (NO) y el anión peroxinitrito (ONOO⁻). Estas moléculas de radicales libres son representativas de ambos ROS y RNS, lo que permite la medición de la población total de radicales libres dentro de una muestra. Las muestras o diluciones sucesivas estándares ROS o RNS desconocidos se agregan a los pozos con un catalizador que ayuda a acelerar la reacción oxidativa. Después de una breve incubación, la sonda de DCFH preparada se agrega a todos los pocillos y se permite que la reacción de oxidación continúe. Las muestras se miden fluorométricamente frente a un peróxido de hidrógeno o estándar de DCF. El ensayo se realiza en un formato de placa de fluorescencia de 96 pocillos que se puede leer en un lector de placas de fluorescencia estándar. El contenido de radicales libres en muestras desconocidas se determina por comparación con la curva estándar predeterminada de DCF o peróxido de hidrógeno.

Protocolo de ensayo:

- Primero, se prepara y mezcla todos los reactivos por completo antes de usar: el catalizador 1X, la solución DCFH: (en un tubo ámbar o en un tubo cubierto con papel de aluminio, se diluye la solución madre de DCFDiOxyQ 1: 5 con el reactivo de cebado. A continuación,

se diluye el reactivo CFDiOxyQ / Priming Reagent 1:40 con 1X Solución de Estabilización. Se protege la solución de la luz. Esta solución ahora es DCFH en la forma estable y está lista para usar.

- Cada muestra, incluyendo desconocidas y estándares, deben analizarse por duplicado o por triplicado.
- Se agrega 50 μL de muestra desconocida o de muestra de las diluciones sucesivas del patrón de peróxido de hidrógeno a los pocillos de una placa de 96 pocillos adecuada para la medición de fluorescencia.
- Se agrega 50 μL del reactivo catalizador a cada pocillo. Se mezcla bien y se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Se agrega 100 μL de solución de DCFH a cada pocillo. Se cubren los pocillos de reacción de la placa para protegerlos de la luz e incuban a temperatura ambiente durante 15-45 minutos.
- Se lee la fluorescencia con un lector de placas de fluorescencia a una excitación de 480 nm / emisión de 530 nm.

Los resultados se expresan como " μM de H_2O_2 " o "Equivalentes de H_2O_2 μM ".

3.6 Método de Western Blot

Para determinar de la expresión de algunas proteínas pro y anti apoptóticas a partir de células expuestas o no (control) a glutamato (100 μM por 15 min) y posteriormente tratadas con NeuroEPO (100 ng) por 24 horas, las células fueron recogidas con buffer para western Blott (PBS con 0.3 M de sucrosa, más coctel inhibidor de proteasas), homogeneizadas y centrifugadas a 10.000 g por 10 min. El sobrenadante de los lisados celulares se recogió en tubos y, tras determinar su concentración de proteínas por medio del método Bradford (1976) usando un espectrofotómetro TECAN Quad4 Monochromators brochure - Infinite® 200 (Tecan® Group, Ltd) a 595 nm y fueron congeladas a -80 °C.

A partir de los homogeneizados obtenidos de células corticales cultivadas congelados previamente a -80 °C., se tomaron 15 μg de proteínas extraídas y se les adicionó un volumen de buffer Laemli SDS 1X (0,125 M Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 10% glicerol, 0,001% azul de

bromofenol y 5% 2-mercaptoetanol), correspondiente al 30% del volumen de la muestra, Para luego ser mezclada con tampón de carga SDS 1X (dodecyl sulfato de sodio) y calentada durante 5 min a 95°C. A continuación, las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida 8-15% (Acrilamida: N, N'-Metilene-bis-acrilamida, Cat. #161-0154; Bio-Rad Laboratories, USA) después de dejar enfriarlas. Paralelamente se cargó un marcador de peso molecular (rango 10-250 KDa; Cat. #161-0373, Bio-Rad, USA). La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 125V durante 2 h (Tampón de electroforesis: Tris 125 mM, Glicina 1,25 M, SDS 0.5%, pH 8.3) y posteriormente las proteínas del gel se transfirieron a una membrana de PVDF (Polyvinilidene fluoride) (Immobilon-P, poro 0,45 µm, Milipore, Bedford, MA, USA) durante una noche a 4°C y a un voltaje constante de 35 V (Tampón de transferencia: Tris 25 mM, Glicina 190 mM, Metanol 20%, pH 8.3). Con las membranas se aplicó el siguiente protocolo utilizando el tampón para lavados: TBS-T (Tris HCl 20 Mm, NaCl 150 Mm, 0.05% de Tween 20, Ph 7.6)

- TBS-T 3 lavados de 10 min
- Solución de bloqueo 5 % 2 h a temperatura ambiente
(leche descremada en polvo 5 - 10% en TBST)
- TBS-T 3 lavados de 10 min
- Anticuerpo primario diluido en TBST 2 horas o toda la noche a 4 ° C.
- TBS-T 3 lavados de 10 min
- Anticuerpo secundario diluido en Solución de Bloqueo 2 horas temp. ambiente
- TBS-T 3 lavados de 15 min
- Revelado:

Para revelar las membranas se utilizó un substrato de quimio-luminiscencia utilizando un kit comercial (Clarity® Western ECL Substrate de Bio Rad, Cat: #170-5060) al cual se expusieron las membranas por 5 min, tras lo cual se colocaron dentro de láminas plásticas transparentes y se introdujeron en la cámara oscura de un equipo fotográfico LAS-3000 Fujifilm® (Canadá), por un periodo entre 10 seg y 5 min para el revelado. Las señales inmunorreactivas se visualizaron mediante

el Luminescent Image Analyzer LAS-3000 Fujifilm® Canadá. Las bandas mostraron un patrón según el anticuerpo utilizado, fueron sometidas a análisis densitométrico que se realizó mediante el software Image-J Fiji Versión 2.0.0. (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Los valores encontrados de la proteína β -Actina fueron evaluados para cada membrana, y se utilizó como control de la cantidad de proteína utilizada por la técnica presentada. Las membranas que fueron reutilizadas pasaron por una solución de stripping (Restore Western Blot Stripping Buffer, Thermo Scientific, Alcobendas, Spain) e incubadas durante 15 min en agitación a temperatura ambiente.

Tabla: Anticuerpos y diluciones utilizadas para la realización de los Western blot

Primarios

anti-Actin	A2066-2ML, Sigma Aldrich*	1:250
anti-Bcl-2	sc-783, Santa Cruz *	1:200
anti-Citocromo-c	sc-13561, Santa Cruz *	1:80
anti-Bax	sc-493, Santa Cruz *	1:400
anti-Caspasas-3	sc-7148 Santa Cruz*	1:500
anti- NOS 1	sc-5302, Santa Cruz *	1:100
anti-NF-kB p65	sc-8008, Santa Cruz *	1:200
anti-Epo-R	sc-365662, Santa Cruz *	1:200
anti-JAK2	# 691R5, ThermoFisher Scientific [#]	1:2000
anti-P-JAK2	#44-426G, ThermoFisher Scientific [#]	1:500
anti-STAT5	sc-74442, Santa Cruz *	1:100
anti-P-STAT5	sc-81524, Santa Cruz *	1:100
anti-PI3-K	sc-8010, Santa Cruz *	1:100
anti-ERK ½	sc-514302, Santa Cruz *	1:100
anti-P-ERK	sc-7383, Santa Cruz *	1:100

anti-Akt	sc-5298, Santa Cruz *	1:200
anti-P-Akt1	sc-514032, Santa Cruz *	1:100

* Santa Cruz, Biotecnología, CA, EE. UU.

ThermoFisher Scientific, Invitrogen Bioservices India pvt ltd.

Secundarios

Goat Anti-rabbit IgG-HRP	111-035-003, Jackson Immuno Research	1:8.000-12.000
Goat Mouse IgG-h+I HRP	A090-116P, BETHYL laboratories	1:7.000
Rabbit Anti-Goat IgG-HRP	sc-2768, Santa Cruz Biotecnología	1:10.000

3.7 Inmunocitoquímica.

Las células cultivadas sobre cubreobjetos pre-tratados con Poli-D Lisina 9 DIV, se lavaron en PBS, se fijaron con Paraformaldehído al 4% en PBS (40 min a 4^a C) y luego de 3 lavados 3 con PBS fueron inmersas en solución crio-protectora que evitaba su congelación al ser puestas en congelador a – 80 ° C. hasta el momento de su procesamiento.

El día de ser procesadas, a las láminas cubre-objetos les fue aplicado el siguiente protocolo:

- PBS 3 lavados de 5 minutos
- PBS-Tritón X 100 al 0.1 % 3 lavados por 5 minutos
- Solución de Bloqueo * 30 minutos
- PBS-Tritón X 100 al 0.1 % 3 lavados por 5 minutos
- Anticuerpo Primario # Toda la noche a 4 ° C.
- PBS-Tritón X 100 al 0.1 % 3 lavados por 5 minutos
- Anticuerpo Secundario @ 1 hora temperatura del laboratorio

La pureza del cultivo se evaluó con la tinción MAP_2 que tiñe solamente neuronas (objetivo del estudio), y las diferencias de las células glía, que toman la tinción GFAP. La cromatina nuclear se evaluó con DAPI (dihidrocloreuro de 4'6-diamidino-2-fenilindol, Sigma Aldrich Inc. EE. UU.). DAPI es una molécula con la capacidad de intercalarse entre los pares de bases Adenina - ADN de timidina [49] y con luz de longitud de onda apropiada ($\lambda = 460$ nm), emite una fluorescencia azul brillante directamente proporcional a la cantidad de ADN presente.

La microscopía de fluorescencia se utilizó para realizar el recuento diferencial de las células, identificándolas por la morfología y la intensidad de fluorescencia del núcleo permitió evaluar la magnitud de la mortalidad celular. La cuantificación de núcleos apoptóticos y necróticos se realizó contando las células totales en cinco campos / portaobjetos, tres portaobjetos por tratamiento de $n = 3$ experimentos independientes, usando un microscopio confocal Leica (TCS-NT), (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Alemania), bajo un filtro de 460 nm, y después de digitalizarse, las imágenes se procesaron con el software Image-J 2.0. Los núcleos de células sanas se pueden diferenciar morfológicamente de los núcleos de células necróticas y apoptóticas según el tamaño del núcleo, la intensidad de la tinción y la presencia de fragmentación del ADN.

Tabla: Anticuerpos y diluciones utilizadas para la realización de inmunocitoquímica.

Primarios

Anti-MAP-2	NB600-1372*	1:200
Anti-GFAP	NB300-141*	1:1000

Secundarios

Anti-mouse	Conjugate DyLight 650	1: 1000
Anti-rabbit	Conjugate DyLight 488	1: 1000

* Novusbio Biotechnology

. Bethyl Laboratories Inc. TX, USA

3.8 Actividad de Caspasas-3.

Las soluciones de homogeneizados de las neuronas cultivadas de los diferentes grupos (control, glutamato 100 μ M/ 15 min y NeuroEPO 100ng/24 h posterior al glutamato) en el tampón de lisis provisto por el fabricante del ensayo, fueron usadas para medir la actividad de Caspasas-3 presente en cada grupo experimental.

El ensayo de actividad colorimétrica Caspasas-3 (Chemicon International Co. Cat. No. APT131) proporciona un medio sencillo y conveniente para analizar la actividad de las Caspasas-3. El ensayo se basa en la detección espectrofotométrica del cromoforo p-nitroanilina (pNA) después de la escisión del sustrato marcado DEVD-pNA (acetil-Asp-Glu-ValAsp p-nitroanilida, secuencia peptídica reconocida por las Caspasas-3). El pNA libre puede cuantificarse usando un espectrofotómetro o un lector de placas de microtitulación a 405 nm.

Protocolo de ensayo:

- Se preparan las muestras y reactivos en un aplaca de 96 pocillos, de acuerdo con la siguiente tabla provista por el fabricante del ensayo:

Sample	Assay Mixture				Caspase-3 Substrate	Total Volume
	5X Assay Buffer	Caspase-3 Sample	Inhibitor	DI H ₂ O		
Buffer Blank	20 μ L	0 μ L	0 μ L	80 μ L	0 μ L	100 μ L
Substrate Blank	20 μ L	0 μ L	0 μ L	70 μ L	10 μ L	100 μ L
Test Sample	20 μ L	X μ L	0 μ L	(70-X) μ L	10 μ L	100 μ L
Test Sample + Inhibitor (optional)	20 μ L	X μ L	Y μ L	70-(X+Y) μ L	10 μ L	100 μ L

- Se incuban las muestras durante 1-2 horas a 37 ° C.
- Se lee la absorbancia a 405 nm en un lector de placas de micro-titulación.
- Se extrapola el valor densidad óptica obtenido de las muestras, con la cantidad de μ M de las diluciones sucesivas estándar aplicando la fórmula de la ecuación generada por la recta patrón de pNA.

Los resultados se expresan como unidades de pNA (μM) La comparación de la absorbancia de pNA a partir de una muestra apoptótica con un control no inducido permite la determinación del aumento de la curva en la actividad de Caspasas-3.

Los valores de densidad óptica (DO) obtenidos con el kit de ensayo de actividad colorimétrica Caspasa-3 se pueden comparar con patrones conocidos u otras muestras de prueba para obtener actividades relativas.

3.9 Análisis estadístico

Para la comparación estadística se utilizó el programa estadístico SPSS17.0® (SPSS Ibérica, Madrid, España) para Windows. Se empleó un test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov para evidenciar la distribución normal de los valores medios de las muestras evaluadas. Fue utilizado el test paramétrico una vía ANOVA y el análisis post hoc usando el test de Bonferroni para la realización de los test de hipótesis de comparación entre los grupos. Fue considerado como significativo para la no aceptación de la hipótesis nula un valor de $p \leq 0.05$. Los resultados de los niveles de las proteínas evaluadas fueran expresados como media \pm error de la media (SEM). Para la comparación entre dos grupos fue aplicado el test t de Student. Por su parte, el estudio de la existencia de posibles correlaciones entre variables fue realizado mediante la prueba de Pearson.

4. Resultados

4. 1 Viabilidad / mortalidad neuronal tras exposición a glutamato y posterior tratamiento con NeuroEPO

4.1.1 Efecto de diferentes concentraciones de glutamato sobre la mortalidad celular. En experimentos preliminares, fue evaluado el efecto de exposición a diferentes concentraciones de glutamato (25-150 μM) durante 15 minutos sobre la mortalidad celular. Se cultivaron durante 9 días (DIV9), células corticales primarias de cerebro fetal de rata de 16-18 días de edad, en placas de 6 pocillos (10^6 células / pocillo) y luego se expusieron a una de las diferentes concentraciones de glutamato (25, 50, 100 y 50 μM) o sin ella (control) durante 15 minutos. Fue retirado el medio de cultivo que contenía glutamato y reemplazado por medio de cultivo basal para neuronas. Luego de 24 horas de recuperación, se recogieron y lisaron mecánicamente las células. El efecto neurotóxico del glutamato fue evaluado usando el ensayo de LDH (lactato-deshidrogenasa). Se verificó que, a medida que aumenta la concentración de glutamato presente en el medio de cultivo, la muerte celular también aumenta progresivamente (Fig. 6). Se encontró que una mortalidad entre el 40 – 60 % se produce con una concentración de glutamato añadida al medio de 100 μM . Con base en estos datos preliminares, todos los experimentos posteriores se llevaron a cabo a concentraciones similares de glutamato durante un periodo de exposición de 15 minutos.

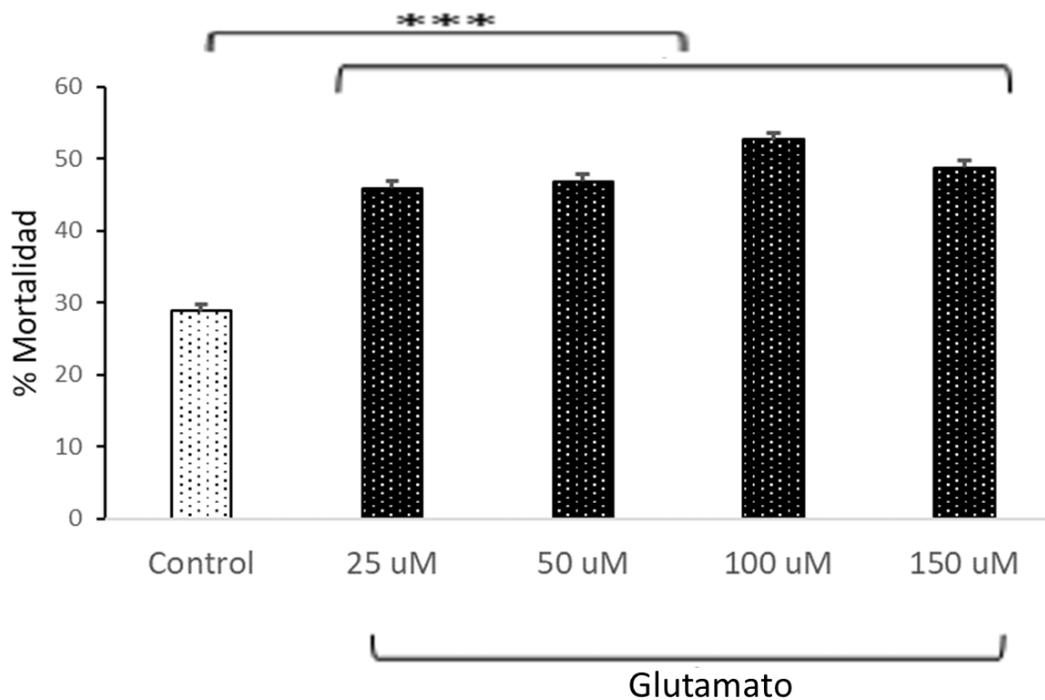


Fig. 6. La mortalidad celular, tras agregar glutamato a distintas concentraciones a los cultivos, se midió después de 24 h de recuperación. El glutamato causa un aumento significativo de la mortalidad en una magnitud dosis dependiente. La mortalidad se expresa como la media (\pm SEM) de tres experimentos independientes ($n = 3$); **** $p < 0.005$ (0-150 μ M) en comparación con las células de control.

4.1.2. Efecto de NeuroEPO sobre la viabilidad celular. En otro experimento, se trató a las células a diferentes dosis de NeuroEPO (10 a 100 ng/ml) agregadas al medio de cultivo neuronal y se valoró su viabilidad celular con el método MTT después de 24 horas de recuperación. La viabilidad celular se mantuvo entre 86.7 % a 90.3 % del control, agregando NeuroEPO al cultivo y permitiendo una recuperación de 24 h antes de determinar la viabilidad. NeuroEPO no causa efectos deletéreos sobre las neuronas cultivadas (NO existe diferencia estadísticamente significativa en la viabilidad celular al añadir NeuroEPO en cualquier proporción al medio respecto al control) (Fig. 7).

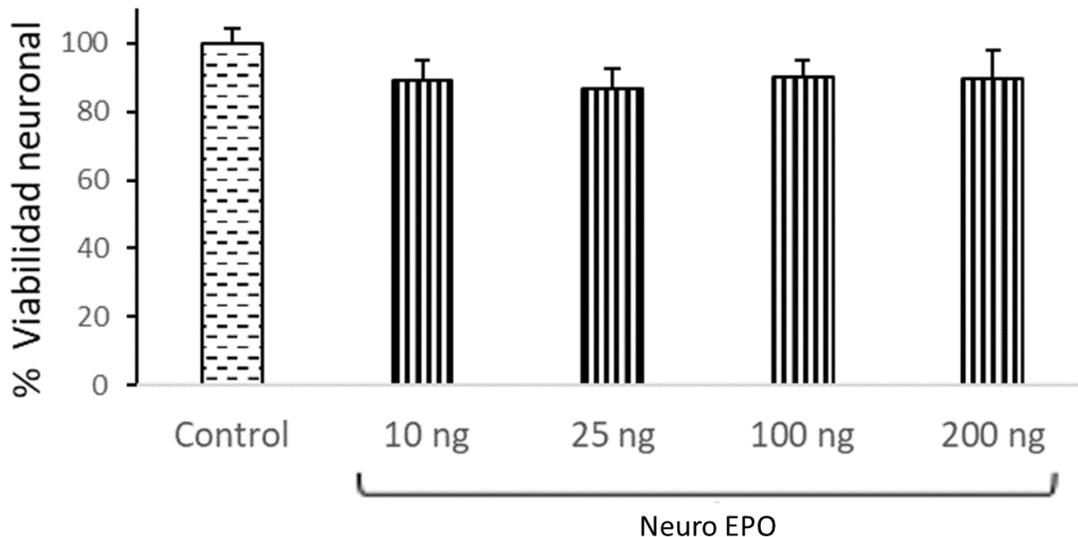


Fig. 7 La viabilidad neuronal no se ve afectada, luego de añadir diferentes dosis de NeuroEPO a los cultivos. Determinada mediante el ensayo MTT y expresada como la media (\pm SEM) de tres experimentos ($n = 3$).

4.1.3. Efecto de NeuroEPO sobre la viabilidad neuronal cortical, tras la exposición a glutamato.

Para examinar la capacidad del NeuroEPO de proteger contra la excitotoxicidad inducida por glutamato, las células corticales se expusieron a glutamato ($100 \mu\text{M}$) durante 15 minutos, seguido de tratamiento con diferentes concentraciones de NeuroEPO ($10\text{-}150 \text{ ng / ml}$) durante 24 h. La viabilidad celular se midió usando el ensayo MTT. Los resultados indican que la exposición al glutamato induce una disminución significativa en la viabilidad celular (60%) en comparación con las células de control no tratadas. El tratamiento posterior con NeuroEPO indujo una notable recuperación de la viabilidad después de la muerte neuronal inducida por glutamato. El efecto protector de NeuroEPO parece ser similar para las diferentes concentraciones de NeuroEPO estudiadas aquí (Fig. 8).

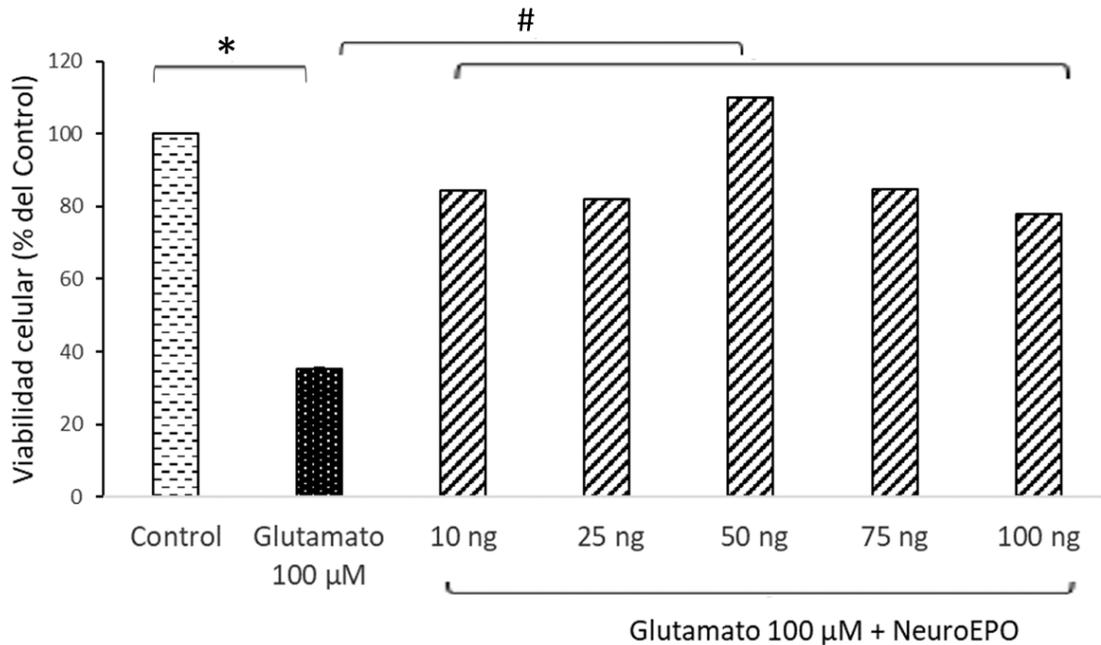


Fig. 8. Efecto neuroprotector de NeuroEPO contra la mortalidad neuronal inducida por glutamato. El glutamato induce una pérdida significativa de la viabilidad de las neuronas en comparación con la de las neuronas control. El tratamiento con NeuroEPO significativamente aumenta la viabilidad celular previamente reducida por el glutamato. Los resultados se expresan en porcentajes, considerando el control como 100% y se expresan como la media \pm SEM de $n = 3$ experimentos independientes; * $p \leq 0.005$; # $p \leq 0.005$.

4.2 Efectos protectores del Neuro-Epo contra la excitotoxicidad del glutamato: análisis citológico

4.2.1 Efecto de NeuroEPO sobre los cambios morfológicos inducidos por la excitotoxicidad del glutamato en el cultivo neuronal. El análisis utilizando microscopía de contraste de fase indicó que la exposición al glutamato (100 µM por 15 min) causa cambios morfológicos en las neuronas DIV9, luego de 24 h de recuperación y que el tratamiento posterior con NeuroEPO tiende a restaurar la morfología pareciéndose a la de las neuronas no expuestas a excitotoxicidad (control). Las imágenes, muestran que las células se observan grandes, con procesos celulares gruesos y abundantes que están conectados a las células vecinas (Fig. 9A). La exposición a glutamato, revela un deterioro evidente de la condición morfológica del cultivo, que se caracteriza por la presencia de células pequeñas retraídas con extensiones finas o sin extensiones que ya no están en contacto con otras células. (Fig. 9B). El efecto protector de NeuroEPO se manifiesta por una tendencia a reproducir las condiciones observadas en el control, y aunque se aprecian todavía algunas células retraídas, con procesos

dendríticos cortos, se observan muchas células grandes que restablecen las conexiones con las neuronas vecinas (Fig. 9C).

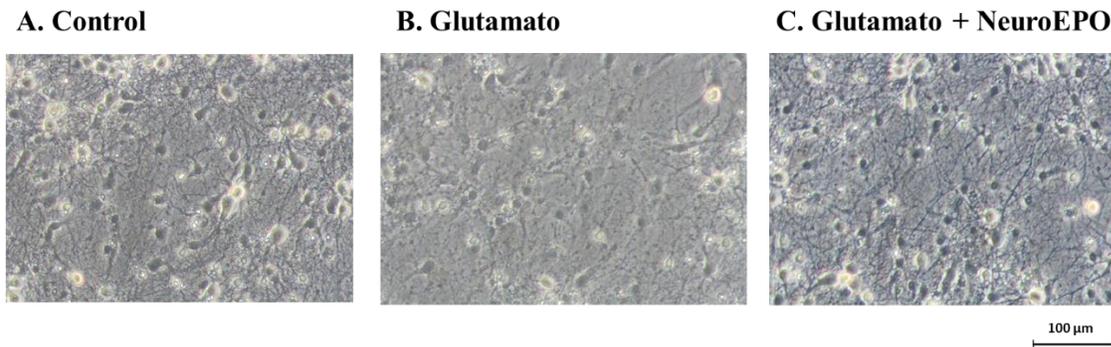


Fig. 9. Efecto neuroprotector de NeuroEPO en cultivos de neuronas corticales (A) Control, (B) células expuestas a glutamato y (C) neuronas corticales expuestas a glutamato, seguidas de 24 horas en medio con NeuroEPO. Fotomicrografías 20 X en microscopio de contraste de fase de las neuronas corticales 9 DIV mantenidas con medio Neurobasal. Barra de escala 100 µm.

4.2.2 Análisis inmunocitoquímico de las células expuestas a neurotoxicidad por glutamato y las tratadas posteriormente con NeuroEPO. Mediante el uso de inmuno-tinción neuronal (MAP-2) y astrocítica (GFAP), conseguimos que la inhibición de la proliferación glial por arabinoside citocide (Ara-C), conduce a cultivos virtualmente puros en neuronas con alguna insignificante cantidad de células gliales (Fig. 10A). en adición, el tratamiento con glutamato mostró una disminución en el número de neuronas que confirma que la excitotoxicidad causa muerte neuronal (figura 10B) y que esto logra parcialmente ser evitado al agregar NeuroEPO al medio de cultivo inmediatamente después de la exposición al glutamato y permitir una recuperación de 24 horas (figura 10C).

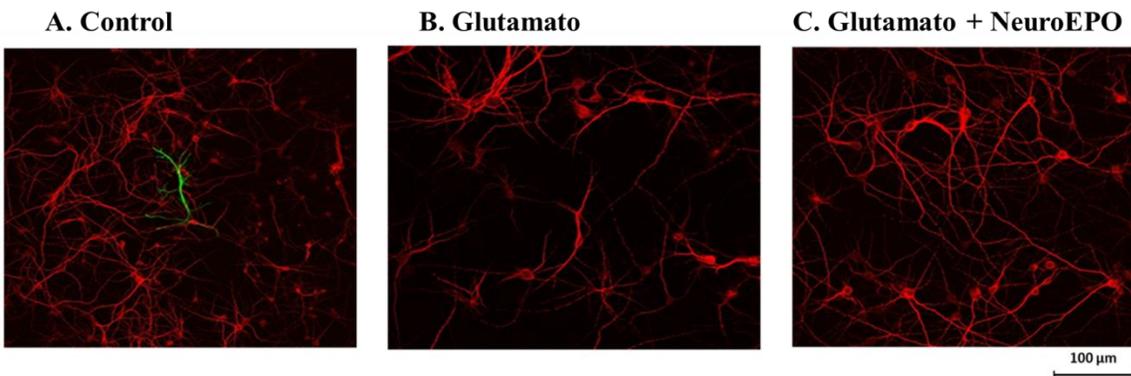


Fig. 10. Caracterización de cultivos de neuronas corticales. Expresión por inmunocitoquímica de la proteína marcadora neuronal MAP-2 (fluorescencia roja) frente a la expresión de la proteína glial GFAP (fluorescencia verde) en cultivos de DIV9. La tinción para el marcador neuronal, MAP2, mostró la presencia de neuronas en el cultivo. El marcador glial, GFAP, revela que solo un número muy

pequeño de células de glía estaba presente. Se observó además el efecto de la exposición a glutamato y del posterior tratamiento con NeuroEPO. (A) Células no expuestas al glutamato, (B) Células expuestas al glutamato 100 μ M durante 15 minutos y (C) Células expuestas al glutamato 100 μ M durante 15 minutos seguido del tratamiento con NeuroEPO 100 ng / ml. Barra de escala, 100 μ m.

4.2.3. Tinción por inmuno-fluorescencia de neuronas y núcleos en células corticales expuestas al glutamato seguido del tratamiento con NeuroEPO. La excitotoxicidad del glutamato puede causar muerte neuronal tanto por necrosis como por apoptosis, dependiendo de la intensidad y duración del insulto excitotóxico. La muerte debida a la necrosis se asocia con una estimulación intensa y es una muerte temprana que dificulta el logro de una terapia eficaz. La apoptosis en cambio, ocurre cuando el insulto es menos intenso u ocurre durante menor tiempo. Usando MAP-2 demostramos que, en comparación con el control (Fig. 6A, 1), el glutamato causaba destrucción de células neuronales (Fig. 6A, 2). El tratamiento con NeuroEPO añadido después del glutamato, protegió las células de la muerte neuronal inducida por glutamato (Fig. 11A, 3). Usando la tinción nuclear DAPI encontramos que, en comparación con el control (Fig. 11A, 4), el glutamato aumentó el número de núcleos picnóticos en los que se observó una reducción en su tamaño, condensación de ADN y una mayor intensidad de tinción (Fig. 11A, 5). NeuroEPO redujo el número de núcleos con picnosis inducida por glutamato (Fig. 11A 6). La Tabla I muestra el número de fotomicrografías de núcleos por grupo y los datos numéricos resultantes del recuento de cada fotomicrografía. Los datos con la media \pm S.E.M. n=5, se muestran en la Fig. 11C.

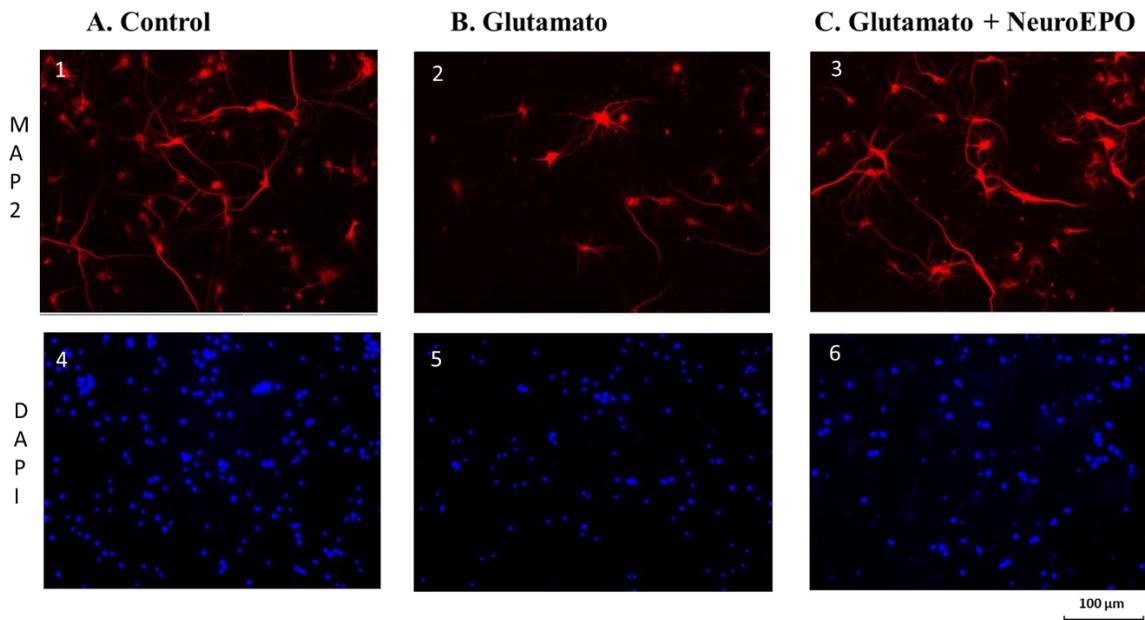


Fig.11A. Los cultivos neuronales DIV9 se fijaron, permeabilizaron y tiñeron con el antígeno neuronal anti MAP2 (imágenes 1-3), los núcleos celulares se marcaron con tinción nuclear DAPI (imágenes 4 - 6) y se examinaron mediante microscopía confocal. (1 y 4) Controles fotografiados 24 h después del procedimiento experimental; (2 y 5) Los cultivos fueron expuestos a glutamato 100 μ M durante 5 minutos y posteriormente se volvieron a incubar en su medio de cultivo original durante 24 h; (3 y 6) cultivo expuesto a glutamato 100 μ M durante 5 minutos y sustituido por medio basal para neuronas que contiene 100 ng / ml de NeuroEPO. Barra de escala 100 μ m.

Medición del área total neuronal (equivalente a % de viabilidad). Viabilidad neuronal calculada con el software Image-J 2.0.0 Fiji, mediante la medición digital de las áreas ocupadas por las células en los campos observados y fotografiados, correspondientes a la figura 11A (1, 2, y 3). En total se midieron las áreas celulares de 8 fotografías de cada grupo experimental de los campos observados por microscopía confocal de tres experimentos independientes. Los datos fueron estandarizados tomando al control como 100 % de viabilidad celular. La viabilidad neuronal se reduce a 40 % cuando se somete a las neuronas a 100 μ M durante 5 minutos. Esta reducción es prevenida al tratar con 100 ng / ml de medio a las células previamente expuestas al glutamato y permitirles una recuperación de 24 horas.

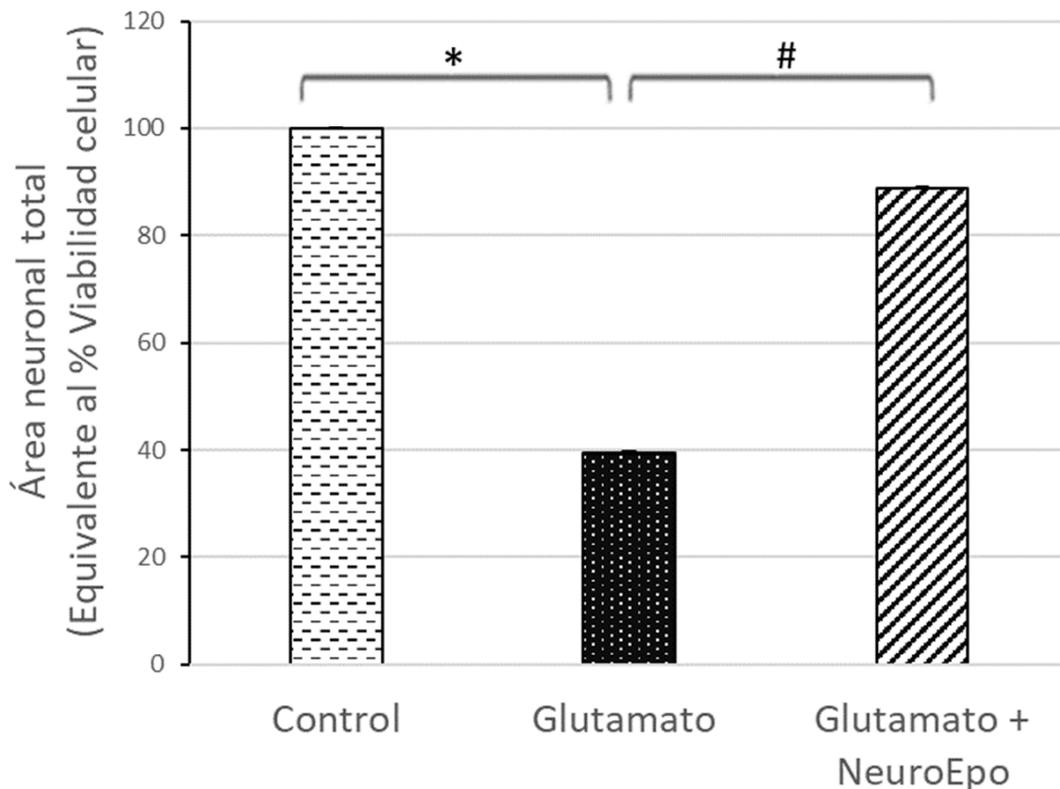


Fig. 11B. El glutamato induce la muerte de las células corticales. Datos obtenidos de (A, 1-3), mediante el cálculo de las áreas ocupadas por las células en los campos fotografiados (8 fotografías distintas por condición) y después de la digitación y procesamiento hechos con el software Image-J 2.0. Los datos se estandarizaron en relación con los no tratados (tomando como 100% de viabilidad celular a los controles). La exposición al glutamato provocó un descenso significativo de la viabilidad neuronal, mientras que NeuroEPO atenuó la pérdida de viabilidad inducida por el glutamato. Los datos son los valores medios \pm SEM de $n = 3$ experimentos independientes Vs control *: $P \leq 0.001$; Vs glutamato #: $P \leq 0.001$.

4.2.4 Apoptosis inducida por glutamato y efecto mitigado por NeuroEPO en cultivo primario de células corticales. Por medio del recuento de los núcleos teñidos con DAPI en la preparación Inmunocitoquímica, se ha logrado establecer que la exposición a glutamato ocasiona muerte neuronal mediante apoptosis y que la viabilidad celular, entendida como la presencia de núcleos saludables, se protege al menos parcialmente, tras un tratamiento con NeuroEPO.

Analizadas en conjunto, las figuras 11B y 11C, evidencian que la mortalidad ocasionada por el glutamato mediante excitotoxicidad, se debe al fenómeno de apoptosis, la cual es mitigada parcialmente por NeuroEPO lo cual aumenta significativamente la viabilidad celular.

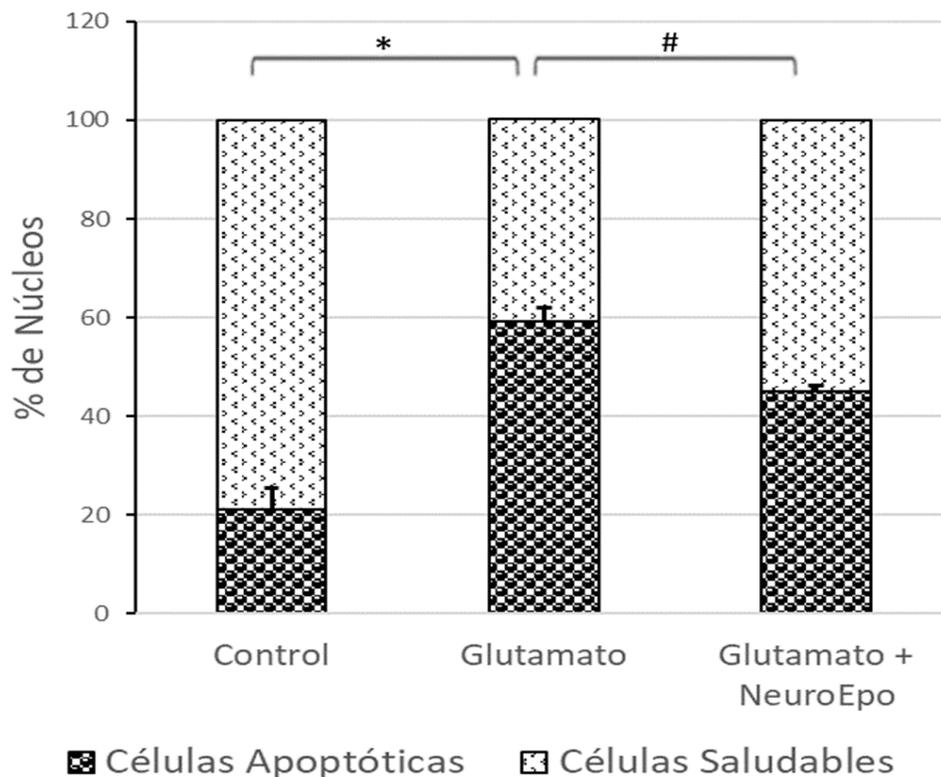


Fig. 11C. Apoptosis inducida por glutamato y efecto mitigado por NeuroEPO en cultivo primario de células corticales. Los histogramas muestran la relación, expresada como % de núcleos sanos y núcleos apoptóticos en cada grupo. n = 5, El tratamiento con glutamato aumentó el % de núcleos apoptóticos en comparación con las células de control (* p <0,05); el tratamiento con glutamato + NeuroEPO redujo significativamente la apoptosis (%) Vs el grupo Glutamato (# p <0.05).

4.3 Estrés oxidativo tras la exposición a glutamato y el posterior tratamiento con NeuroEPO.

4.3.1. *Efecto de NeuroEPO sobre el estrés oxidativo en células corticales primarias tratadas con glutamato.* Para detectar la presencia de estrés oxidativo, las células corticales cultivadas en placas de 6 pocillos (10^6 células / pocillo) durante DIV9, se expusieron a glutamato (100 μ M) durante 15 minutos, seguido de tratamiento con concentraciones de NeuroEPO (50 ng / ml y 100 ng / ml) durante 24 h. El estrés oxidativo se analizó midiendo la actividad oxidante y antioxidante en células corticales que no fueron tratadas, tratadas solo con glutamato o tratadas con glutamato y NeuroEPO. Los resultados muestran que no hay diferencias significativas en la actividad antioxidante entre las células tratadas con glutamato y las células de control no tratadas; mientras que el tratamiento con NeuroEPO induce un aumento significativo (p <0,001) en la actividad antioxidante, en comparación con las células control no tratadas, y que el aumento en la actividad antioxidante fue dependiente de la concentración de NeuroEPO (Fig. 12).

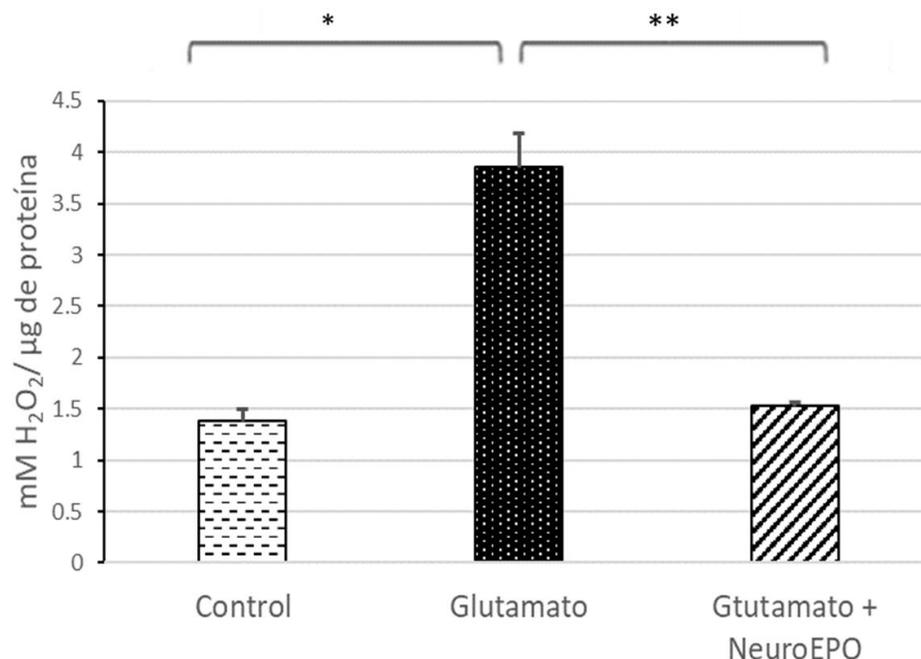


Fig. 12. Actividad oxidante total ROS/RNS. Concentración mM de H₂O₂ presentes por µg de proteína en las muestras de los grupos experimentales. Se cultivaron células corticales de cerebro fetal de rata de 16 - 18 días de edad por DIV9 y se trataron con glutamato 100 µM durante 15 minutos. Después de este tiempo, el medio de glutamato fue reemplazado por medio basal para neuronas con o sin NeuroEPO (100 ng / ml) durante 24 h. La actividad oxidante total ROS/RNS se determinó usando el kit de ensayo ROS / RNS in vitro (Oxiselect® STA-347). Los datos corresponden a la media ± SEM de n = 3 experimentos independientes; * p ≤ 0.005 Glutamate Vs Control; ** p ≤ 0.005 Glutamate + NeuroEPO Vs Glutamate.

La medición de la actividad antioxidante total (Fig. 13) mediante la determinación de equivalentes de ácido úrico, muestra que el tratamiento con glutamato no modifica significativamente los niveles de actividad antioxidante en comparación con el control y en cambio, esto sí sucede cuando las neuronas, después de su exposición a glutamato. Las neuronas son tratadas con NeuroEpo, que induce un aumento significativo en la actividad antioxidante dependiente de la concentración añadida al medio.

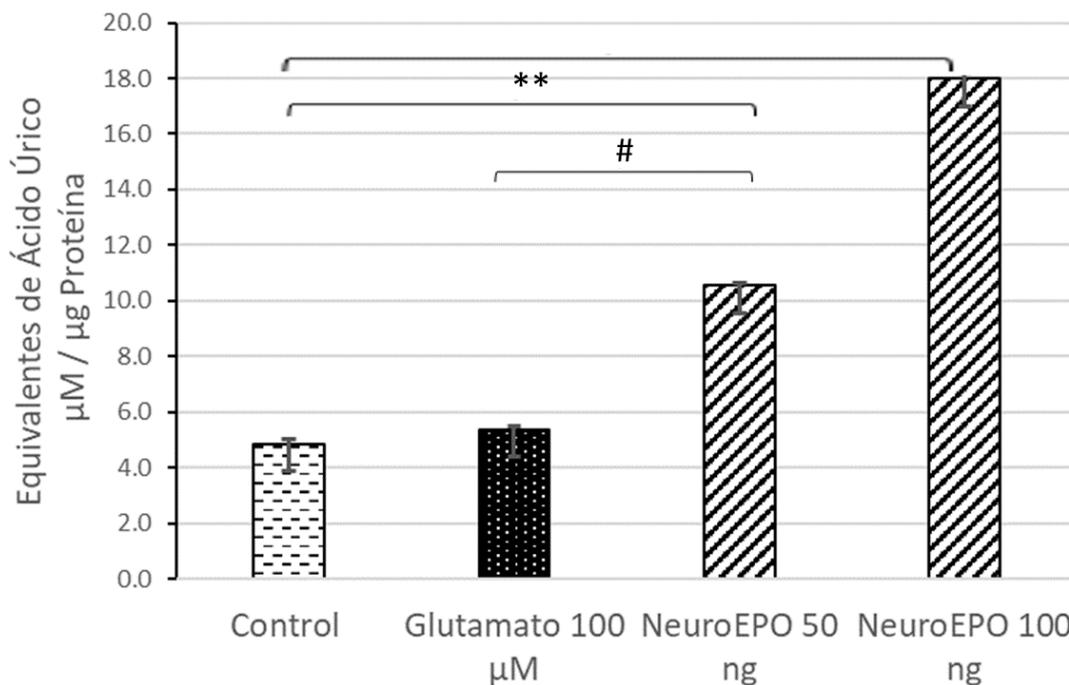


Figura 13. Actividad antioxidante total. Células corticales tratadas con glutamato 100 µM durante 15 minutos sin o con neuroEPO (50 ng/mL o 100 ng/mL) durante 24 h. El tratamiento con glutamato no modifica significativamente los niveles de actividad antioxidante en comparación con los niveles de actividad antioxidante de las células no tratadas con glutamato (control). NeuroEpo induce un aumento significativo (p < 0.001) en la actividad antioxidante, que depende de la concentración de neuroEpo, en comparación tanto en las células tratadas con glutamato y en las células no tratadas (control). Los datos son los valores medios ± SEM de 3 experimentos independientes. Glutamate + NeuroEPO 100 ng Vs Control * p ≤ 0.001; Glutamate + NeuroEPO 50 ng Vs Control ** p ≤ 0.005; Glutamate + NeuroEPO 50 ng Vs Glutamate 100 µM # p ≤ 0.001.

4.4 Efecto protector de NeuroEPO contra la excitotoxicidad del glutamato: análisis bioquímico

4.4.1 Expresión de proteínas antiapoptóticas (Bcl-2) y apoptóticas (Bax) inducidas por excitotoxicidad de glutamato en neuronas corticales de rata. Junto con el estrés oxidativo, la activación de la vía apoptótica mitocondrial es otro mecanismo que desempeña un papel importante en la muerte neuronal inducida por la excitotoxicidad del glutamato. La permeabilización de la membrana mitocondrial externa se considera como "el punto de no retorno", que irreversiblemente conduce a la muerte celular. Una manera indirecta de determinar las alteraciones en la membrana mitocondrial externa se logra mediante la evaluación de los niveles de proteínas involucradas en la membrana mitocondrial.

Uno de los principales mecanismos aceptados de permeabilización de la membrana mitocondrial es la formación de poros por las proteínas Bax y Bak, que se encuentran en el citosol y en la membrana mitocondrial externa, respectivamente. Cuando estas dos proteínas se activan por un estímulo apoptótico, en nuestro caso por excitotoxicidad del glutamato, Bax se transloca del citosol a la mitocondria y forma un poro en la membrana externa, solo o junto con Bak, que permite la liberación del citocromo c. Esta acción en situaciones fisiológicas es inhibida por proteínas anti-apoptóticas, principalmente por Bcl-2, que también se encuentra en las mitocondrias.

4.4.1.1 Expresión de proteínas anti-apoptóticas Bcl-2. Las rutas apoptóticas intrínsecas se evaluaron usando la expresión de Bcl-2 (Fig. 14). Los resultados de nuestra investigación muestran que la exposición de las neuronas al glutamato disminuyó significativamente (* $p \leq 0,05$) la expresión de Bcl-2 en comparación con el control ($0,60 \pm 0,07$) frente a ($1,09 \pm 0,08$). El tratamiento con NeuroEPO para el cultivo de neuronas pre-tratadas con glutamato significativamente (# $p \leq 0,05$) reduce la disminución de Bcl-2 ($1,23 \pm 0,11$).

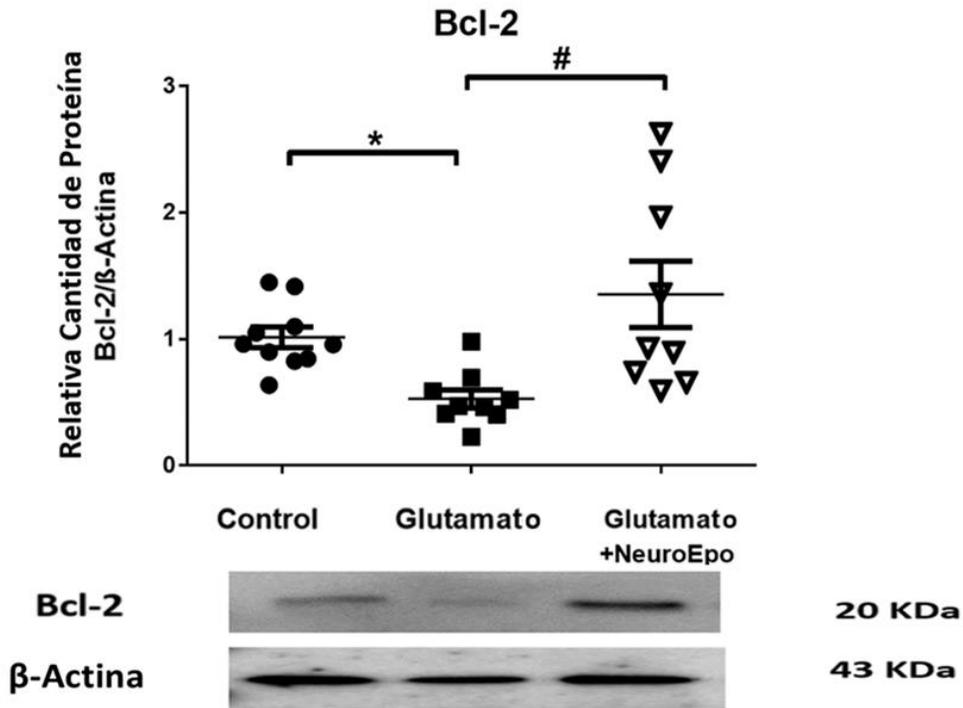


Fig.14. Expresión de proteínas antiapoptóticas (Bcl-2) inducidas por excitotoxicidad de glutamato y neuroprotección de NeuroEPO en neuronas corticales de rata. Las neuronas corticales se trataron con glutamato 100 μ M durante 5 minutos sin o con NeuroEPO (100 ng / ml) durante 24 horas y con NeuroEPO solo. Western blots con homogeneizados de control de neuronas corticales, tratados con glutamato, tratados con glutamato más NeuroEPO y tratados con NeuroEPO solo. Los datos son medias \pm valores SEM (n = 3 muestras diferentes / grupo de tres experimentos independientes). El tratamiento con glutamato disminuyó la expresión de Bcl-2 en comparación con las células de control (* p <0,05); el tratamiento con glutamato y NeuroEPO se redujo significativamente (# p <0.05). la disminución en Bcl-2 causada por el glutamato. NeuroEPO solo indujo un aumento significativo de la expresión de Bcl-2 en comparación con el control.

4.4.1.2 *Expresión de proteínas pro-apoptóticas Bax.* El tratamiento con glutamato indujo un aumento significativo (* p \leq 0,05) en la expresión de Bax en comparación con la expresión de neuronas no tratadas (control) (1,48 \pm 0,15) Vs (1,08 \pm 0,05) (figura 15). El tratamiento posterior con NeuroEPO redujo significativamente (#p \leq 0,01) el aumento en la expresión de Bax inducida por glutamato solo.

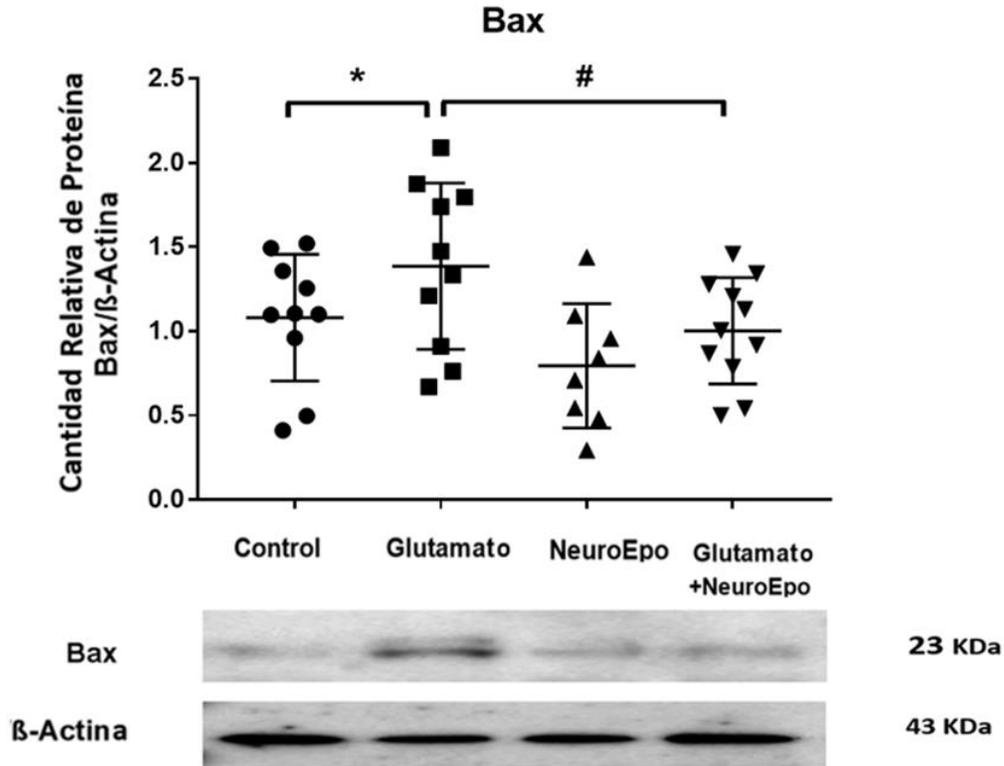


Fig. 15. Expresión de proteínas antiapoptóticas (Bcl-2) inducidas por excitotoxicidad de glutamato y neuroprotección de NeuroEPO en neuronas corticales de rata. Las neuronas corticales se trataron con glutamato 100 μ M durante 5 minutos sin o con NeuroEPO (100 ng / ml) durante 24 horas y con NeuroEPO solo. Western blots con homogeneizados de control de neuronas corticales, tratados con glutamato, tratados con glutamato más NeuroEPO y tratados con NeuroEPO solo. Los datos son medias \pm valores SEM (n = 3 muestras diferentes / grupo de tres experimentos independientes). El tratamiento con glutamato aumentó la expresión de Bax en comparación con las células de control (* p <0,05); el tratamiento con glutamato más NeuroEPO redujo significativamente (# p <0,05) el efecto causado por el glutamato. NeuroEPO solo no tuvo un efecto significativo en comparación con el control.

4.4.1.3 *Relación Bcl-2 / Bax*. En comparación con el control, una disminución significativa (* p \leq 0,05) en la relación Bcl-2 / Bax fue inducida por la excitotoxicidad del glutamato (0,60 \pm 0,22) frente a (1,08 \pm 0,27), que se normalizó con el tratamiento NeuroEPO (1,22 \pm 0,37) vs (1,08 \pm 0,27) (Fig. 16). El tratamiento con NeuroEPO solo aumentó significativamente la relación Bcl-2 / Bax en comparación con las células no tratadas.

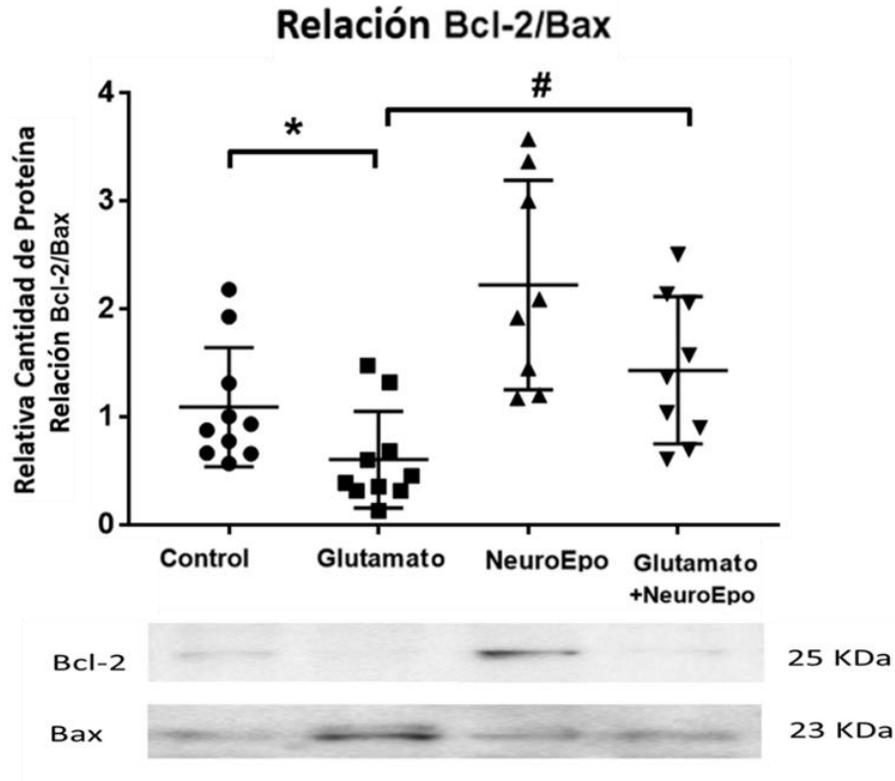


Fig. 16. Efecto de la excitotoxicidad del glutamato sobre la relación Bcl-2 / Bax. El tratamiento con glutamato redujo significativamente el Bcl-2 / Bax en comparación con el grupo de control no tratado ($p < 0,001$); el tratamiento posterior con NeuroEPO reduce el efecto del glutamato manteniendo la relación Bcl-2 / Bax similar al nivel de las células de control. El tratamiento con solo NeuroEPO aumentó significativamente la relación Bcl-2 / Bax en comparación con las células no tratadas.

4.4.2 Expresión de proteínas pro-apoptóticas (Citocromo-C y Caspasas-3) inducidas por excitotoxicidad de glutamato en neuronas corticales de rata.

4.4.2.1 Liberación de citocromo c en el citoplasma de las neuronas corticales. La consecuencia de la alteración de la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa es la liberación de la proteína Citocromo-c al citosol, donde activa la señalización de la cascada de apoptosis. Los resultados mostraron que el tratamiento con glutamato indujo un aumento significativo ($* p \leq 0.05$) de los niveles de Citocromo-c en el citosol en comparación con los niveles observados en el cultivo control (1.54 ± 0.20) frente a (0.95 ± 0.19) (Fig. 17). El tratamiento posterior con NeuroEPO durante 24 h causó una reducción significativa en los niveles de Citocromo-c en el citosol en comparación con los niveles observados en las células expuestas solo al glutamato.

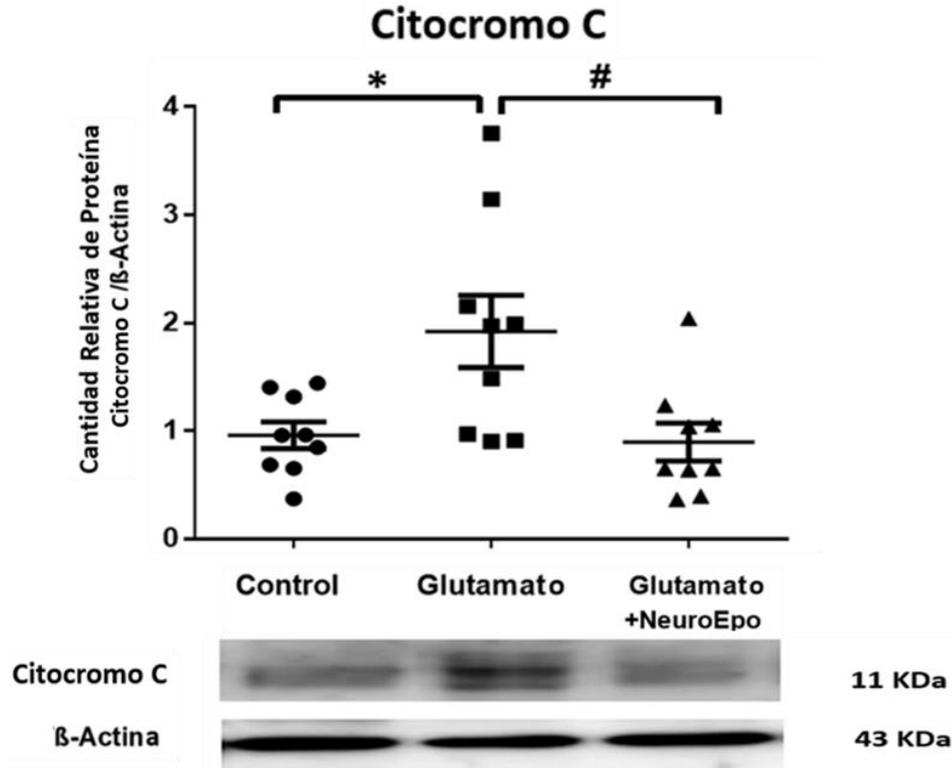


Fig.17. Las neuronas corticales se trataron con glutamato 100 μ M durante 5 minutos, seguidas de NeuroEPO (100 ng / ml) o sin él durante 24 h. Los niveles del Citocromo-c se evaluaron mediante el análisis de los datos obtenidos de las transferencias de Western Blott. El glutamato indujo aumentos significativos del Citocromo-c, mientras que el tratamiento con NeuroEPO previno el aumento del Citocromo-c inducido por el glutamato. Los datos son medias \pm valores SEM (n = 3 experimentos independientes). * p <0.05 en comparación con el control, y # p <0.001 en comparación con el glutamato.

4.4.2.2 *El glutamato aumenta la expresión de Caspasas-3.* Se analizó la actividad y expresión de caspasa-3. Se considera que un aumento significativo de la actividad de caspasa-3 es el principal efector de la vía que conduce a la muerte apoptótica de la neurona. La evaluación de la expresión de Caspasas-3 mostró un aumento significativo (* p \leq 0.001) en la expresión de la proteína en células expuestas a glutamato en comparación con células no tratadas (control) (2.21 ± 0.20) frente a (0.99 ± 0.07) respectivamente. La presencia de NeuroEPO después del tratamiento con glutamato redujo significativamente la expresión de Caspasas-3 en comparación con los niveles observados en células tratadas solo con glutamato ($1,82 \pm 0,17$) frente a ($2,21 \pm 0,20$) respectivamente (Fig. 18). NeuroEPO redujo la expresión de Caspasas-3 en comparación con las células expuestas al glutamato.

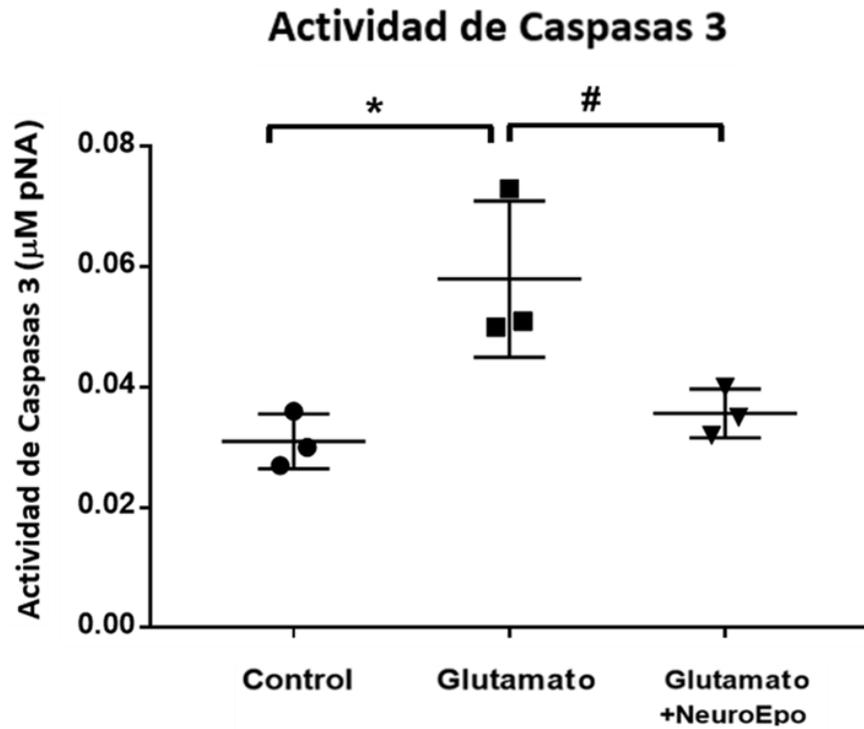


Fig. 19. Las neuronas corticales se trataron con glutamato 100 μM durante 5 minutos, seguidas de NeuroEPO (100 ng / ml) o sin él durante 24 h. El glutamato indujo un aumento significativo de la actividad de la Caspasas-3, mientras que el tratamiento con NeuroEPO evitó el aumento de la actividad de la proteína inducida por el glutamato. La actividad de Caspasas-3 se valoró usando un ensayo colorimétrico. Los datos expresan la formación de pNA, significa \pm SEM (n = 3, * p < 0.05).

5. Discusión

Dentro de nuestro modelo de experimentación, ha sido importante determinar la concentración y tiempo de exposición a glutamato adecuada para conseguir cultivos con una mortalidad entre el 40-60 %, que permitiera tener diferencias significativas en la viabilidad entre cultivos no tratados (Control) y los tratados con glutamato como mecanismo de inducir excitotoxicidad. En la literatura hay abundantes estudios sobre la concentración de glutamato y el tiempo de exposición con datos claramente diferentes, que van desde experimentos que aplican concentraciones de 25 μM a 100 μM (Choi et al., 1987; Cheung et al., 1998; Vaarmann et al., 2013) o de 3 μM a 3 mM (Ankarcrona et al., 1995) estudios que utilizan concentraciones de glutamato entre 0,2 mM a 100 mM (Zhang & Bhavnani, 2005). Nuestros resultados están de acuerdo con algunos de estos estudios (Choi et al., 1987; Ankarcrona et al., 1995; Cheung et al., 1998; Vaarmann et al., 2013), observando que la exposición de las neuronas a 100 μM de glutamato durante 15 min seguido de la retirada del glutamato y añadiendo medio basal durante 24 h, causa un aumento significativo de la mortalidad neuronal. Aunque existe una vulnerabilidad selectiva al glutamato (Wang & Michaelis, 2010) en los experimentos realizados a lo largo de la Tesis, exposiciones con concentraciones de glutamato superiores a 150 μM y 15 minutos de exposición causan una mortalidad por encima del 80% comparados con el control. Como se indica en el esquema experimental (Fig. 1), en la mayor parte de los experimentos, para inducir excitotoxicidad, añadimos 100 μM de glutamato durante 15 min.

También ha sido importante para definir la concentración adecuada de NeuroEPO para determinar el efecto protector de la proteína sobre la mortalidad inducida por el glutamato. Neuronas expuestas a 100 μM de glutamato durante 15 min, después de 24 h muestran una disminución de la viabilidad inferior al 40 % con relación a al control. El tratamiento con NeuroEPO mitigaba la disminución de la viabilidad a niveles del 80% con relación al control. Dentro del rango de 10 a 100 ng de NeuroEPO por ml de medio añadido al cultivo, no hay diferencias significativas en la viabilidad entre las diferentes concentraciones de NeuroEPO. Parece que la exposición de neuronas a NeuroEPO causa una reducción de la viabilidad que no es significativa pero observa una tendencia a causar una disminución de la viabilidad de las neuronas. Hay estudios que exponen los cultivos a 50 μM de glutamato durante 5 min y otros que hacen exposiciones de 100 μM durante 30 min o más. Nosotros medimos el efecto de exposiciones de 25, 50, 100 y 150 μM durante 15 min y valoramos la viabilidad a las 24 h. La viabilidad, medida como % de la LDH liberada al medio, mostraba que la

concentración de glutamato 25 μM ya causa un daño significativo sobre la viabilidad comparada con el control y la viabilidad disminuía con el aumento de la concentración de glutamato, con valores de viabilidad del 50 %. Después de repetir varias veces el experimento la concentración y tiempo de exposición a glutamato fijamos usar una concentración 100 μM de glutamato durante 15 min como modelo de excitotoxicidad.

Junto con la alta mortalidad, la observación microscópica utilizando microscopía de contraste de fase muestra que la exposición al glutamato causa cambios morfológicos en las neuronas (Choi, 1988; Greenwood, & Connolly, 2007). Observamos la presencia de inflamación focalizada del cuerpo de la neurona con una disminución en la longitud de las dendritas y la consiguiente pérdida de sinapsis. Descubrimos que NeuroEPO protege la supervivencia del cultivo primario de células corticales de la muerte inducida por glutamato. Observamos una disminución en la longitud y el número de dendritas en cultivos expuestos a glutamato, como se ha informado en estudios previos (Garzón, et al 2018 (a); Greenwood, & Connolly, 2007). Por el contrario, el tratamiento con NeuroEPO, después de la exposición de las neuronas al glutamato, mitiga los cambios morfológicos inducidos por el glutamato. También encontramos modificaciones en el contenido y distribución del ADN de las neuronas expuestas al glutamato. Encontramos un mayor número de núcleos con condensación de la cromatina en las células expuestas al glutamato, mientras que el tratamiento con NeuroEPO reduce el número de núcleos con condensación de cromatina. Los cambios morfológicos junto con las alteraciones en el ADN nuclear son ampliamente aceptados como indicativos de muerte apoptótica y necrótica (Cheung et al., 1998; Zhang, & Bhavnani. 2005). Dado que los resultados presentados aquí se han obtenido en cultivos enriquecidos en neuronas como se demostró mediante la expresión de MAP-2 y la muy baja expresión de GFAP, nuestros resultados muestran que NeuroEPO puede ejercer su acción neuroprotectora actuando directamente sobre las neuronas. Tomados en conjunto, estos datos indican que la excitotoxicidad del glutamato induce cambios morfológicos, aumenta la muerte neuronal y la apoptosis en el cultivo de células corticales y que NeuroEPO atenúa significativamente los efectos neurotóxicos provocados por la excitotoxicidad.

Los mecanismos excitotóxicos que causan la muerte de la neurona son complejos, pero principalmente incluyen el aumento en la generación de radicales libres, la alteración en las funciones mitocondriales (Shinder, et el., 1996; Nicholls & Budd. 1998; Nguyen et al., 2011) y la participación

de varios factores de transcripción como activadores de la expresión de genes (Clemens, 2000). Todos estos mecanismos actuando sinérgicamente pueden dañar macromoléculas estructurales como proteínas (Berlett & Stadtman, 1997), lípidos (Sakamoto et al., 1991) y ADN (Hayashi et al., 1999; Cui, et al., 2000) que pueden llevar al deterioro de la arquitectura celular y la muerte por necrosis, así como a la activación de mecanismos apoptóticos que pueden causar la muerte de la neurona por apoptosis o por ambos, dependiendo de la severidad de la provocación excitotóxica y de la velocidad relativa de cada proceso (Bonfoco et al., 1995; Nicotera et al., 1999; Martin, et al., 1998).

Hay abundante evidencia que demuestra que el estrés oxidativo desempeña un papel fundamental en la muerte excitotóxica en el cerebro (Gonsette, 2008). El estrés oxidativo inducido por excitotoxicidad es uno de los principales mecanismos que conducen a la muerte neuronal. Nuestros resultados muestran que la excitotoxicidad inducida por glutamato conduce a la alteración del equilibrio redox. El exceso de glutamato aumenta la actividad oxidante, sin cambios significativos en la actividad antioxidante, en comparación con las células control no tratadas, confirmando la presencia de estrés oxidativo ya descrita por otros (Mehta et al., 2013; Castilho et al., 1999; Schieber & Chandel 2014). Es conocido que la sobreactivación de los receptores de glutamato NMDA inducida por el glutamato está estrechamente relacionada con la generación de óxido nítrico (NO) mediante la activación de la óxido nítrico-sintasa neuronal (nNOS), una enzima que está unida al complejo del receptor NMDA mediante la proteína de densidad postsináptica-95 (PSD95) (Aarts, M. et al., 2002; Cui, H. et al., 2007) y la sobrecarga de Calcio (White, R.J. & Reynolds, I.J. 1997; Arundine, M. & Tymianski, M. 2003; Szydlowska, K. & Tymianski, M. 2010). Estos causan una producción excesiva de superóxido a través del deterioro mitocondrial (Stanika, R.I. et al., 2009; Forder, J P. & Tymianski, M. 2009) y NOX (NADPH oxidasa) (Brennan, A.M. et al., 2009; Sorce, S. & Krause, K.H. 2009; Kleikers, P.W. et al., 2012). Esta producción incrementada de radicales libres causa el estrés oxidativo inducido por la excitotoxicidad.

El tratamiento con NeuroEPO, cuando se aplica inmediatamente después de exposición a concentraciones excitotóxicas de glutamato, como en el presente estudio, protege a las neuronas del estrés oxidativo inducido por la excitotoxicidad. NeuroEPO aumenta las defensas antioxidantes celulares y reduce la actividad oxidante en las neuronas expuestas al glutamato. Este efecto protector parece estar asociado con la capacidad de NeuroEPO para aumentar la actividad antioxidante, que

permite a la neurona recuperar su equilibrio redox. Junto con evitar la pérdida de la capacidad antioxidante de las neuronas, NeuroEPO inhibe el aumento de la capacidad oxidativa inducida por el glutamato en las neuronas. Por lo tanto, el NeuroEPO inhibe el estrés oxidativo. Ha sido previamente observado que, en neuronas corticales primarias de rata en condiciones de excitotoxicidad, la EPO reduce la concentración de Calcio intracelular libre (Andoh, T. et al., 2011) Alteraciones en la $[Ca^{2+}]_i$ libre lleva a la activación de mecanismos que causan una producción excesiva de radicales libres (Mattson M.P. 2007; Szydlowska K. & Tymianski M. 2010) tanto ROS, principalmente $O_2^{\cdot-}$ por la mitocondria, y RNS por la activación de nNOS asociada con el complejo NMDA-PDZ96-NOS (Szydlowska K. & Tymianski M. 2010). La reducción de la $[Ca^{2+}]_i$ por la NeuroEPO puede llevar a la disminución de la actividad oxidante y el estrés oxidativo (Forder, J.P. & Tymianski, M. 2009).

En el presente estudio, demostramos que el glutamato puede inducir estrés oxidativo y muerte neuronal y que el tratamiento con NeuroEPO mitiga estos efectos. Estos resultados son similares a los previamente descritos (Calapai, G. et al., 2000; Sinor, A.D. & Greenberg, D.A. 2000) usando rhEPO convencional.

El aumento la acumulación de Calcio por las mitocondrias, en respuesta a la entrada excesiva de Calcio inducida por el glutamato, promueve la pérdida del potencial de la membrana mitocondrial debido a la alteración de los mecanismos que regulan la integridad de la membrana mitocondrial externa (Abramov A. & Duchon M.R. 2008). El mantenimiento del potencial de membrana mitocondrial es esencial para que las mitocondrias realicen sus funciones y eviten la activación de la vía apoptótica intrínseca (Kroemer G. 2003; Li M.X. & Dewson G. 2015). La alteración de los mecanismos que regulan la apertura de los poros de transición de la permeabilidad mitocondrial (MPTP) se considera el principal evento importante que conduce a la disfunción mitocondrial. En las células de mamíferos, la integridad de la mitocondria está controlada por proteínas del linfoma-2 de células B (Bcl-2), una familia de proteínas con actividad pro-apoptótica y anti-apoptótica que, a través de su compleja interacción, funcionan como los principales reguladores de la integridad de la membrana externa mitocondrial frente a los insultos apoptóticos (D'Orsi B. & Masteyka J. 2017; Suhaili S.H., et al., 2017). Las proteínas anti-apoptóticas, principalmente Bcl-2 y Bcl-x1, actúan sobre las mitocondrias estabilizando la integridad de la membrana y evitando la apertura del MPTP, mientras que varios miembros pro-apoptóticos (Bax y Bak) la promueven. Los procesos apoptóticos

neuronales se inician cuando la actividad anti-apoptótica Bcl-2 disminuye y la actividad Bax pro-apoptótica aumenta. Si el equilibrio homeostático entre las proteínas anti-apoptóticas y pro-apoptóticas se desplaza a favor de mayor presencia de proteínas pro-apoptóticas lleva a la apertura del MPTP en la membrana externa mitocondrial, lo que facilita la liberación del citocromo c de la mitocondria al citosol. Una vez en el citosol, el citocromo c en presencia de (d) ATP se une al factor 1 activador de la proteasa apoptótica (Apaf-1) constituyéndose el "apoptosoma" que lleva al reclutamiento y activación de la Caspasas 9 que escinde y activa caspasa-3, que a su vez escinde una variedad de sustratos celulares inhibidores de CAD (ICAD) y permite a CAD (DNAsa activada por Caspasas) inducir la degradación del ADN nuclear y la muerte celular (Li M.X. & Dewson G. 2015). Nosotros encontramos que la excitotoxicidad inducida por el glutamato disminuye la expresión de Bcl-2 y aumenta la expresión de Bax, dando como resultado un cambio significativo en la relación Bcl-2/Bax. Modificaciones significativas en la relación Bcl-2/Bax van asociados a un aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa que tiene como consecuencia la alteración de las funciones de la mitocondria y la activación de vías apoptóticas (Dong, et al., 2009). Asociado con el aumento de la expresión de Bax inducida por el glutamato hay un aumento de los niveles de citocromo c libre en el citosol y un aumento de los niveles de caspasa-3 y de actividad de caspasa 3. Tomados en conjunto, estos resultados indican que la excitotoxicidad causa la muerte de neuronas por apoptosis que incluye a la caspasa-3. En cultivos de neuronas también han sido reportados por otros (Cheung et al., 1998; Garzón F. et al 2018 (b)).

El tratamiento con NeuroEPO atenuaba significativamente la apoptosis en las neuronas que habían estado expuestas al glutamato. Los resultados indican que en neuronas corticales primarias NeuroEPO aumenta la expresión de Bcl-2 y reduce la expresión de Bax manteniendo la relación Bcl-2/Bax en niveles similares a los encontrados en las neuronas no tratadas con glutamato. Además, NeuroEPO reduce la liberación de citocromo c desde la mitocondria y que la muerte de neuronas corticales inducida por glutamato implica aumento en la expresión y actividad de la caspasa-3. La caspasa-3 es una de las cisteínas proteasas que desempeña un papel esencial en la apoptosis mediante la escisión de varias proteínas celulares claves como la poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP), la PKC, la proteína quinasa dependiente del ADN, el factor de fragmentación del ADN (DFF) y varias otras (Cohen, 1997; Nicholson et al. 1995; Li et al., 1997).

De acuerdo con nuestros resultados, NeuroEPO reduce el efecto apoptótico inducido por excitotoxicidad a través de la vía apoptótica intrínseca mitocondrial. Aunque NeuroEPO muestra una reducción en la expresión de los principales marcadores de la vía, incluidos Bax, citocromo c y caspasa-3, estos efectos pueden ser el resultado de una mayor expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 y no necesariamente de una acción específica de NeuroEPO sobre los mecanismos de expresión de cada uno de los componentes de la vía apoptótica aquí analizados. En este sentido, es digno de resaltar que el aumento en la expresión de Bcl-2 inducido por NeuroEPO en neuronas tratadas con glutamato también se observa en neuronas no tratadas. Es conocido que Bcl-2 desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la integridad de la estructura de la membrana externa de las mitocondrias (D'Orsi, et al., 2017; Suhaili, et al., 2017) contrarrestando la activación de las proteínas pro-apoptóticas mediante la regulación de la permeabilización de la membrana externa mitocondrial y, en consecuencia, la liberación de citocromo c en el citoplasma y la vía apoptótica intrínseca mitocondrial. La integridad de las mitocondrias implica el mantenimiento de su estado redox y en esta situación las mitocondrias dejarían de ser la principal fuente de ROS, necesaria para la aparición de un estado de estrés oxidativo. Esto justificaría la hipótesis de que el efecto neuroprotector de NeuroEPO frente a situaciones de excitotoxicidad sería a través de la inducción de una expresión aumentada de Bcl-2. Al preservar la integridad de las mitocondrias, Bcl-2 cancela la principal fuente de ROS inducida por el glutamato.

En respuesta a la sobrecarga de Calcio en las mitocondrias hay un aumento de la expresión de Bax que puede conducir a la disfunción mitocondrial. En esta situación, la mitocondria aumenta la producción de superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y la liberación de citocromo c en el citosol. La mayor producción $O_2^{\cdot-}$ junto con el aumento en la producción $NO\cdot$ por la activación de nNOS del complejo NMDAR-PSD95-nNOS y de la nNOS mitocondrial son fuente importante de radicales libres muy agresivos para las neuronas, el radical hidroxilo (OH^{\cdot}) y el radical peroxinitrito ($ONOO^-$) resultantes de la reacción espontánea de $NO\cdot$ con el $O_2^{\cdot-}$ producido a partir de mitocondrias que pueden formar parte del círculo vicioso (Nguyen, et al. 2011) y causar la muerte neuronal (Feissner, et al., 2009). En este sentido, la acción de NeuroEPO en excitotoxicidad podría ser el resultado de una acción específica a nivel de mitocondrias al aumentar la expresión de Bcl-2 manteniendo la integridad de la membrana mitocondrial con reducción de la producción de superóxido y consecuentemente reduciendo el estrés oxidativo. Queda pendiente la valoración de la participación de otras fuentes de ROS en el cerebro,

principalmente la NADPH oxidasa y la Xantina oxidasa, los principales productores de ROS en el citosol. NADPH oxidasa también llamada NOX2, es un complejo de multisubunidades de enzimas miembro de la familia de genes NOX [Babior, 2004]. La activación del enzima lleva a la producción de $O_2^{\cdot-}$. NOX2 está presente en microglia, astrocitos y neuronas (Abramov, et al. 2005; Noh, 2000). El papel fisiológico de los enzimas NOX en las neuronas es aún poco conocido. La Xantina oxidasa (XO) cataliza la oxidación de un amplio rango de sustratos y puede transferir electrones al oxígeno molecular para producir ácido úrico, superóxido, y peróxido de hidrógeno. El aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ activa una proteasa que convierte la Xantina dehidrogenasa en XO. El oxígeno en la presencia de XO e hipoxantina es reducido a peróxido de hidrógeno y superóxido (Harrison R. 2002). Para mantener los niveles homeostáticos, la neurona dispone de varios sistemas anti-oxidantes enzimáticos, que incluyen la superóxido-dismutasa (SOD) en la mitocondria, catalasa y glutatión peroxidasa, y sistemas anti-oxidantes noenzimáticos, principalmente glutatión (GSH) y vitamina E. Nosotros valoramos la actividad oxidante total, incluyendo la actividad oxidante de las fuentes de producción de radicales por mitocondria y por la NADH y Xantina oxidasa del citosol. NeuroEPO reduce el aumento de la actividad oxidante inducida por el glutamato y aumenta la actividad antioxidante reducida por el glutamato.

Nuestros resultados se obtuvieron utilizando un modelo *in vitro*. Los modelos experimentales *in vitro* se utilizan a menudo para estudiar los cambios morfológicos y bioquímicos relacionados con los procesos de degeneración porque permiten un control más fácil y preciso del entorno extracelular en comparación con los modelos *in vivo*. Sin embargo, como ocurre con todos los estudios llevados a cabo con cultivos celulares, tiene una serie de limitaciones que deben de ser tenidos en consideración a la hora de la extrapolación de los resultados a condiciones “*in vivo*”. Primero, utilizamos un cultivo de neuronas corticales primarias con muy poca presencia de células gliales. Esta condición tiene la ventaja de que permite asociar los resultados a un efecto directo de NeuroEPO sobre las neuronas, pero tiene la desventaja de que no existe interacción entre las neuronas y las células gliales. En segundo lugar, NeuroEPO se agrega inmediatamente después de inducir la excitotoxicidad y su efecto se limita a 24 h. Sin duda, con vistas a una posible aplicación terapéutica sería interesante conocer el efecto ventana terapéutico de NeuroEPO. Otra limitación se refiere a la eficacia del uso de cultivos celulares en el estudio de los mecanismos de excitotoxicidad crónica porque existen vías múltiples y complejas implicadas en la excitotoxicidad crónica que inducen la muerte retardada. Por

otro lado, aunque es indudable que la EPO y sus derivados actúan sobre las células a través de su interacción con el receptor EPO (EPOR), un estudio sobre la interacción NeuroEPO con EPOR expresado en neuronas y el impacto en las vías de señalización deben considerarse. El cerebro tiene mecanismos para mantener su funcionalidad contra los factores que causan daño neurológico. Se sabe que en respuesta a la lesión cerebral se activan mecanismos de supervivencia, principalmente antioxidantes, citoquinas antiinflamatorias, antiapoptóticos y factores de crecimiento, que tienden a contrarrestar la acción de mecanismos que promueven la muerte neuronal: excitotoxicidad, estrés oxidativo, inflamación y apoptosis (Fig. 8). En este marco, luego de estudios previos del efecto de NeuroEPO en modelos animales de ictus y enfermedad de Alzheimer con resultados muy prometedores (Rodríguez Y. et al., 2010; Rodríguez Y. et al. 2016; Maurice T. et al., 2013), consideramos necesario conocer el efecto directo de NeuroEPO sobre el daño neuronal en un modelo de excitotoxicidad, ya que la excitotoxicidad es un mecanismo fisiopatológico común que desempeña un papel importante en las enfermedades neurodegenerativas. Los resultados muestran que NeuroEPO preserva las neuronas al activar los mecanismos de supervivencia. Esto demuestra que, al igual que EPO (Maiese K, et al., 2008; Nguyen A.Q., et al., 2014; Broxmeyer H.E. 2013), NeuroEPO actúa como un poderoso antioxidante manteniendo la actividad antioxidante celular, que permite a las neuronas regular su condición redox intracelular. En este trabajo demostramos que NeuroEPO participa en los mecanismos de supervivencia que inducen la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 que conduce a preservar la activación de la vía apoptótica inducida por la excitotoxicidad del glutamato.

Nuestros resultados acerca del efecto de la excitotoxicidad del glutamato sobre la apoptosis en el cultivo de neuronas son similares a los ya descritos por otros (Cheung N.S., et al. 1998; Wang Y. & Qin Z. 2010). Sin embargo, este estudio es hasta ahora el único sobre el efecto de NeuroEPO en la apoptosis inducida por la excitotoxicidad del glutamato en las neuronas cultivadas primarias. El efecto de NeuroEPO encontrado en el presente estudio confirmó los reportados en otros estudios. En animales, utilizando un modelo de enfermedad de Alzheimer, NeuroEPO mitiga la apoptosis en APPSwe (Rodríguez Y. et al., 2016; Maurice T. et al., 2013). En ese estudio, NeuroEPO previene la inducción de estrés oxidativo, el aumento de los niveles de Bax y de la relación Bax / Bcl-2 de ratones no tratados con NeuroEPO. Como consecuencia, la actividad de la caspasa 3 se redujo. En un estudio reciente con EpoL, un EPO derivado in silico también con bajo contenido de ácido siálico

como NeuroEPO, utilizando células PC12 como modelo neuronal y cianuro de carbonilo-4-(trifluorometoxi) –fenilhidrazona (FCCP, un agente de desacoplamiento de la cadena respiratoria de electrones, que induce estrés oxidativo) o H₂O₂ en lugar de glutamato, como un modelo de estrés oxidativo, se fundó que EpoL tiene un efecto neuroprotector, reduce el estrés oxidativo y aumenta la expresión de Bcl-2 (Castillo C. et al., 2018).

Eritropoietina y sus diferentes formas ejercen sus funciones mediante la unión al EPOR, un receptor transmembrana miembro de la superfamilia de citocinas de tipo I, que está preformado como homodímeros en la superficie de la célula. La unión de EPO a su receptor induce cambios conformacionales que causan fosforilación por Janus kinasa 2 (JAK-2) y activación de vías de señalización que incluyen transductor de señal y activador de transcripción 5 (STAT-5), fosfoinositol 3'-quinasa (PI3K), la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) y la proteína quinasa c (PKC) que finalmente conducen a la regulación de proteínas anti-apoptóticas. Sin embargo, el EPOR expresado en tejidos no eritroides es estructuralmente diferente del EPOR clásico porque es un heterodímero compuesto por un monómero del EpoR canónico y otra subunidad del "receptor común β", también conocido como CD131 (EPOR-β comm), que es idéntica a la región beta de los receptores de citoquinas como los receptores de interleucina-3 (IL3) o los receptores del factor estimulante de colonias de macrófagos de granulocitos (GMSCF) (Su K.H., et al. 2011). La glicosilación de rhEPO afecta la actividad biológica, la inmunogenicidad, la farmacocinética y la tasa de eliminación in vivo de rhEPO. Las diferencias en la glicosilación provocan cambios en la cinética de unión del receptor de EPO (Jiang J., et al., 2014). NeuroEPO y rhEPO difieren notablemente en su glicosilación. Sorprendentemente, esta diferencia no parece afectar los efectos neuroprotectores de NeuroEPO contra el daño neuronal inducido por excitotoxicidad.

Los mecanismos neuroprotectores descritos aquí para NeuroEPO ya se han descrito para EPO (Mallet R. & Ryou M-G. 2017; Maiese K. et al. 2008). Al igual que NeuroEPO, EPO protegió a las neuronas corticales cultivadas de la muerte inducida por glutamato (Morisita E. et al. 1996). Por otra parte, ya se ha informado de que la EPO previene la apoptosis celular a través de preservar la función mitocondrial mediante la activación de la vía anti-apoptótica a través de la regulación positiva de Bcl-2 (Rabie T. & Marti H.H. 2008; Nguyen A.Q. et al. 2014; Broxmeyer H.E. 2013).

Estudios anteriores mostraron que la neuroprotección por EPO contra la excitotoxicidad en cultivos neuronales requiere un pretratamiento con EPO al menos varias horas antes de la exposición al glutamato (Morishita. E. et al., 1996; Digicaylioglu M &, Lipton S. 2001). Sin embargo, nuestros resultados demuestran que NeuroEPO también tiene un efecto neuroprotector cuando se agrega después de la exposición al glutamato. Aquí el efecto neuroprotector se observa 24 h después de la adición de NeuroEPO al cultivo previamente expuesto al glutamato. Nuestros resultados en cultivos de neuronas corticales están de acuerdo con otros observados en animales (Nguyen A.Q. et al. 2014; Sirén A.L. et al. 2001). Desde el punto de vista de posibles aplicaciones clínicas de NeuroEPO esta capacidad para atenuar el daño neuronal cuando se usa después iniciado el daño neuronal representa un hallazgo de enorme importancia para el empleo de NeuroEPO como potencial tratamiento de procesos neurodegenerativos agudos como el ictus y el daño traumático cerebral.

Aunque los resultados obtenidos en cultivos celulares deben extrapolarse con precaución, nuestros hallazgos informados respaldan los abundantes resultados existentes que sostienen que la EPO y los derivados contribuyen a la supervivencia neuronal contra la lesión neuronal causada por excitotoxicidad, un mecanismo descrito como común en las patologías neurodegenerativas más relevantes. incluyendo la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la esclerosis lateral amiotrófica. Tomados en conjunto, nuestros resultados indican un posible uso de NeuroEPO como un biosimilar para tratar enfermedades del SNC en el que la excitotoxicidad juega un papel importante en su patogénesis.

6. Conclusiones

1. NeuroEPO puede atenuar sustancialmente los cambios morfológicos causados por la excitotoxicidad inducida por glutamato en las neuronas.
2. NeuroEPO reduce el efecto neurotóxico del glutamato sobre la viabilidad neuronal.
3. NeuroEPO protege a las neuronas del estrés oxidativo inducido por el glutamato.
4. NeuroEPO protege a las neuronas de la apoptosis inducida por el glutamato mediante el manteniendo el equilibrio entre proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2) y pro-apoptóticas (Bax), evitando la liberación al citosol del citocromo c y reduciendo la actividad de la caspasa-3.
5. NeuroEPO ejerce su función neuroprotectora actuando directamente sobre las neuronas.
6. NeuroEPO puede ejercer su actividad neuroprotectora una vez que se ha inducido la excitotoxicidad del glutamato.
7. Los bajos niveles de ácido siálico de la NeuroEPO comparados con la rhEPO no afectan a la actividad neuroprotectora de la NeuroEPO.

7. Bibliografía

- Aarts M.; Liu, Y.; Li, L. 2002. "Treatment of ischemic brain damage by perturbing NMDA Receptor-PSD-95 protein interactions". *Science*, 298, 846–850.
- Abramov A.Y. et al. 2005. "Expression and modulation of an NADPH oxidase in mammalian astrocytes". *J Neurosci* 25, 9176-9184.
- Abramov A. & Duchen M.R. 2008. "Mechanisms underlying the loss mitochondrial membrane potential in glutamate excitotoxicity". *Biochim Biophys Acta* 1777, 953-964.
- Ambrosi G., Cerri S., Blandini F. 2014. "A further update on the role of excitotoxicity in the pathogenesis of Parkinson's disease". *J Neural Transm (Vienna)*.
- Andoh T., Echigo, N., Kamiya, Y., Hayashi, M., Kudoh, I. & Goto, T. 2011 "Effects of erythropoietin on intracellular calcium concentration of rat primary cortical neurons". *Brain Res.*, 1387, 8–18.
- Ankarcrona M., Dypbukt J.M., Bonfoco E. 1995. "Glutamate-induced neuronal death: A succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function". *Neuron* 15, 961-973.
- Arcasoy M.O. 2008. "The non-hematopoietic biological effects of erythropoietin". *Br J Haematol* 141,14-31.
- Arundine M. & Tymianski M. 2003. "Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity". *Cell Calcium* 34, 325–337.
- Astrup J., Siesjo, B.K. & Symon, L. 1981. "Threshold in cerebral ischemia- the ischemic penumbra". *Stroke*, Vol. 12, pp. 723-725.
- Avery S.V. 2011. "Molecular targets of oxidative stress". *Biochem J* 434, 201-210.
- Babior B.M. 2004. "NADPH oxidase". *Curr Opin Immunol* 16, 42-47.
- Berlett B.S. & Stadtman E.R. 1997. "Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress". *J Biol Chem* 272, 20313-20316.
- Berlioni L., Bano D. & Nicotera P. 2005. "Ca²⁺ signals and death programs in neurons". *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 360, 2255-2258.
- Berridge M.J., Bootman M.D. & Roderick H.L. 2003. "Calcium signaling: dynamics, homeostasis and remodeling". *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 5127-529.
- Bezprozvanny I. & Mattson M.P. 2008. "Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease". *Trends Neurosci*, 31, 454-463.
- Bhalla A., Wang, Y., Rudd, A., Wolfe, C.D.A. 2013. "Differences in outcome and predictors between ischemic and intracerebral hemorrhage: The South London Stroke Register". *Stroke*, 44, 2174–2181.

- Bliss T.V. & Collingridge G.L. 1993. "A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus". *Nature* 361, 31–39.
- Bolaños J.P. & Almeida A. 1999. "Roles of nitric oxide in brain hypoxia-ischemia". *Biochim Biophys Acta - Bioenerg*; 1411, 415–436.
- Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, Nicotera P, Lipton SA. 1995. "Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-Methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures". *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7162–7166.
- Bossy-Wetzler E., Schwarzenbacher R. & Lipton S. A. 2004. "Molecular pathways to neurodegeneration". *Nat Med*;10 Suppl, S2-9.
- Brennan A.M., Won Suh, S., Joon Won, S., Narasimhan, P., Kauppinen, T.M., Lee, H., Edling, Y., Chan, P.H. & Swanson, R.A. 2009. "NADPH oxidase is the primary source of superoxide induced by NMDA receptor activation". *Nat. Neurosci.* 12, 857–863.
- Brenman J.E., Chao D.S., Gee S.H., et al. 1996. "Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and α 1-syntrophin mediated by PDZ domains". *Cell*; 84, 757–767.
- Broxmeyer H.E. 2013. "Erythropoietin: multiple targets, actions, and modifying influences ^[1]for biological and clinical consideration". *J Exp Med* 210, 205-208.
- Calapai G., Marciano, M.C., Corica, F., Allegra, A., Parisi, A., Frisina, N., Caputi, A. P. & Buemi, M. 2000 "Erythropoietin protects against brain ischemic injury by inhibition of nitric oxide formation". *Eur J Pharmacol*, 401, 349–356.
- Carbonell T. & Rama R. 2007. "Iron, oxidative stress and early neurological deterioration in ischemic stroke" *Curr Med Chem.* 14(8), 857-74. Review.
- Carden D.L. & Granger D.N. 2000. "Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury". *J Pathol.* 190(3), 255-66. Review
- Castilho R. F; Ward, M. W. and Nicholls, D. G. 1999. "Oxidative stress, mitochondrial function, and acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells". *J. Neurochem.*, 72, 1394-401.
- Castillo C., Zaror S., Gonzalez M., Hidalgo A., Burgos C.F., Cabezas O., Hugues F., Jiménez S., González-Horta E., González-Chavarría I., Gavilán J., Montesino R., Sánchez O., Lopez M., Fuentealba J. & Toledo R. 2018. "Neuroprotective effect of a new variant of Epo non-hematopoietic against oxidative stress". *Redox Biol* 14, 285-294.
- Catterall WA. & Few A.P. 2008. "Calcium channel regulation and presynaptic plasticity". *Neuron* 59, 882-901.
- Chateauvieux S., Grigorakaki C., Morceau F., Dicato, M. & Diederich M. 2011, "Erythropoietin, erythropoiesis and beyond". *Biochem Pharmacol* 82, 1291-1303.

- Chen M, Lu TJ, Chen XJ, Zhou Y, Chen Q, Feng XY, Xu L, Duan WH, Xiong ZQ. 2008. "Differential roles of NMDA receptor subtypes in ischemic neuronal cell death and ischemic tolerance". *Stroke* 39, 3042-3048.
- Cheung NS, Pascoe CJ, Giardina SF, John CA, Beart PM, 1998. "Micromolar L-glutamate induces extensive apoptosis in an apoptotic-necrotic continuum of insult-dependent, excitotoxic injury in cultured cortical neurones". *Neuropharmacol* 37, 1419-1429.
- Choi D.W., Maulucci-Gedde M. and Kriegstein A R. 1987. "Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture". *J. Neurosci* 7, 357-68.
- Choi D.W. 1987. "Ionic dependence of glutamate neurotoxicity". *J. Neurosci.* 7, 369–379.
- Choi D.W. 1988 "Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system". *Neuron*, 1, 623-634.
- Choi DW. 1992. "Excitotoxic cell death". *J. Neurobiol* 23, 1261-1276.
- Chong Z.Z., Kang J-Q., Maiese K. 2004. "Essential cellular regulatory elements of oxidative stress in early and late phases of apoptosis in the central nervous system". *Antiox Redox Signal* 6, 277-287.
- Circu M.L. & Aw T.Y. 2010. "Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis". *Free Radic Biol & Medic* 48, 749–762.
- Clemens J.A. 2000. "Cerebral ischemia: gene activation, neuronal injury, and the protective role of antioxidants". *Free Radic Biol Med* 28, 1526-1531.
- Clements J.D. & Westbrook GL. 1991. "Activation kinetics reveal the number of glutamate and glycine binding sites on the N-Methyl-D-aspartate receptor". *Neuron* 7, 605–613.
- Cohen G.M. 1997 "Caspases: the executioners of apoptosis". *Biochem J* 326, 1-16.
- Corwin H.L., Gettinger A., Fabian T.C., May A., Pearl R.G., Heard S., An R., Bowers P.J., Burton P., Klausner M.A. & Corwin M.J. 2007. "Efficacy and safety of epoetin alfa in critically ill patients. *N Engl J Med* 357, 965-976.
- Cui H., Hayashi, A., Sun, H.-S., Belmares, M.P., Cobey, C., Phan, T., Schweizer, J., Salter, M.W., Wang, Y.T., Tasker, R. A., Garman, D., Rabinowitz, J., Lu, P. S. & Tymianski, M. PDZ 2007 "protein interactions underlying NMDA receptor-mediated excitotoxicity and neuroprotection by PSD-95 inhibitors". *J. Neurosci.*, 27, 9901–9915.
- Cui J., Holmes E.H., Greene T.G. & Liu P.K. 2000 "Oxidative DNA damage precedes DNA fragmentation after experimental stroke in rat brain". *FASEB J* 14, 955-967.
- Curtis D.R., Phillis, J.W. & Watkins, J.C. 1959. "Chemical excitation of spinal neurons". *Nature* 183, 611–612.

- Digicaylioglu M. & Lipton S. 2001. "Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak-2 and NF- κ B signalling cascades". *Nature* 412, 641-647.
- Doble A. 1999. "The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy". *Pharmacol. Ther.* 81, 163-221.
- Dong X., Wang Y. & Qin Z. 2009. "Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases". *Acta Pharmacol Sin* 30, 379-387.
- D'Orsi B., Masteyka J. & Prehn J. 2017. "Control of mitochondrial physiology and cell death by the Bcl-2 family proteins Bax and Bak". *Neurochem Int* 109, 162-170.
- Dröge W. 2002. "Free radicals in the physiological control of cell function". *Physiol Rev* 82, 4795.
- Erbayraktar S., Grasso G., Sfacteria A., Xie Q., et al 2003. "Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity in vivo". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 6741-6746.
- Esbach J.W., Egrie J.C., Downing M.R., Browne J.K. & Adamson J.W. 1987. "Correction of the anemia of end stage renal disease with recombinant human erythropoietin. Results of a combined phase I and II clinical trials". *N Engl J Med* 316, 73-78.
- Feissner R.F., Skalska J., Gaum W.E. & Sheu S.S. 2009. "Crosstalk signaling between mitochondrial Ca²⁺ and ROS". *Front Biosci* 14, 1197-1218.
- Ferrer I. & Planas A.M. 2003. "Signaling of cell death and cell survival following focal cerebral ischemia: Life and death struggle in the penumbra". *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, Vol. 62, pp. 329-339.
- Ferri K.F. & Kroemer G. 2001. 2001. "Mitochondria--the suicide organelles". *Bioessays*. Feb; 23 (2), 111-5.
- Forder J.P. & Tymianski, M. 2009. "Postsynaptic mechanisms of excitotoxicity: Involvement of postsynaptic density proteins, radicals, and oxidant molecules". *Neuroscience*, 158, 293-300.
- Fox C., Crugel M., Maidment I., Auestad B.H., Coulton S., Treloar A., et al. 2012. "Efficacy of memantine for agitation in Alzheimer's dementia: a randomised double-blind placebo controlled" trial, *PLoS One* 7 e35185.
- Furukawa H., Singh S.K. & Mancusso R., et al. 2005. "Subunit arrangement and function in NMDA receptors". *Nature* 438, 185-192.
- García J.C. & Sosa 2009. "The nasal route as a potential pathway for delivery of erythropoietin in the treatment of acute ischemic stroke in humans". *Scientific World J* 9, 970-981.
- Garzón F., Rodríguez Y., García J.C., Rama R. 2018 (a) "Neuroprotective effects of NeuroEPO using an in vitro model of stroke". *Behav Sci* 8, 26-37.

- Garzón F, Coimbra D, Parcerisas A, Rodríguez Y, García JC, Soriano E, Rama R. 2018 (b). "NeuroEPO Preserves Neurons from Glutamate-Induced Excitotoxicity". *J Alzheimers Dis*. DOI 10.3233/JAD-180668. IOS Press. 15 pp.
- George, P.M.; Steinberg, G.K. 2015. "Novel stroke therapeutics: Unraveling stroke pathophysiology and its impact on clinical treatments". *Neuron*, 87, 297–309.
- Gonsette R. 2008. "Oxidative stress and excitotoxicity: A therapeutic issue in multiple sclerosis?". *Multiple sclerosis* 14, 22-34.
- Green K.N., LaFerla F.M. 2008. "Linking calcium to Abeta and Alzheimer's disease". *Neuron* 59,190-194.
- Greenwood S.M. & Connolly, C.N. 2007, "Dendritic and mitochondrial changes during glutamate excitotoxicity". *Neuropharmacol.* 53, 891–898.
- Grossberg G.T., Manes F., Allegri R.F., Gutiérrez-Robledo L.M., et al. 2013. "The safety, tolerability, and efficacy of once-daily memantine (28 mg): a multinational, randomized, double-blind, placebo-controlled trial in patients with moderate-to-severe Alzheimer's disease taking cholinesterase inhibitors", *CNS Drugs* 27, 469–47.
- Halliwell B. 2006. "Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now". *J Neurochem* 97, 1634-1658.
- Hankey G. 2017. "Stroke". *Lancet*, 389, 641–654.
- Hardingham, G.E. 2006. "Pro-survival signalling from the NMDA receptor". *Biochem. Soc. Trans.* 34, 936–938.
- Hardingham G.E. & Bading, H. 2003. "The Yin and Yang of NMDA receptor signalling". *Trends Neurosci.* 26, 81–89.
- Hardingham G.E. & Bading H. 2010. "Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders". *Nature Rev Neurosci* 11, 682-696
- Hardingham G.E., Fukunaga, Y. & Bading, H. 2002. "Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways". *Nature Neurosci.* 5, 405–414.
- Harrison R. 2002. "Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now?". *Free Rad Biol Med* 33, 774-797.
- Hayashi T., Sakurai M., Itoyama Y. & Abe K. 1999. "Oxidative damage and breakage of DNA in the rat brain after transient MCA occlusion". *Brain Res* 832, 159-163.
- Heiss W. D. & Graf, R. 1994. "The ischemic penumbra. Current Opinion" *Neurology*, Vol. 7, No. 1, pp. 11-19.

- Hetman M. & Kharebava G. 2006. "Survival signaling pathways activated by NMDA receptors". *Curr Top Med Chem* 6, 787–799.
- Higuchi M., Oheda M., Kuboniwa H., Tomonoh K., Shimonaka Y. & Ochi, N. 1992. "Role of sugar chains in the expression of the biological activity of human erythropoietin". *J Biol Chem* 267, 7703-7709.
- Hossmann K. A. 1994. "Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia". *Annals of Neurology*, Vol. 36, No. 4, pp. 557-565.
- Hynd MR, Scott HL, Dodd PR. 2004. "Glutamate mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease". *Neurochem*; 45, 583–95.
- Jelkmann W. 2007 "Erythropoietin after a century of research: younger than ever". *Eur J Haematol* 78, 183-205.
- Jiang J., Tian F., Cai Y., Qian X., Costello C.E. & Ying W. 2014. "Site-specific qualitative and quantitative analysis of the N- and O-glycoforms in recombinant human erythropoietin". *Anal Bioanal Chem* 406, 6265- 6274.
- Jones D.P. 2006. "Redefining oxidative stress". *Antioxid Redox Signal* 8, 1865-1879.
- Kim E. & Sheng M. 2004. "PDZ domain proteins of synapses". *Nat Rev Neurosci*; 5, 771–781.
- Kleikers P.W.M., Wingler, K., Hermans, J.J.R., Diebold, I., Altenhöfer, S., Radermacher, K.A., Janssen, B., Görlach, A., Schmidt, H.H. 2012. "NADPH oxidases as a source of oxidative stress and molecular target in ischemia/reperfusion injury". *J. Mol. Med.*, 90, 1391–1406.
- Kornau H-C., Schenker L.T., Kennedy M.B., et al. 1995. "Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95". *Source Sci New Ser*; 269, 1737–1740.
- Kroemer G. 2003. "Mitochondrial control of apoptosis: an introduction". *Biochem Biophys Res Commun* 304, 433-435.
- Ladecola C. 1997. "Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury". *Trends Neurosci*; 20, 132–139.
- Lai P.H., Everett R., Wang F.F., Arakawa T. & Goldwasser E. 1986. "Structural characterization of human erythropoietin". *J Biol Chem* 261, 3116-3121.
- Leist M., Ghezzi P., Grasso G. et al., 2004. "Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic". *Science* 305, 239-242.
- Léveillé F.E. Gaamouch F., Gouix E et al. 2008. "Neuronal viability is controlled by a functional relation between synaptic and extrasynaptic NMDA receptors". *FASEB J.* 22, 4258–4271.

- Levine M.S., Cepeda C. & André V.M. 2010. "Location, location, location: contrasting roles of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in Huntington's disease". *Neuron*. Jan 28;65(2), 145-7.
- Levy O.A., Malagelada C. & Greene L.A. 2009. "Cell death pathways in Parkinson's disease: Proximal triggers, distal effectors, and final steps". *Apoptosis* 14, 478-500.
- Li M.X. & Dewson G. 2015. "Mitochondria and apoptosis: emerging concepts". *F 1000 Prime Reports* 7, 42.
- Li P., Nijhawan D., Budihardjo I., Srinivasula S.M., 1997. "Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade". *Cell*, 91, 479-89.
- Lipton P. 1999. "Ischemic cell death in brain neurons". *Physiol Rev* 79, 1431-1568.
- Lipton S.A. & Rosenberg P.A. 1994. "Mechanisms of disease: excitatory amino acids as a final common pathway in neurologic disorders". *N. Engl. J. Med.*, 330:613-622. Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 79, 1431-1568 (1999).
- Liu Y., Wong T.P., Aarts M., et al. 2007. "Neurobiology of disease NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo". *J Neurosci*; 27, 2846–2857.
- Lombardero M., Kovacs K. & Scheithauer B.W. 2011. "Erythropoietin: a hormone with multiple functions". *Pathobiology*. 78: 41.
- Lucas D.R. & Newhouse, J.P. 1957. "The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina". *AMA Arch. Ophthalmol.* 58, 193–201.
- Lynch D.R. & Guttman R.P. 2001. "NMDA receptor pharmacology: perspectives from molecular biology". *Curr Drug Targets* 2, 215–231.
- Madden D.R. 2002. "The structure and function of glutamate receptor ion channels". *Nat Rev Neurosci* 3, 91-101.
- Maiese K., Chong Z., Hou J., Yan S. 2008. "Erythropoietin and oxidative stress". *Current Neurovasc Res* 5, 125-142.
- Mallet R. & Ryou M-G. 2017. "Erythropoietin: endogenous protection of ischemic brain". *Vitamines & Hormones* 105, 197-232.
- Martel M.A., Wyllie D.J.A. & Hardingham G.E. 2009. "In developing hippocampal neurons, NR2B-containing N-methyl-d-aspartate receptors (NMDARs) can mediate signaling to neuronal survival and synaptic potentiation, as well as neuronal death". *Neuroscience*; 158, 334–343.

- Martin L.J., Al-Abdulla N.A., Brambrink A.M., Kirsch J.R., Sieber F.E. & Portera-Cailliau C. 1998. "Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis". *Brain Res Bull* 46, 281–309.
- Martin H.G. & Wang Y.T. 2010. "Blocking the deadly effects on the NMDA receptor in stroke". *Cell* 140, 174-176.
- Martínez L. J., Woehrlen B., De C., Paz M., Hernández M. L., Rubio O. A., Sánchez M. A., Rios M. & Pérez S. C. F. 2010. "Radicales libres y estrés oxidativo en las enfermedades neurodegenerativas". Depto de Bioquímica, Fac de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>) (ISSN-0188-137X) *Mensaje Bioquímico* 34. Vol. XXXIV, 43-59.
- Matsunaga S., Kishi T. & Iwata N. 2015. "Memantine monotherapy for Alzheimer's Disease: A systematic review and meta-analysis", *PLoS One* 10.
- Mattson M.P. 2007. "Calcium and neurodegeneration". *Aging Cell* 6, 337-350.
- Maurice T., Mustafa M.H., Desrumaux C., Keñller E., Naert G., García-Barceló M., Rodríguez C.Y. & García Rodríguez J.C. 2013. "Intranasal formulation of erythropoietin (EPO) showed potent protective activity against amyloid toxicity in the A β 25-35 nontransgenic mouse model of Alzheimer's disease". *J Psychopharmacol* 27, 1044-1057.
- Mehta A.; Prabhakar, M.; Kumar, P.; Deshmukh, R.; Sharma, P. L. 2013 "Excitotoxicity: Bridge to various triggers in neurodegenerative disorders". *Eur. J. Pharmacol.*, 698, 6–18.
- Meldrum B. & Garthwaite, J. 1990. "Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease". *Trends Pharmacol. Sci.* 11, 379–387.
- Missiaen L., Robberecht W., Van Den Bosch L. et al. 2000. "Abnormal intracellular Ca²⁺homeostasis and disease". *Cell Calcium* 28 (1), 1-21.
- Miyake T., Kung, C.K. & Goldwasser, E. 1977. "Purification of human erythropoietin". *J. Biol. Chem.* 252, 5558-5564.
- Morishita E., Masuda, S., Nagao, M., Yasuda, Y. & Sasaki, R. 1996. "Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death". *Neuroscience*, 76, 105–116.
- Moskowitz M.A.; Lo, E.H.; Iadecola, C. 2010. "The science of stroke: Mechanisms in search of treatments". *Neuron*, 67, 181–198.
- Nakanishi S. 1992. "Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function". *Science* 258: 597-603.

- Nguyen A.Q., Cherry B.H., Scott G.F., Myoung-Gwi Ryou M-G., Mallet R.T. 2014 “Erythropoietin: Powerful protection of ischemic and post-ischemic brain”. *Exp Biol Med* 239, 1461-1475.
- Nguyen D, MV Alavi MV, Kim K-Y, Kang T, Scott RT, Noh YH, Lindsey JD, et al. 2011. “A new vicious cycle involving glutamate excitotoxicity, oxidative stress and mitochondrial dynamics”. *Cell Death and Disease* 2, e240.
- Nicholls DG & Budd SL. 1998. “Mitochondria and neuronal glutamate excitotoxicity”. *Biochim Biophys Acta* 1366, 97-112.
- Nicholson D.W., Ali A, Thornberry N.A., Vaillancourt J.P., Ding C.K. 1995 “Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis”. *Nature*, 376, 37-43.
- Nicotera P., Leist M. & Manzo L. 1999. “Neuronal cell death: a demise with different shapes”. *Trends Pharmacol Sci* 20, 46-51.
- Niethammer M., Kim E. & Sheng M. 1996. “Interaction between the C terminus of NMDA receptor subunits and multiple members of the PSD-95 family of membrane-associated guanylate kinases”. *J Neurosci* 16, 2157-2163.
- Noguchi C.T., Wang L., Rogers H.M., Teng R. & Jia Y. 2008. “Survival and proliferative roles of erythropoietin beyond the erythroid lineage”. *Expert Rev Mol Med* 10, e36.
- Noh K.M., Koh J.Y. 2000. “Induction and activation by zinc of NADPH oxidase in cultured cortical neurons and astrocytes”. *J Neurosci* 20RC111.
- Okubo Y., Sekiya, H., Namiki, S., Sakamoto, H., Iinuma, S., Yamasaki, M., Watanabe, M., Hirose, K., Iino, M., 2010. “Imaging extrasynaptic glutamate dynamics in the brain”. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 107, 6526–6531.
- Olney J. 1969. “Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate”. *Science* 164 (880), 719-721.
- Ott M., Gogvadze V., Orrenius S. & Zhivotovsky B. 2007, “Mitochondria, oxidative stress and cell death”. *Apoptosis* 12, 913-922.
- Paoletti P. & Neyton J. 2007. “NMDA receptor subunits: function and pharmacology”. *Curr Opin Pharmacol* 7, 39-47.
- Pregi N. 2008. “Estudio de la eritropoyetina como agente neuroprotector”. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- Prentice H., Modi J.P., Wu J-Y. 2015. “Mechanisms of neuronal protection against excitotoxicity, endoplasmic reticulum stress, and mitochondrial dysfunction in stroke and neurodegenerative diseases”. *Oxid Med Cell Longev* ID 964518.

- Prince M. Prina, M. Guerchet, M. 2013. "World Alzheimer report 2013 journey of caring: an analysis of long-term care for dementia. *Alzheimer's Dis. Int.* 1–9.
- Rabie T. & Marti H.H. 2008. "Brain protection by erythropoietin: A Manifold Task". *Physiology* 23, 263-274.
- Rama R. & García J.C. 2013. "Excitotoxicity and Oxidative Stress in Acute Stroke". *InTech*, 75–100.
- Ray P.D., Huang B-W. & Tsuji Y. 2012. "Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling". *Cell Signal* 24, 981-900.
- Roberts R.A., Laskin D., Smith C.V. et al. 2009. "Nitrate and oxidative stress in toxicology and diseases". *Toxicol Sci* 112, 4-16
- Rodríguez Y., Strehaiano, M., Rodríguez T., García J.C., Maurice T. 2016. "An intranasal formulation of erythropoietin (Neuro-EPO) prevents memory deficits and amyloid toxicity in the APPSwe transgenic mouse model of Alzheimer's disease". *J Alzheimer's Dis* 55, 231-248.
- Rodríguez Y., Támos Y., Muñoz A., Subirós N., González-Quevedo, A., Sosa I.M., García, J.C. 2010. "Treatment with nasal Neuro-Epo improves the neurological, cognitive, and histological state in a gerbil model of focal ischemia". *Scientific World J* 10, 2288-2300.
- Sacco R.L., Kasner S.E., Broderick J.P., Caplan LR, Connors J.J., Culebras A., Elkind M.S., George M.G., Hamdan A.D., Higashida R.T., Hoh B.L., Janis L.S., Kase C.S., Kleindorfer D.O., Lee J.M., Moseley M.E., Peterson E.D., Turan T.N., Valderrama A.L. & Vinters H.V. 2013. "An updated definition of stroke for the 21st century: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association". *Stroke* 44(7), 2064-89.
- Sakamoto A, Ohnishi ST, Ohnishi T. & Ogawa R. 1991. "Relationship between free radical production and lipid peroxidation during ischemia-reperfusion injury in the rat brain". *Brain Res* 554, 186-192.
- Sakanaka M., Wen T.C., Matsuda S., Masuda S., Morishita E., Nagao M. & Sasaki R. 1998. "In vivo evidence that erythropoietin protects neuron from ischemic damage". *Proc Nat Acad Sci USA* 95, 4635-4640.
- Sargin D., Friedrichs H., El-Kordi A. & Ehnenreich H. 2010. "Erythropoietin as neuroprotective and neurodegenerative treatment strategy: Comprehensive overview of 12 years of preclinical and clinical research". *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 24, 573-594.
- Sasaki H., Bothner B., Dell A. & Fukuda M. 1987. "Carbohydrate structure of erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells by a human erythropoietin cDNA". *J Biol Chem* 262, 12059-12076.
- Sasaki R., Masuda S. & Nagao M. 2001. "Pleiotropic Functions and Tissue-Specific Expression of Erythropoietin". *News Physiol Sci* 16, 110-113.

- Sattler R., Charlton M.P., Hafner M., et al. 1998. "Distinct influx pathways, not calcium load, determine neuronal vulnerability to calcium neurotoxicity". *J Neurochem*; 71: 2349-2364.
- Sattler R. & Tymianski M. 2000. "Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity". *J Mol Med* 78, 3-13.
- Sattler R., Xiong Z., Lu W.Y., et al. 1999. "Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein". *Science*; 284, 1845–1848.
- Schieber M. & Chandel, N.S. 2014. "ROS function in redox signaling and oxidative stress". *Curr. Biol.*, 24, R453-R462.
- Schneider L.S., Dagerman K.S., Higgins J.P.T. & McShane R. 2011. "Lack of evidence for the efficacy of memantine in mild Alzheimer disease". *Arch. Neurol.* 68, 991–998.
- Schulz G.E., Schirmer, R.H., Sachsenheimcr, W. & Pai, E.F. 1978. "Glutathione reductase from human erythrocytes. Amino-acid sequence of a major fragment that links the FAD, NADP and interface domains" *Nature (Lond.)* 273, 120-124.
- Schulz J.B., Henshaw D.R, Siwek D et al., 1995. "Involvement of free radicals in excitotoxicity in vivo". *J Neurochem* 64, 2239-2247.
- Shinder AF, Olson EC, Spitzer NC, Montal M. 1996. "Mitochondrial dysfunction is a primary event in glutamate neurotoxicity". *J Neurosci* 16, 6125-6133.
- Shukla V., Mishra, S.K. Pant, H.C. 2012. "Oxidative stress in neurodegeneration". *Adv Pharmacol Sci*; Federico A, Cardaioli, Da Pozzo et al. *J Neurol Sci* 322, 254-262.
- Sies Berndt, C. & Jones D.P. 2017. "Oxidative stress". *Annu Rev Biochem* 86, 715-745.
- Sinor A.D. & Greenberg, D.A. 2000. "Erythropoietin protects cultured cortical neurons, but not astroglia, from hypoxia and AMPA toxicity". *Neurosci. Lett.*, 290, 213–215.
- Sirén A.L., Maddalena Fratelli M., Brines M., Goemans C., Casagrande S., Lewczuk P., Keenan S., Gleiter C., Claudio Pasquali C., Capobianco A., Tiziana Mennini T., Heumann R., Cerami A., Ehrenreich H. & Pietro Ghezzi P. 2001. "Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress". *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 4044-4049.
- Siren A.L., Fasshauer T., Bartels C. & Ehrenreich H. 2009. "Therapeutic potential of erythropoietin and its structural or functional variants in the nervous system". *Neurotherapeutics* 6, 108-127.
- Sorce S. & Krause, K.H. 2009 "NOX enzymes in the central nervous system: from signaling to disease". *Antioxid. Redox Signal.* 11, 2481–2504.
- Soriano F.X., et al. 2006. "Preconditioning doses of NMDA promote neuroprotection by enhancing neuronal excitability". *J Neurosci* 26, 4509-4518.

- Stanika R.I., Pivovarov, N.B., Brantner, C.A., Watts, C., Winters, C. & Andrews, S.B. 2009. "Coupling diverse routes of calcium entry to mitochondrial dysfunction and glutamate excitotoxicity". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 106, 9854–9859.
- Su K.H., Shyue S.K., Kou Y.R., Ching L.C., Chiang A.N., Yu Y.B., Chen C.Y., Pan CC, Lee T.S. 2011. "β Common receptor integrates the erythropoietin signaling in activation of endothelial nitric oxide synthase". *J Cell Physiol* 226, 3330-3339.
- Suhaili S.H., Karimian H., Stellato M., Lee T-S. & Aguilar M-I. 2017. "Mitochondrial outer membrane permeabilization: a focus on the role of mitochondrial membrane structural organization". *Biophys Rev* 9, 443-457.
- Sun H-S., Doucette T.A., Liu Y. Fang Y. et al. 2008. "Effectiveness of PSD95 inhibitors in permanent and transient focal ischemia in the rat". *Stroke* 39, 2544-2553.
- Surmeier D.J. 2007. "Calcium, ageing, and neuronal vulnerability in Parkinson's disease". *Lancet Neurol* 6, 933-938.
- Szydlowska K.; Tymianski, M. 2010. "Calcium, ischemia and excitotoxicity". *Cell Calcium*, 47, 122–129.
- Tu W., Xu X., Peng L., et al. 2010. "DAPK1 interaction with NMDA receptor NR2B subunits mediates brain damage in stroke". *Cell* 140, 222–234.
- Tymianski M., Charlton, M.P., Carlen, P.L. & Tator, C.H. 1993. "Source specificity of early calcium neurotoxicity in cultures embryonic spinal neurons". *J. Neurosci.* 13, 2085–2104.
- Vaarmann A.; Kovac, S.; Holmström, K. M.; Gandhi, S. and Abramov, A. Y. 2013 "Dopamine protects neurons against glutamate-induced excitotoxicity". *Cell Death Dis.*, 4, e455).
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M. & Telser J. 2007. "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease". *Int J Biochem Cell Biol* 39, 44-84.
- Von Engelhardt J., Coserea I., Pawlak V. et al. 2007. "Excitotoxicity in vitro by NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors". *Neuropharmacology* 53, 10–17.
- Wang X, & Michaelis EK. 2010. "Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain". *Frontiers Aging Neurosci* 2, article 12.
- Wang Y. & Qin Z. 2010. "Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death". *Apoptosis* 15, 1382-1402.
- Waxman E.A. & Lynch D.R. 2005. "N-methyl-D-aspartate subtypes: multiple roles in excitotoxicity and neurological disease". *Neuroscientist* 11,37-49.

- Wen D., Boissel J.P., Showers M., Ruch B.C. & Bunn HF. 1994. "Erythropoietin structure-function relationships. Identification of functionally important domains". *J Biol Chem* 269, 22839-22846.
- White R.J. & Reynolds, I.J. 1997. "Mitochondria accumulate Ca²⁺ following intense glutamate stimulation of cultured rat forebrain neurons". *J. Physiol.*, 498 (Pt 1), 31–47.
- Woodruff T.M.; Thundyil, J.; Tang, S.-C.; Sobey, C.G.; Taylor, S.M.; Arumugam, T.V. 2011. "Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke". *Mol. Neurodegener*, 6, 11.
- Yu B.P. 1994. "Cellular defenses against damage from reactive oxygen species". *Physiol Rev* 74,139-162.
- Yu S.Y., Wu D.C., Liu L., Ge Y. & Wang Y.T. 2008. " Role of AMPA receptor trafficking in NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in the rat lateral amígda". *J Neurochem* 106, 889-899.
- Yuan R.R., Wang B., Lu W., Marda Y. & Dowling P. 2015. "A distinct region in erythropoietin that induces immune/inflammatory modulation and tissue protection". *Neurotherapeutics*, 12, 850-861, 2015.
- Zhang YM & Bhavnani BR. 2005 "Glutamate-induced apoptosis in primary cortical neurons is inhibited by equine estrogens via down-regulation of caspase-3 and prevention of mitochondrial cytochrome c release". *BMC Neurosci* 6,13.
- Zheng X-Y., Zhang H-L., Luo Q. & Zhen J. 2011. "Kainic acid-induced neurodegenerative model. Potentials and limitations". *J Biomed Biotech*, Article ID 457079.
- Zhou M, & Baudry M. 2006. "Developmental changes in NMDA neurotoxicity reflect developmental changes in subunit composition of NMDA receptors". *J Neurosci* 26, 2956-2963.
- Zhou X., Hollern D., Liao J., Andrechek E. & Wang H. 2013. "NMDA receptor-mediated excitotoxicity depends on the coactivation of synaptic and extrasynaptic receptors". *Cell Death and Disease* 4, e560.
- Ziff E.B. "1997. Enlightening the pos-synaptic density". *Neuron* 19,1163-1174.

8. Anexos