

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**EFECTO NEUROPROTECTOR DE LA CERAMIDA
Y DE LA ESFINGOSINA 1-FOSFATO EN LA
MUERTE INDUCIDA POR ISQUEMIA.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Alba Agudo López

Bajo la dirección de la doctora

Begoña Gómez Miguel

Madrid, 2010

ISBN: 978-84-693-9232-4

© Alba Agudo López, 2010

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**EFFECTO NEUROPROTECTOR DE LA CERAMIDA
Y DE LA ESFINGOSINA 1-FOSFATO EN LA
MUERTE INDUCIDA POR ISQUEMIA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Alba Agudo López

Bajo la dirección de la doctora
Begoña Gómez Miguel

Madrid, 2010

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE BIOLOGÍA

Departamento de Bioquímica y Biología molecular I



**Efecto neuroprotector de la ceramida y de la
esfingosina 1-fosfato en la muerte inducida por
isquemia**

Alba Agudo López

TESIS DOCTORAL

Directora:

Dr. Begoña Gómez Miguel

Madrid, 2010

*A los que están, estuvieron y estarán.
Y a mi panchito, que no sé si está, estuvo o estará.*

AGRADECIMIENTOS

Hay mucha gente gracias a la cual estoy escribiendo estas líneas. Sois muchos, y no sé si me acordaré de nombraros a todos, así que pido perdón de antemano a aquellos que se me escapen.

En primer lugar gracias a Begoña, porque me acogió cuando me quedé compuesta y sin tesis y me ha dejado hacer y deshacer a mi antojo. A Inma, por su ayuda incondicional, a Lola por su risa y por sacarme a comer a esas horas intempestivas y a Ana y Edgardo por sus sabios consejos.

A los José Luises, siempre dispuestos a ayudar y siempre con una sonrisa, a Isa y al resto del departamento por su amistad, especialmente a María y a Gabriel.

Gracias al Ministerio por concederme la beca y el cambio, a Merceditas por su eficiencia, a Alfonso Vich, porque sin él sí que no estaría aquí y a Rosa por hacer lo imposible para que pudiese presentar la tesis.

Al CAI de citometría y microscopía confocal, porque sin su paciencia y ayuda esta tesis nunca habría sido posible.

A la gente del IIB, porque gracias a vosotros gané mucho más de lo que perdí. José, Teresa, Iciar, Fátima, Esther y Chema, me lo enseñasteis todo y más. Silvia, José y Mohammed, tan buena adquisición como vuestros correspondientes. A las/los palmero Lara, María, Camino, Juan, Leti, la gente del 1.7 por su apoyo Jaime, Isa, Eva, Noe, Luis, Asun, Víctor, a Juan y a Ibis por tantas cosas.

A mis niñas Isa y Merce por sus maravillosas manos y a Lidia, Ana, Nacho y Jaime que toman el testigo. A Iván y Ana José por tanto.

A mis niños de siempre: Juan, Lázaro, José, Juancar, Fernando, Ismael, Álex, Marco, Kike, Cris, Xhilda, Susana, porque siempre están ahí a pesar de que ya no soy lo que era. A Miki, Dani y Raquel por mil cosas, y a Nacho y Chapela por un verano inigualable.

A la gente de Calal: Samu, Débora, Abel, David, Vir, Vero, Javi, Tomás, Ángel, Lauri, Blanca, Javi, Vitu y Henar, por tantos recuerdos geniales.

A los biólogos: Bea, Lalu, Teresa, José, Vir, Marieta y Luisito, porque compartimos y aún seguimos compartiendo grandes momentos y son lo mejor de la carrera. A Gerardo, Iván, David, Luna y Pablo porque la YimiCola, el Genia y la pirámide cambiaron mi vida y son “difíciles” de olvidar. Al grupo 15: Maken, Isra y Sara, por introducir el

concepto de “esto no me había pasado nunca” en mi vida y del que está lleno esta tesis, por los “un momentito” y mil historias más.

A María y Sara, porque cambiaron mi vida hace tantos años ya y aún hoy la siguen cambiando.

A la gente de defensa: Pablo, Ángel, las hermanas, Nereida, Salva, Rafa, Jacobo y todos los demás, por ayudarme a combatir el estrés de la mejor forma posible.

A todas las maravillosas personas que han aterrizado en mi vida de la mano de Angelo: Blanca, Edu, Alba, Nagi, María, Miguel, Marta, Javi, Nando, Paula, Pibli, Almudena, Fer, David, Raúl, Gonzalo, Sara, Eva, Rati, Mire, Chechu, Eugenia, Rober, María, Várez, Natalia, Pablo, Rebe, Lucía, Flores, Óscar, Zapata, Juanan, Iker, Esther, Rocío, María, Paloma, Juan y muchos más.

A Margarita, Prímula, Jordi, Yoda, Iris, Zeus, Misi, Misina, Noar, Rayitas, Bibí, Chispita, Cori, Flora, el oso rosa, el Lunni, y tantos más por los mejores achuchones.

A mi familia. A mi abuelo Félix, porque no se puede ser tan bonito, a mi abuela Isabel, que es quien más habría disfrutado con esta tesis, a mi abuela Marina, siempre dispuesta y a mi abuelo Guillermo, no os olvido.

A mis tíos, primos y demás familia: Eduardo, Elisa, Alberto, Belén, Blanca, Eva, Cristina, Gregoria, Piedad, Jesús, Carmen madre e hija, Conchi, Pepe, Eloy, Pedro Miguel, Paula y especialmente a Laura por tantas cosas compartidas. A Geni, Manolo padre e hijo, Charo, Guille y Dani porque sois increíbles. Y a los recién llegados: Emilio, M^a José, Águeda y Sandra, porque realmente sois familia y no una etiqueta.

A mi padre, que me lo ha dado todo y más siempre. A mi hermano, la mejor persona que existe y quien más me hace sufrir sin duda, no se puede ser tan bueno en esta vida.

A Pepa, porque madre no hay más que una y yo he tenido la suerte de tener dos. Y a mi madre, porque era especial y se fue demasiado pronto.

Y finalmente a Angelo, por ser tan inconsciente como para querer compartir cada día conmigo.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1 ESFINGOLÍPIDOS	5
Ceramida.....	7
Esfingosina 1-fosfato.....	8
1.2 LA FAMILIA DE PROTEÍNA QUINASAS C	10
1.3 ISQUEMIA CEREBRAL.....	12
Factores inducibles por hipoxia (HIFs)	20
Protección frente a la isquemia/recuperación.....	21
2. OBJETIVOS	24
3. MATERIALES Y MÉTODOS	26
3.1 CULTIVO CELULAR	27
3.2 EXPERIMENTACIÓN GENERAL	28
3.3 MODELO DE ISQUEMIA <i>IN VITRO</i>	28
3.4 MUERTE CELULAR	28
Ensayo de viabilidad celular por MTT	28
Medida de los tipos de muerte por citometría de flujo	29
3.5 ANÁLISIS PROTEICO	30
Separación de fracciones de citosol, membrana, núcleo y mitocondrias	30
Western blot.....	31
3.6 MEDIDA DE ACTIVIDAD DE CASPASA 3	32
3.7 EXPRESIÓN GÉNICA	32
Extracción del RNA	32
RT-qPCR	32
3.8 SILENCIAMIENTO DEL RNA	33
3.9 MICROSCOPIA CONFOCAL	34
Apertura del poro de transición mitocondrial.....	34
Potencial de membrana mitocondrial	35
Medida del calcio mitocondrial	35
3.10 MEDIDA DEL HINCHAMIENTO MITOCONDRIAL (<i>SWELLING</i>).....	36
Aislamiento de las mitocondrias	36
Medida del <i>swelling</i> mitocondrial	36
3.11 COMPOSICIÓN DE TAMPONES.....	37
Tampón de isquemia.....	37
PBS	37
Tampón de lisis.....	37
Tampón de extracción mitocondrial.....	37
Tampón de Laemmli 1X.....	37
Medio de unión para citometría.....	38
Tampón de lisis de caspasas	38
Tampón de ensayo de caspasas	38
Tampón de carga	38
Tampón de aislamiento mitocondrial	38
3.12 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	39
4. RESULTADOS	40
Acción de la ceramida y de la esfingosina 1-fosfato en la protección de la muerte inducida por isquemia y recuperación.....	41
Acción protectora de la ceramida y de la esfingosina 1-fosfato en la apoptosis y en la necrosis	43

Rutas de señalización implicadas en la acción de la ceramida y de la esfingosina 1-fosfato	45
Papel diferencial de las diferentes isoformas de PKC en la acción protectora de ceramida y esfingosina 1-fosfato	45
Papel de la actividad caspasa en la acción protectora de ceramida y esfingosina 1-fosfato	51
La ceramida impide la sobrecarga de calcio mitocondrial durante la isquemia a través de ROS y del mPTP	54
Efecto protector de la esfingosina 1-fosfato de las alteraciones inducidas por la isquemia en la mitocondria.....	59
Papel de HIF en la protección a largo plazo producida por los esfingolípidos	64
5. DISCUSIÓN	66
5.1 MODELO DE ISQUEMIA: PRIVACIÓN DE LA GLUCOSA Y DEL OXÍGENO	67
5.2 PROTECCIÓN POR LA CERAMIDA.....	68
La ceramida protege durante el preconditionamiento, la isquemia y la recuperación	68
La ceramida protege de la apoptosis y de la necrosis.....	69
La ceramida protege a largo plazo a través de HIF	76
5.3 PROTECCIÓN POR LA ESFINGOSINA 1-FOSFATO.....	76
La esfingosina 1-fosfato protege en preconditionamiento, durante la isquemia y en la recuperación.....	77
La protección de la esfingosina 1-fosfato está mediada por receptor.....	78
La esfingosina 1-fosfato moviliza el calcio mitocondrial durante la isquemia y reduce el disparo de ROS en la recuperación	82
La esfingosina 1-fosfato protege a largo plazo a través de HIF	83
6. CONCLUSIONES	86
7. BIBLIOGRAFÍA	88
8. ARTÍCULOS PUBLICADOS	110

ABREVIATURAS

5HD: 5-hidroxicanoato
AM: actoximetiléster
ANT: Transportador de nucleótidos de adenina
aPKC: PKC atípicas
bHLH: Hélice-lazo-hélice básico
BSM: *Bisindolylmaleimide*
CAPK/KSR: Proteína quinasa activada por ceramida
cPKC: PKC clásicas
CsA: Ciclosporina A
DAG: Diacilglicerol
DHR: Dihidrorodamina
H₂O₂: Peróxido de hidrógeno
HIF: Factor inducible por hipoxia
HRE: Elemento de respuesta a hipoxia
I/R: Isquemia/recuperación
IE: Péptido inhibidor de la activación de ERK
MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos
mitoK_{ATP}: Canal de potasio mitocondrial dependiente de ATP
mPTP: Poro de transición de la permeabilidad mitocondrial
MTT: Sal de tetrazolio
NO: Óxido nítrico
nPKC: PKC nuevas
O₂^{·-}: Anión superóxido
ODD: Dominio de degradación dependiente de oxígeno
OGD: Privación de oxígeno y glucosa
PDK-1: Proteína quinasa dependiente de fosfoinosítidos 1
PHD: Prolil-hidroxilasas
PI3K: Fosfatidil inositol 3 quinasa
PKA: Proteína quinasa A
PKB: Proteína quinasa B
PKC: Proteína quinasa C
pmf: Fuerza protón motriz
PS: Péptido pseudosustrato inhibidor de PKC ζ

PTX: Toxina pertussis
QH: Semiubiquinona
QH₂: Quinona
RNS: Especies reactivas de nitrógeno
ROS: Especies reactivas de oxígeno
S1P: Esfingosina 1-fosfato
S1PR: Receptor de S1P
siRNA: RNA de interferencia
SMasa: Esfingomielinasa
SPPasa: Esfingosina fosfato fosfatasa
TMRM: Tetrametilrodamina metil éster
TTBS: Tampón Tris con Tween-20
V1-2: Péptido inhibidor de la translocación de PKC ϵ
VDAC: Canal aniónico dependiente de voltaje
vHL: Proteína von Hippel-Lindau
WT: *Wortmannin*

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ESFINGOLÍPIDOS

Los esfingolípidos son constituyentes esenciales de las células eucariotas. Fueron descubiertos en 1876 por J. L. W. Thudichum y durante mucho tiempo se consideró que su función en la formación de las membranas era únicamente estructural. Sin embargo, el estudio de su metabolismo y función ha revelado que algunos miembros de la familia de los esfingolípidos como la ceramida, la esfingosina o la esfingosina 1-fosfato (S1P), además de realizar una función estructural en las membranas celulares tienen una función activa en procesos de regulación y vías de transducción de señales como la regulación del crecimiento celular, la diferenciación, la senescencia y la apoptosis ¹. Además, los esfingolípidos pueden agruparse dinámicamente en las membranas celulares con esteroides para formar microdominios lipídicos o *rafts*, los cuales funcionan como centros de transducción de señales y organización de proteínas ².

Como todos los lípidos de membrana, los esfingolípidos son moléculas anfipáticas. La región hidrófoba consiste en una larga cadena base esfingoide, normalmente esfingosina, esfinganina o fitoesfingosina, a la que se une un ácido graso por una unión amida al carbono 2 (C₂). El esfingolípidos más simple es la ceramida ³. Su región hidrófila es mínima (dos grupos OH) en comparación con otros esfingolípidos más complejos, como es el caso del grupo fosfato de la S1P o los residuos de azúcar en los glicosfingolípidos ⁴.

La vía metabólica de los esfingolípidos presenta una intrincada red de reacciones que conducen a la formación de una gran diversidad de esfingolípidos, siendo la ceramida el centro de la biosíntesis y del catabolismo y precursor de esfingolípidos complejos ^{1,5}.

Los esfingolípidos pueden sintetizarse *de novo* en el retículo endoplásmico liso a partir de serina y palmitato, que condensan gracias a la serin palmitoil transferasa para formar 3-cetodihidroesfingosina, la cual tras diversas reacciones en las que intervienen varias enzimas, acaba generando ceramida ⁵⁻⁸.

La ceramida también puede generarse por la hidrólisis de la esfingomielina a través de la acción de las esfingomielinasas (SMasas), que rompen la esfingomielina generando ceramida y fosfocolina ⁹. Se conocen cinco tipos de SMasas, que se clasifican en función de su pH óptimo y su dependencia de cationes. Así, hay una SMasa ácida lisosomal y su forma secretada dependiente de Zn²⁺, una alcalina y dos formas neutras,

de las cuales una está unida a membranas y es dependiente de Mg^{2+} y otra es independiente de Mg^{2+} . Se localizan en la membrana plasmática y en el retículo endoplásmico, aunque también se encuentran en lisosomas, citosol y núcleo. La presencia de esfingolípidos (incluyendo ceramida y esfingomielina), y de ceramida sintasa y ceramidasa en las mitocondrias ^{10,11} sugiere la existencia de una ruta de esfingomielina mitocondrial, pero hasta el momento no se ha localizado SMasa en las mitocondrias ¹².

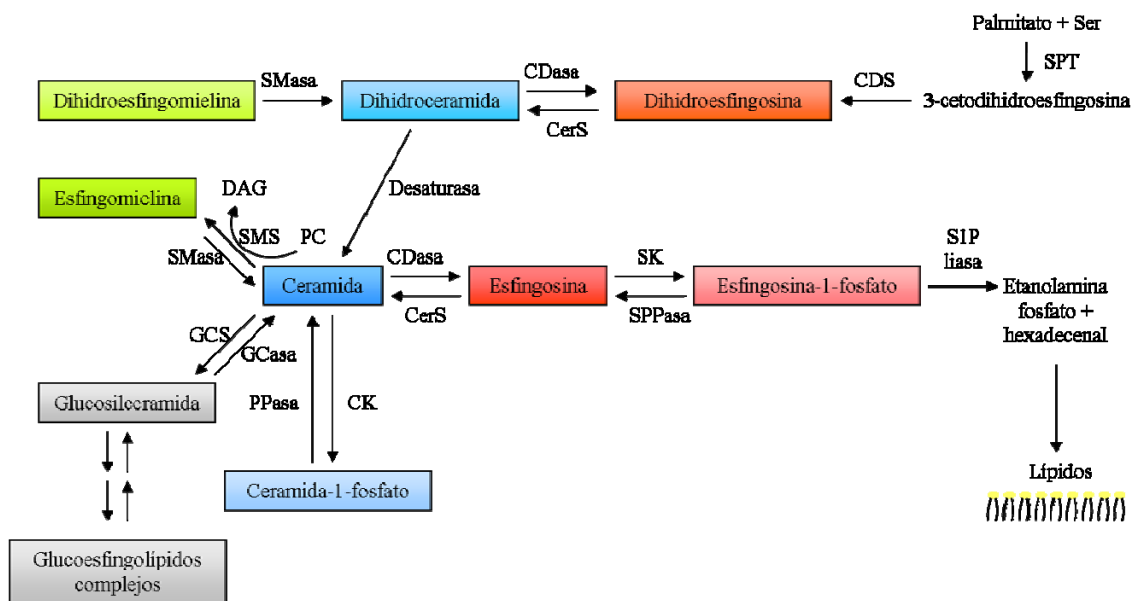


Figura 1. Metabolismo de los esfingolípidos. La ceramida se considera el centro del metabolismo de los esfingolípidos. Se sintetiza *de novo* a partir de la condensación de palmitato y serina para formar 3-cetodihidroesfingosina por la serin palmitoil transferasa (SPT). La 3-cetodihidroesfingosina es reducida en dihidroesfingosina por la 3-cetodihidroesfingosina reductasa (CDS) y acilada por la ceramida sintasa (CerS) para formar dihidroceramida, que forma ceramida por acción de las desaturasas. Desde aquí, la ceramida puede convertirse en otras especies lipídicas interconectadas. La única salida de la vía de los esfingolípidos está mediada por la esfingosina 1-fosfato liasa (S1P liasa), que metaboliza la S1P. CD: ceramidasa; CDS: 3-cetodihidroesfingosina reductasa; CK: ceramida quinasa; DAG: diacilglicerol; GCasa: glucosil-ceramidasa; GCS: glucosilceramida sintasa; PC: fosfatidilcolina; SK: esfingosina quinasa; SMasa: esfingomielinasa; SMS: esfingomielina sintasa; SPPasa: esfingosina fosfato fosfatasa; SPT: serin palmitoil transferasa. Adaptado de ¹³.

En el aparato de Golgi la ceramida puede ser fosforilada, glicosilada o recibir un grupo de fosfocolina para formar esfingolípidos más complejos. Todas estas reacciones son reversibles, pues existen enzimas que las catalizan en ambas direcciones, por lo que se puede regenerar la ceramida para que pueda seguir otra ruta de biosíntesis ¹⁴⁻¹⁶. Además, la ceramida puede romperse por la acción de ceramidasa formándose esfingosina,

activa por sí misma y que también puede dar lugar a S1P o entrar en la vía de recuperación (*salvage*), donde se recicla en otras vías de esfingolípidos. Asimismo, la S1P puede desfosforilarse generando de nuevo esfingosina o romperse irreversiblemente por la S1P liasa para generar etanolamina fosfato y hexadecenal, el cual puede ser reducido a palmitato reincorporándose a la síntesis *de novo*¹⁷⁻²⁰ (Figura 1).

El metabolismo de los esfingolípidos puede regularse en múltiples niveles, desde el control de la expresión de las enzimas implicadas en su síntesis hasta modificaciones post-traduccionales o mecanismos alostéricos. Algunos de los mismos son dependientes del tipo celular y pueden responder a señales específicas⁴. Muchos tipos de estrés, como la isquemia y la recuperación, el TNF- α o el estrés oxidativo activan la formación de ceramida y otros esfingolípidos, activando las SMasas, la síntesis *de novo* y la vía de recuperación²¹⁻²³.

En la regulación de los esfingolípidos son muy importantes los citados *rafts*, ya que no sólo son abundantes en esfingolípidos, sino que en ellos se localizan muchas de las enzimas de las rutas metabólicas de los esfingolípidos, como las SMasas. De este modo, diversas señales convergen en estos microdominios, induciendo la formación de unos esfingolípidos u otros, lo que desencadena distintas respuestas celulares⁴.

Ceramida

El término ceramida se aplica a una familia de moléculas formadas por un esqueleto de esfingosina unido a través de su C₂ a un ácido graso de cadena variable por un enlace amida²⁴. El estado de saturación y/o hidroxilación, así como la longitud de la cadena del ácido graso, confieren características específicas a cada ceramida, pudiendo ejercer funciones distintas^{23,25}. Así, por ejemplo, las ceramidas de cadena larga (C16) parecen estar implicadas en procesos de apoptosis, mientras que en el caso de ceramidas de cadena corta no está tan clara su función en este proceso⁴. En este trabajo se ha empleado C₂-ceramida o N-acetilesfingosina. (Figura 2).

La ceramida es el centro de la ruta biosintética de los esfingolípidos, ya que es el precursor de todos los esfingolípidos y un intermediario común en el proceso de transformación de un esfingolípidos a otro. Por esta razón es difícil medir las acciones

intracelulares de la ceramida, ya que su concentración puede variar continuamente o puede estar observándose la respuesta producida por un esfingolípido formado a partir de la ceramida y no de la propia ceramida.

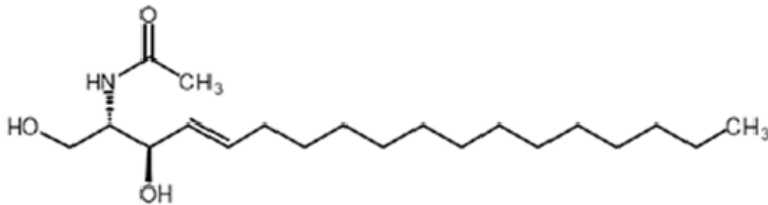


Figura 2. Estructura de la C2-ceramida.

La señalización por ceramida se ha relacionado con la regulación del crecimiento celular, la diferenciación ²⁶, la senescencia ²⁷, la necrosis ²⁸, la proliferación ²⁹ y la apoptosis ³⁰ (revisado en ¹). Así, muchos inductores de estrés aumentan los niveles endógenos de ceramida y la adición de ceramida puede igualmente activar estos procesos.

Por otro lado, se ha visto que la ceramida puede interactuar con muchas proteínas, tanto quinasas como PKC ζ (proteína quinasa C ζ) ³¹ y CAPK/KSR (proteína quinasa activada por ceramida) o fosfatasa como PP1 y PP2A ^{5,32-35}. Además, la ceramida es un activador de la cascada de JNK ^{36,37}.

Esfingosina 1-fosfato

La S1P se forma por la fosforilación de la esfingosina por acción de las esfingosina quinasas (SK1 y SK2) y puede ser desfosforilada para regenerar esfingosina por la esfingosina fosfato fosfatasa (SPPasa) o ser escindida por la S1P liasa de forma irreversible para generar hexadecenal y etanolamina fosfato, saliendo del ciclo de los esfingolípidos ^{17-20,38} (revisado en ¹³) (Figura 3).

Gracias a su estructura simple de una única cadena y a su grupo fosfato, es uno de los esfingolípidos más solubles, lo que permite que pueda moverse fácilmente entre membranas equilibrándose rápidamente su concentración. En las células se encuentra en concentraciones bajas, del orden nanomolar, lo que permite que modificaciones en su

concentración sirvan de señalización para activar distintos procesos, como ocurre con otros segundos mensajeros ¹³.

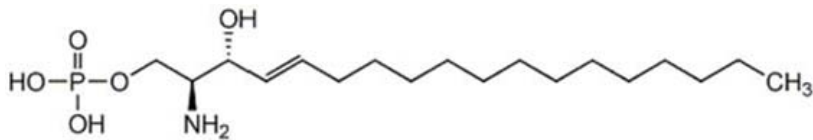


Figura 3. Estructura de la S1P.

En los mamíferos la S1P parece actuar como un ligando de receptor, una molécula de señalización intracelular y un intermediario de la conversión de esfingolípidos a glicerofosfolípidos. De estas tres funciones principales, la más conocida es la de ligando de receptor. Hasta ahora sólo se han identificado receptores de membrana de alta afinidad ($k_d = 2-63$ nM) acoplados a proteínas G (S1PRs), de los cuales se conocen por el momento 5 tipos ³⁹⁻⁴³. Estos receptores tipos (S1PR₁₋₅) se expresan de forma diferencial en función del tejido (S1P₁, S1P₂ y S1P₃ se expresan ubicuamente, S1P₄ en tejidos linfoides y S1P₅ en la piel y en el cerebro) ⁴⁴⁻⁴⁶, lo que es crucial para sus funciones biológicas, y activan vías intracelulares mediadas por MAPK (proteínas quinasas activadas por mitógenos), PI3K (fosfatidil inositol 3 quinasa) o PKC. Los S1PRs están acoplados a proteínas G específicas para cada receptor de los tipos G_i, G_q y G_{12/13}, siendo las G_i las más comunes, cuya acción se inhibe con la toxina pertussis (PTX). En función de a qué receptor se une la S1P y a qué proteína G esté acoplado éste, se activan distintas vías de señalización que conducen a respuestas celulares diferentes ⁴⁷⁻⁵⁰.

En cuanto a la función de la S1P como segundo mensajero, no se ha encontrado ninguna diana molecular, pero teniendo en cuenta que muchas de las respuestas inducidas por la S1P como señalizador intracelular se asemejan a las respuestas inducidas por la S1P como ligando de los S1PRs, se cree que es posible que la S1P sea liberada al exterior de la célula de forma autocrina o paracrina para unirse a sus receptores y así iniciar la cascada de señalización. Sin embargo, en otras ocasiones las funciones intracelulares de la S1P parecen ser independientes de los S1PRs ^{13,25}.

Entre las respuestas inducidas por la S1P se encuentran la regulación de la proliferación, el crecimiento, la supervivencia y la migración celular, la inflamación, la angiogénesis,

la vasculogénesis y la resistencia a la apoptosis. En general, parece antagonizar los efectos de la ceramida, normalmente relacionada con la inhibición del crecimiento, la senescencia o la inducción de la muerte celular¹.

1.2 LA FAMILIA DE PROTEÍNA QUINASAS C

Las PKCs son una familia multigénica de serina/treonina quinasas que se encuentran implicadas en muchas vías de transducción de señales^{51,52}.

Las PKCs forman parte de la superfamilia de proteína quinasas ABC, que incluye la proteína quinasa A (PKA), la proteína quinasa B (PKB) o Akt y las PKCs⁵³. Como todos los miembros de esta superfamilia, las PKCs tienen un dominio regulador en su región N-terminal y un centro quinasa altamente conservado en la región C-terminal, donde se encuentra el centro de unión al sustrato y al ATP. Además, en el dominio quinasa se localizan el motivo de giro y el hidrofóbico, que son motivos de autofosforilación. El dominio regulador realiza dos funciones, por una parte se une a las distintas dianas celulares y por otra inhibe el centro activo de la enzima a través de la región pseudosustrato autoinhibitoria que contiene⁵⁴. Además, las PKCs, como todas las quinasas ABC, contienen un bucle de activación de treonina que es fosforilado por la quinasa dependiente de fosfoinosítidos 1 (PDK-1) preparando a las PKCs para su activación^{54,55}. Una vez fosforiladas por la PDK-1, se mantienen en un estado autoinhibido hasta que segundos mensajeros las activan⁵⁶.

Existen al menos 10 isoformas de PKCs, que se dividen en tres grupos en función de su estructura primaria⁵³: las PKCs convencionales o clásicas (cPKC), las PKCs nuevas (nPKC) y las PKCs atípicas (aPKC).

El primer grupo (cPKCs) está formado por las isoformas α , β I, β II (formada por *splicing* alternativo de β I) y γ . El dominio regulador de estas isoformas contiene un dominio C1 formado por dos secuencias en tándem (C1A y C1B) de unos 50 aminoácidos cada uno con 6 Cys y 2 His que coordinan dos átomos de Zn^{2+} , formando dos dedos de zinc, los cuales funcionan como punto de unión del diacilglicerol (DAG) y de ésteres de forbol como ligando no natural. También tienen un dominio C2 que une calcio⁵⁴.

Las isoformas del segundo grupo (nPKCs) a su vez pueden subdividirse en dos grupos en función de sus características estructurales, uno formado por δ y θ y otro por ϵ y η .

Estas enzimas también presentan los dominios C1 y C2, aunque su distribución a lo largo de la estructura primaria está invertida en relación con el de las cPKCs. Los dominios C2 de las nPKCs no unen calcio, no teniendo ningún ligando conocido. Se cree que al no tener sensor de calcio, estas PKCs se translocan y activan de forma distinta a las cPKCs ⁵⁴.

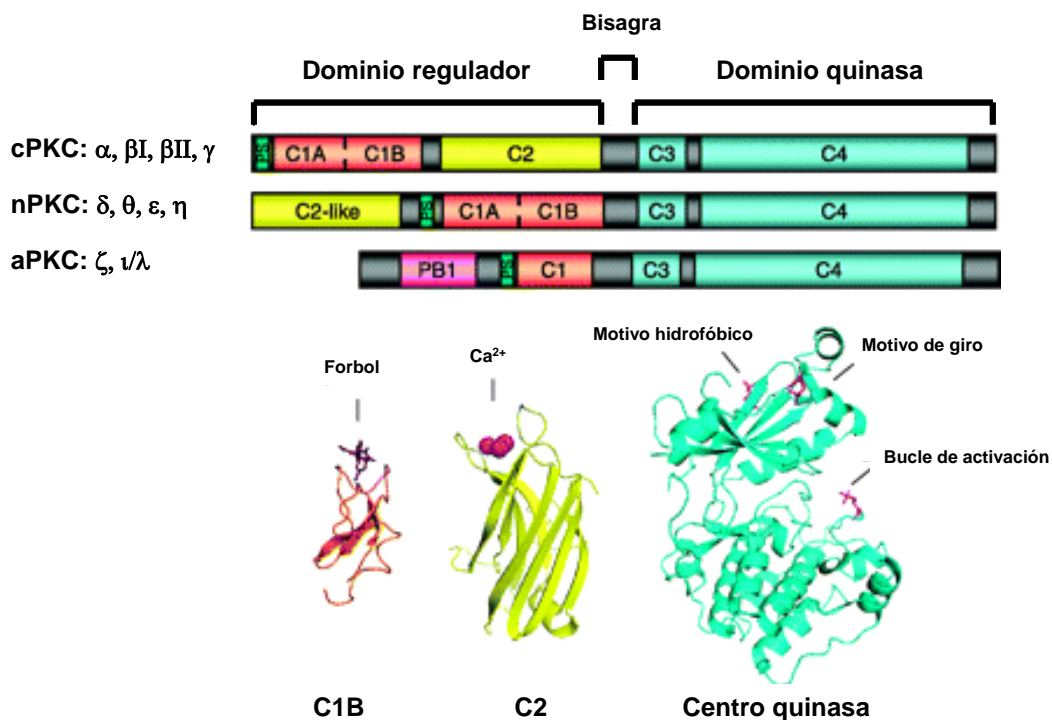


Figura 4. Estructura de las isoformas de las PKCs. Arriba: Las PKCs tienen un dominio quinasa (turquesa) conservado y dominios reguladores más variables. Todos los dominios reguladores tienen un motivo pseudosustrato (verde; PS) en el extremo N-terminal del dominio C1 (rosa). Los dominios C1 dispuestos en tándem son los sensores moleculares de DAG en las cPKCs y las nPKCs, mientras que el único dominio C1 de las aPKCs no une DAG. Los dominios C2 (amarillos) unen calcio en las cPKCs, pero no en las nPKCs. El dominio tipo C2 (C2-like) de las nPKCs es un módulo de interacción de fosfotirosina. En gris se muestran las regiones variables en función de la isoforma. Abajo: Diagramas de la estructura de los dominios C1B, C2 y el dominio quinasa. Adaptado de ⁵⁵.

El tercer grupo (aPKCs) está formado por las isoformas ζ, ι y λ . Estas PKCs no tienen un dominio C2 sensible a calcio y tienen un dominio C1 atípico con sólo una estructura rica en Cys de unión a membrana, que une ceramida pero no DAG como en los otros dos grupos, por lo que no requieren ni calcio ni DAG para su activación. Además, no tienen el residuo de Ser/Thr conservado en el extremo C-terminal, que es un centro importante de fosforilación en las cPKCs y en las nPKCs. Asimismo, presentan un

dominio PB1 de interacción proteína-proteína que media interacciones con otras proteínas que también contienen un dominio PB1 ^{57,58} (Figura 4).

La mayoría de las isoformas de PKCs son ubicuas y muchas células expresan varias isoformas a la vez ⁵⁵.

Las PKCs recién sintetizadas presentan una conformación abierta que permite que la PDK-1 se una al motivo hidrofóbico del dominio quinasa y fosforile a la PKC en el bucle de activación, soltándose después. Una vez fosforilada en el bucle de activación, la PKC se autofosforila en los motivos de giro e hidrofóbico, estabilizándose en una conformación cerrada que permite que la región pseudosustrato N-terminal contacte con el punto de unión del sustrato en un bucle inhibitorio, inhibiendo la enzima hasta que sea activada por segundos mensajeros ^{59,60}. Una vez activadas las PKCs pueden translocarse a distintas sublocalizaciones, como la membrana plasmática, el núcleo, el aparato de Golgi o las mitocondrias, donde ejercerán su función fosforilando diversas proteínas ⁶¹⁻⁶⁵. Parece que en la translocación de las PKCs intervienen unas proteínas de anclaje asociadas a membrana conocidas como RACKs. Estas proteínas parecen actuar como unión de las PKCs para localizarlas en distintos microdominios cerca de sus activadores alostéricos y de sus sustratos unicelulares. Se ha propuesto que las células expresan un único RACK, con distinta localización subcelular, para cada isoforma de PKC, y que las interacciones PKC-RACK son esenciales para la respuesta celular ⁶⁶.

Las PKCs se han implicado en muchos procesos celulares como diferenciación, proliferación, migración y muerte celular. En general, se ha visto que las cPKCs y las aPKC suelen tener funciones antiapoptóticas, mientras que en las nPKCs existen diferencias según la isoforma. Así, por ejemplo, PKC ϵ está implicada en supervivencia, migración y proliferación y PKC δ , sin embargo, es activada por muchos inductores de muerte ⁶⁷.

1.3 ISQUEMIA CEREBRAL

La isquemia cerebral es un trastorno neurológico originado por la disminución brusca del aporte sanguíneo hasta unos niveles que resultan insuficientes para mantener el metabolismo y funciones normales de las células cerebrales. Es una de las principales causas de muerte e incapacidad de los países desarrollados. Puede suceder por

diferentes causas, como una parada cardíaca, una oclusión arterial o una hemorragia cerebral. El resultado es que el riego sanguíneo se interrumpe, produciéndose la isquemia. Debido a la falta de glucosa y oxígeno no se puede mantener la homeostasis celular, produciéndose diversos efectos como desequilibrio iónico, excitotoxicidad, aumento de la concentración de calcio, desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, disminución de la concentración de ATP y estrés oxidativo, lo que termina provocando finalmente la muerte de la célula por apoptosis o necrosis ^{68,69}.

Si la isquemia se prolonga varios minutos, las neuronas de la zona más afectada sufren un daño irreversible y mueren por necrosis. Sin embargo, en las regiones que rodean a esta región (zona de penumbra) existe un cierto riego sanguíneo y por lo tanto la intensidad de la isquemia es menor, de modo que aunque el metabolismo se detiene, disminuyen las propiedades de excitabilidad eléctrica neuronales y se perturban los gradientes iónicos, se produce menos daño y las células mueren fundamentalmente por apoptosis e incluso se pueden recuperar si se restablece el flujo sanguíneo ^{70,71}.

Durante la isquemia, debido a la hipoxia, se produce el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa en las mitocondrias, de modo que no se puede generar ATP por este proceso. Esto provoca un descenso de la concentración de ATP con un aumento concomitante de la concentración de ADP, AMP y fosfato inorgánico. La glicolisis continúa con la glucosa remanente para proporcionar una mínima cantidad de ATP que resulta insuficiente. Además, el ácido láctico formado en el proceso se acumula, descendiendo el pH de la célula, lo que inhibe la glicolisis y activa el antiporter Na^+/H^+ para eliminar el exceso de protones. En consecuencia, aumenta la concentración de Na^+ , que además no puede ser bombeado al exterior de la célula de nuevo a través de la Na^+/K^+ ATPasa debido a la falta de ATP. En condiciones normales esta bomba mantiene las concentraciones intracelulares de potasio y de sodio necesarias para la propagación de los potenciales de acción (elevada en el caso del potasio y reducida en el caso del sodio), por lo que al dejar de funcionar provoca la despolarización de la membrana, la liberación de potasio y la entrada de sodio a la célula ^{72,73}. Este aumento en la concentración de sodio provoca que el antiporter $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, que normalmente expulsa calcio al exterior de la célula utilizando el gradiente de sodio, se inhiba o funcione en sentido contrario, aumentando la concentración intracelular de calcio. Además, la falta de ATP inhibe a las Ca^{2+} ATPasas de la membrana plasmática y del retículo

endoplásmico, contribuyendo al aumento de la concentración de calcio.⁷³ Asimismo, el exceso de sodio provoca el funcionamiento al revés de los transportadores de glutamato, lo que conduce a la activación de sus receptores NMDA y AMPA. Estos receptores, fundamentalmente los de NMDA, son permeables al calcio, por lo que su apertura aumenta la despolarización de membrana y contribuye al aumento de calcio intracelular y a la excitotoxicidad^{74,75}. La activación de los receptores metabotrópicos también contribuye al aumento de calcio (Figuras 5, 6 y 7).

La mitocondria actúa como un reservorio de calcio, tamponando la concentración de calcio citosólico, ya que un exceso de calcio en el citosol provoca la activación de las proteasas, lipasas y DNAsas dependientes de calcio y, en consecuencia, la muerte de la célula⁶⁸. Así, el aumento del calcio citosólico conlleva un aumento del calcio mitocondrial al entrar éste a la mitocondria a favor de gradiente electroquímico a través del uniporter de calcio^{76,77}.

La salida de calcio de la mitocondria está mediada por el transportador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y por un mecanismo independiente de sodio que parece ser un transportador $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$. Existe un alto acoplamiento de los gradientes de sodio y H^+ por el transportador Na^+/H^+ , de modo que el gradiente de sodio es similar al gradiente de protones. En la isquemia se ralentiza la cadena respiratoria por la falta de O_2 , por lo que disminuye el bombeo de protones hacia el citosol y la membrana se despolariza, ya que el gradiente de pH es el principal componente del potencial de membrana. El descenso del gradiente de pH conlleva un descenso del gradiente de sodio, lo que contribuye al aumento de la concentración de calcio mitocondrial al ser menor la fuerza de extrusión del mismo en los dos sistemas de salida de calcio^{78,79}.

En estas condiciones de sobrecarga de calcio mitocondrial, especialmente si va acompañado de otros factores que sensibilizan a esta elevada concentración de calcio, como es la falta de nucleótidos de adenina, una alta concentración de fosfato inorgánico y fundamentalmente estrés oxidativo⁷³ (eventos que suceden en la isquemia y en la recuperación) se produce un aumento de la permeabilidad mitocondrial conocido como transición de la permeabilidad mitocondrial, debido a la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (mPTP). Sin embargo, aunque durante la isquemia se producen muchos de los factores necesarios para la apertura del mPTP, ésta no sucede

porque el estrés oxidativo no es muy alto y el bajo pH inhibe la apertura del mPTP, probablemente porque los protones compiten con el calcio^{80,81} (Figuras 5, 6 y 7).

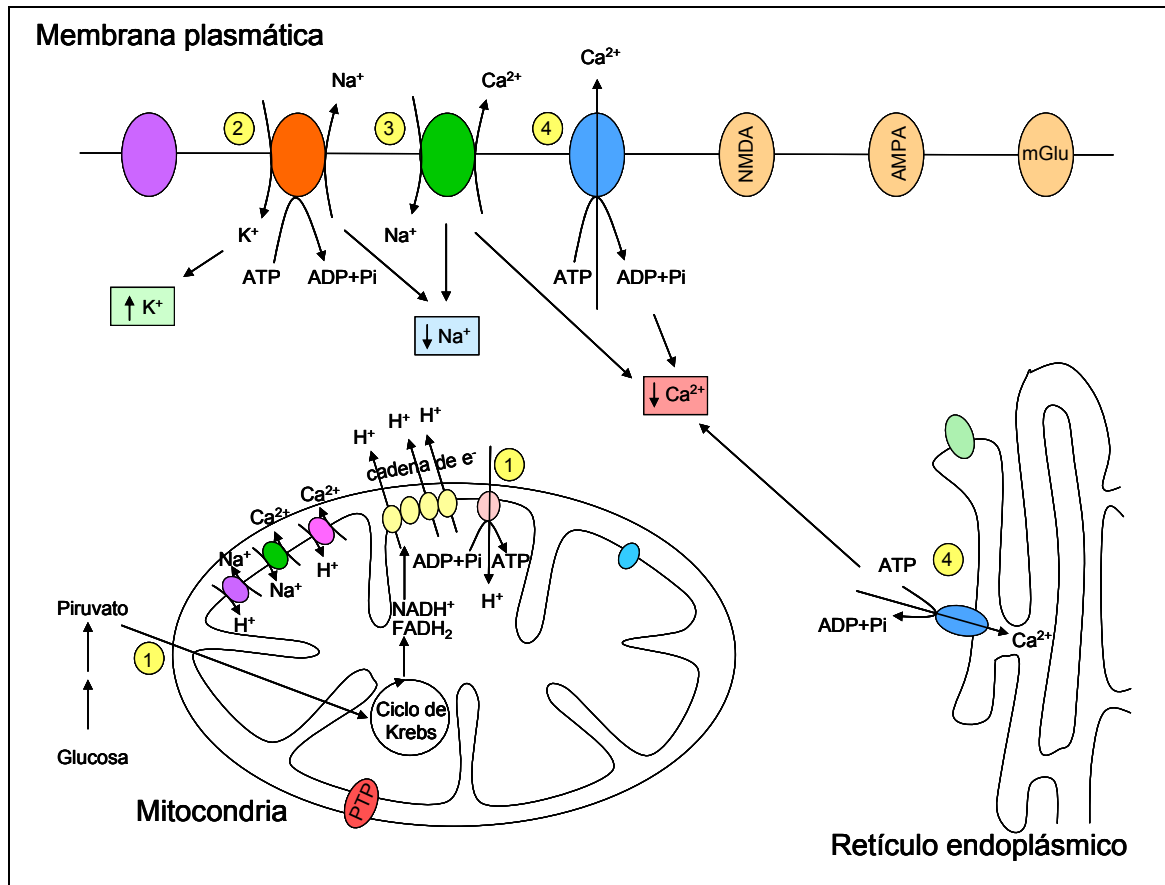


Figura 5. Condiciones normales. (1) En condiciones normales la mayor parte del ATP se forma por la fosforilación oxidativa en la mitocondria. (2) Parte de este ATP es utilizado por la K^+/Na^+ ATPasa de la membrana plasmática, que mantiene las concentraciones intracelulares de potasio y de sodio necesarias para la propagación de los potenciales de acción (elevada en el caso del potasio y reducida en el caso del sodio). (3) El gradiente de sodio generado por la K^+/Na^+ ATPasa es utilizado por el transportador Na^+/Ca^{2+} para mantener una baja concentración de calcio intracelular, ayudado por las Ca^{2+} ATPasas de la membrana plasmática y del retículo endoplásmico (4).

El mPTP es un poro no selectivo permeable a cualquier molécula menor de 1,5 kDa cuya apertura tiene dos consecuencias fundamentales. La primera es el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, ya que el aumento de la permeabilidad de la mitocondria provoca la disipación de los dos componentes de la fuerza protón motriz (pmf): el gradiente de pH producido en la cadena de transporte de electrones y el potencial de membrana mitocondrial. En ausencia de pmf la ATPasa no puede sintetizar ATP e incluso puede funcionar en sentido contrario, produciendo su hidrólisis. La

consecuencia es que las mitocondrias no pueden mantener sus niveles de ATP, lo que resulta en un trastorno del metabolismo y de la homeostasis iónica que conduce a la muerte por necrosis⁸²⁻⁸⁴.

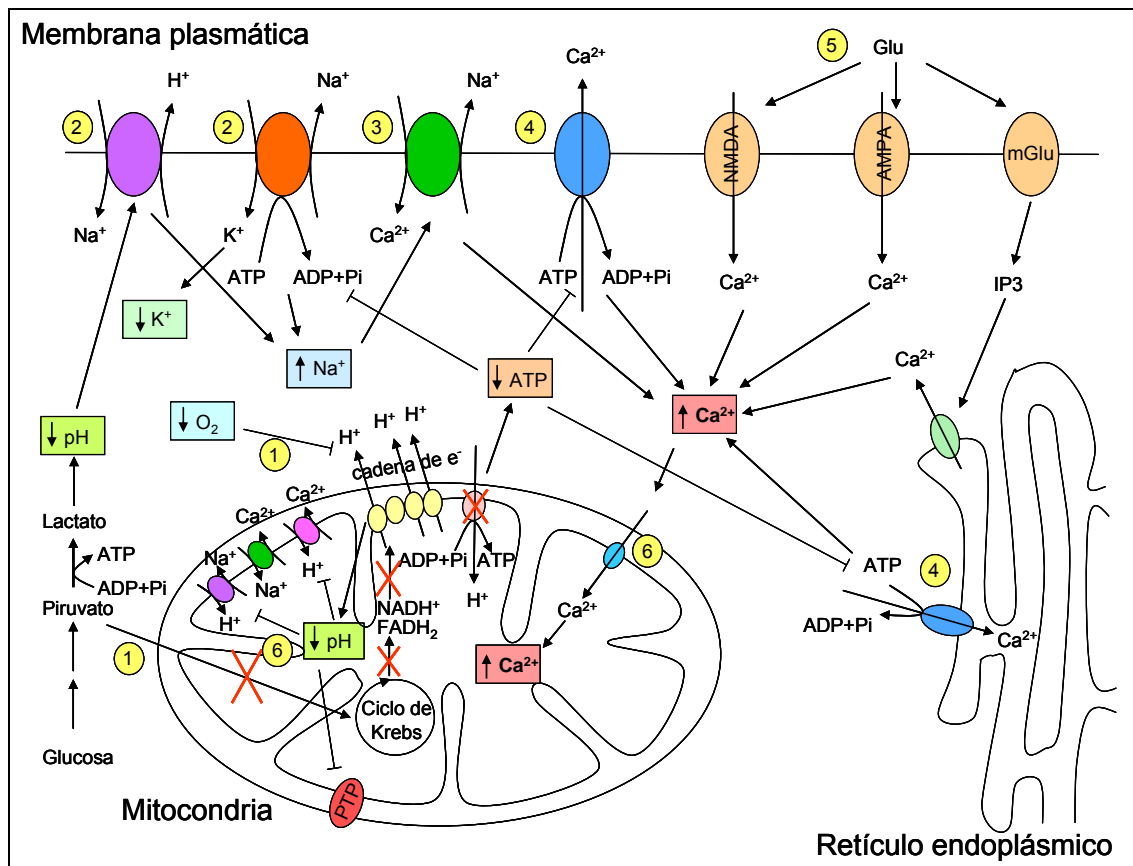


Figura 6. Isquemia. (1) Durante la isquemia la hipoxia inhibe la cadena de electrones (cadena de e^-) de la mitocondria, desacoplándose la fosforilación oxidativa. Los niveles de ATP disminuyen y se activa la glicolisis, lo que conduce a un descenso del pH en el citosol. (2) El descenso del pH activa el transportador Na^+/H^+ , que junto con la inhibición de la K^+/Na^+ ATPasa, provoca un aumento de la concentración citosólica de sodio y un descenso de la de potasio, despolarizándose la membrana plasmática. (3) El exceso de sodio provoca que la $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ funcione al revés, aumentando la concentración intracelular de calcio. (4) Al aumento de la concentración de calcio contribuyen la inhibición de las Ca^{2+} ATPasas de la membrana plasmática y del retículo endoplásmico, así como la activación de los receptores de Glu, cuya liberación está favorecida por el exceso de sodio (5). (6) El aumento de calcio intracelular provoca el aumento de la concentración de calcio mitocondrial al entrar el calcio por el uniporter de calcio y no poder salir ni por los transportadores ni por el mPTP (PTP), todos ellos inhibidos por el descenso de pH producido por la inhibición de la cadena electrónica.

La segunda consecuencia de la apertura del mPTP es el hinchamiento (*swelling*) de la mitocondria. El aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial a moléculas pequeñas causa el equilibrio de osmolitos de bajo peso molecular, mientras que las proteínas, de mayor peso molecular, se mantienen en sus respectivos compartimentos.

El resultado es que debido a la elevada concentración de proteínas de la matriz se ejerce una presión osmótica coloidal que provoca el hinchamiento de la matriz al entrar agua. Éste se produce sin dañar la membrana mitocondrial interna, la cual se despliega, pero si es continuado termina provocando la ruptura de la membrana mitocondrial externa, más rígida. Esto provoca la liberación de proteínas proapoptóticas mitocondriales como el citocromo c, que desencadenan la apoptosis activando vías dependientes e independientes de caspasas^{73,82,85-87}. Sin embargo, sólo si los mPTP vuelven a cerrarse lo suficiente como para mantener los niveles de ATP, predominará la muerte por apoptosis frente a la necrosis⁸⁴. Esto depende de la intensidad del daño, de modo que cuanto más larga sea la isquemia mayor será la proporción de necrosis frente a apoptosis.

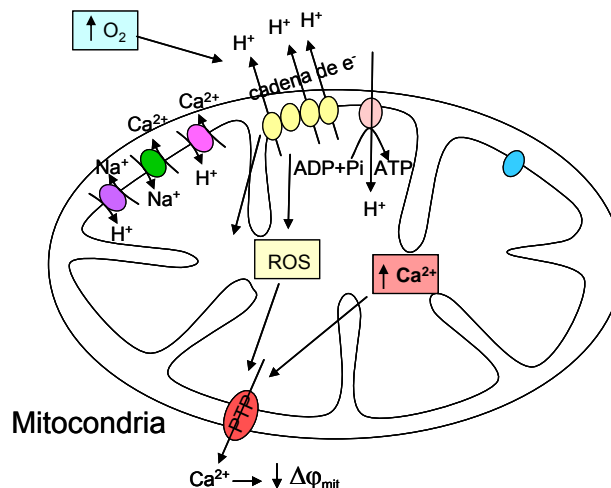


Figura 7. Recuperación. En la recuperación se reactiva la síntesis de ATP y se produce una explosión de formación de ROS al reentrar el oxígeno. El exceso de ROS junto con la elevada concentración de calcio mitocondrial inducen la apertura del mPTP (PTP) y la consecuente despolarización del potencial de membrana mitocondrial (ϕ_{mit}).

La composición del mPTP no se conoce con seguridad. Según uno de los principales modelos estaría formado por el transportador de nucleótidos de adenina (ANT) de la membrana mitocondrial interna, el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) de la membrana mitocondrial externa, la ciclofilina D de la matriz mitocondrial y otras proteínas (Figura 8). Sin embargo, en ratones knockout frente a ANT y VDAC la transición de la permeabilidad mitocondrial aún sucede. También ocurre en ratones knockout para ciclofilina D, pero en este caso los ratones sí presentan una cierta

protección frente a la isquemia y se requiere una mayor concentración de calcio para inducir dicha transición ⁸⁸⁻⁹⁰. Por estas razones la ciclofilina D parece ser la única proteína que con seguridad está implicada en el funcionamiento del mPTP y por eso su inhibidor la ciclosporina A (CsA) y sus derivados son inhibidores aceptados para el mPTP.

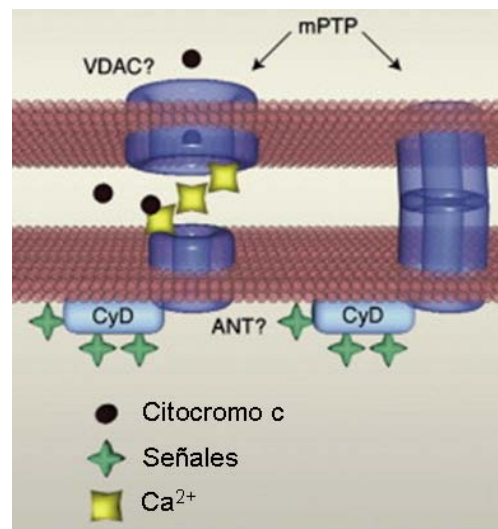


Figura 8. Estructura del mPTP. El principal modelo del mPTP hipotetiza que VDAC de la membrana mitocondrial externa se une a ANT de la membrana mitocondrial externa y a ciclofilina D (CyD) formando el mPTP en respuesta a distintas señales. A través del mPTP pasa Ca^{2+} y todo tipo de moléculas pequeñas como el citocromo c. Adaptado de ⁹¹.

Un modelo alternativo propone que el daño producido por el estrés oxidativo y otras perturbaciones que se producen en la isquemia provocan un plegamiento alterado de las proteínas integrales de membrana ⁹². Estas proteínas mal plegadas crean superficies hidrofílicas frente a las bicapas lipídicas, lo que supone una condición desfavorable termodinámicamente. Como consecuencia, estas proteínas se agregan, de modo que las superficies hidrofílicas forman un canal acuoso transmembrana, correspondiente a un mPTP naciente. Para evitar una permeabilización catastrófica y el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, la ciclofilina D y otras chaperonas actúan a ambos lados de la membrana interna para impedir la conductancia a través de estos mPTP nacientes ⁹³.

Por otro lado, en la isquemia se produce un exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que se conoce como estrés oxidativo. Las ROS son formas químicas derivadas del oxígeno molecular (O_2) como el anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) o el peróxido de

hidrógeno (H_2O_2) entre otras. Son químicamente muy inestables y, en general, tienen una gran capacidad oxidante, pudiendo reaccionar con otras moléculas y estructuras de la célula, contribuyendo al daño celular. Sin embargo, si el estrés oxidativo no es muy alto, las ROS actúan sobre las vías de transducción de señales⁹⁴⁻⁹⁸, comportándose como segundos mensajeros intracelulares⁹⁹⁻¹⁰². Estas señales son especialmente importantes en la isquemia¹⁰³.

La hipoxia disminuye la tasa de transporte de los electrones de la cadena respiratoria, aumentando la posibilidad de que se forme $\text{O}_2\cdot^-$. El mayor tiempo de vida del radical $\text{QH}\cdot^-$ del ciclo Q del complejo III o su incapacidad de reducirse a QH_2 por cambios conformacionales de la proteína inducidos por la isquemia¹⁰⁴ conducen a que $\text{QH}\cdot^-$ se autooxide liberando un electrón singlete que ataca al O_2 remanente generando $\text{O}_2\cdot^-$. El $\text{O}_2\cdot^-$ formado dismuta espontáneamente a H_2O_2 , reacción favorecida por el bajo pH durante la isquemia, o más frecuentemente es dismutado rápidamente en la matriz por la superóxido dismutasa mitocondrial o en el espacio intermembrana y en el citosol por la superóxido dismutasa citosólica, por lo que la mayoría del $\text{O}_2\cdot^-$ es convertido rápidamente a H_2O_2 . Éste difunde al citosol a través de la membrana mitocondrial o por las acuaporinas^{105,106} y es neutralizado por acción de la catalasa o la glutatión peroxidasa en el citosol, convirtiéndolo en H_2O y O_2 . Sin embargo, en la isquemia los sistemas depuradores (*scavengers*) de ROS están superados¹⁰³, no eliminándose con tanta rapidez el $\text{O}_2\cdot^-$ ni el H_2O_2 , lo que contribuye al aumento de ROS.

También hay fuentes de ROS no mitocondriales en la isquemia, como la NADPH oxidasa¹⁰⁷ y la xantina oxidasa¹⁰⁸, pero la mayoría de las ROS proceden probablemente de la mitocondria, como muestra el daño a los complejos respiratorios^{109,110} y el uso de inhibidores mitocondriales^{102,111}.

Además, en la isquemia la cadena respiratoria también produce NO, que puede generar especies reactivas de nitrógeno (RNS), que contribuyen al daño pero que también son importantes señalizadores celulares.

En los tejidos sometidos a isquemia, si ésta es muy larga, las células terminarán muriendo por necrosis, por lo que para la supervivencia del tejido es necesaria una reperfusión del mismo. Sin embargo, la recuperación por sí misma puede aumentar el daño, fundamentalmente por la reoxigenación⁷³. En la recuperación se reactiva la síntesis de ATP y se produce una explosión de formación de ROS al reentrar el oxígeno

y reaccionar con radicales acumulados durante la isquemia como la semiubiquinona¹¹². Ésta puede reaccionar con el oxígeno generando $O_2^{\cdot-}$, que se reduce por las superóxido dismutasas a H_2O_2 ¹¹³. Las ROS generadas afectan directamente a proteínas de la mitocondria, inducen la peroxidación de los lípidos de membrana¹¹⁴ y la apertura del mPTP al incrementar su sensibilidad frente a la elevada concentración de calcio. Esto va acompañado por una recuperación de los valores normales de pH, estimulándose la apertura del mPTP, lo que conduce a la muerte celular^{84,115} (Figuras 5, 6 y 7).

Factores inducibles por hipoxia (HIFs)

Los factores inducibles por hipoxia (HIFs) son un conjunto de factores de transcripción de tipo hélice-lazo-hélice básico (bHLH) que regulan la expresión de cerca de 200 genes que pueden afectar a la respuesta adaptativa de la célula frente a la hipoxia y/o la isquemia¹¹⁶⁻¹¹⁸. Estos genes presentan en su DNA regiones conocidas como elementos de respuesta a hipoxia (HREs), a los que se une HIF para inducir la transcripción¹¹⁹.

HIF es un heterodímero formado por una subunidad α y una subunidad β (ARNT). Se conocen 3 tipos distintos de genes para cada una de las subunidades. Las 3 subunidades α tienen capacidad para unirse a cualquiera de las subunidades β , pero dependiendo de qué clase de heterodímero se forme, la eficacia del factor de transcripción para incrementar la expresión de sus genes dianas varía¹²⁰. De todas las configuraciones posibles, el HIF más estudiado, el principal regulador y el que se expresa en todos los tejidos es el formado por la subunidad HIF-1 α y la HIF-1 β /ARNT1¹²¹. Ambas subunidades se expresan constitutivamente, pero la estabilidad de la subunidad α se regula en función de los niveles de O_2 ^{122,123}. En condiciones de normoxia, la subunidad α es hidroxilada en dos residuos de prolina conservados en la región del péptido conocida como dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODD) por una familia de prolil-hidroxilasas (PHDs), lo que facilita el reconocimiento de HIF- α por la proteína von Hippel-Lindau (vHL)^{124,125}. Esta proteína funciona como una ubiquitina ligasa, marcando la subunidad α para que sea degradada en el proteasoma^{70,124-126}. Por tanto, los niveles de HIF en normoxia son prácticamente inexistentes. Durante la hipoxia las PHDs son inhibidas, lo que permite que la subunidad α se acumule, se una a la subunidad β y pase al núcleo para iniciar la transcripción de diversos genes implicados

en el metabolismo de la glucosa, la función mitocondrial, la supervivencia celular, la apoptosis y la resistencia al estrés oxidativo ¹¹⁹.

Protección frente a la isquemia/recuperación

La gravedad del daño isquémico depende no sólo de la duración y de la intensidad del estímulo isquémico, sino también de la tolerancia del tejido a la falta de oxígeno. Por tanto, los mecanismos de protección están orientados a aumentar la tolerancia del tejido a la isquemia, siendo el principal objetivo la zona de penumbra debido a su mayor posibilidad de recuperación ⁷⁰. Hasta el momento, la forma de protección más estudiada y con mayor éxito es el preconditionamiento isquémico, el cual consiste en provocar pequeños e intermitentes episodios de isquemia o hipoxia antes del episodio más fuerte de isquemia ¹²⁷. La mayoría de las investigaciones se han realizado en corazón, donde se ha puesto de manifiesto que tanto la hipoxia crónica como el preconditionamiento isquémico disminuyen el tamaño del infarto, pero cada vez son más numerosos los estudios realizados en cerebro ^{128,129}.

Aunque no se conoce con exactitud el mecanismo molecular de esta protección, se han realizado estudios que indican la implicación de diferentes proteínas quinasas, fundamentalmente PKC ϵ , así como de ROS y de NO, en la activación de un canal de K⁺ dependiente de ATP de la mitocondria (mitoK_{ATP}). El mitoK_{ATP} es un canal de potasio específico de la mitocondria que se descubrió gracias al estudio de los flujos de potasio en la mitocondria y a la respuesta de los mismos a inhibidores generales de canales de potasio dependientes de ATP. Todo lo que se conoce de su posible estructura está basado en los canales de potasio dependientes de ATP de otros orgánulos, como el retículo endoplásmico. Al abrirse permite el influjo de potasio a la mitocondria. Parece ser que la activación de la PKC ϵ y del mitoK_{ATP} conducen, en último término, a una disminución de la sobrecarga de calcio y de la generación de ROS producida en la reperfusión, lo que provoca en último lugar la inhibición de la apertura del mPTP y con ello la protección del tejido ¹³⁰. No se conoce a través de qué mecanismo la PKC ϵ y el mitoK_{ATP} producen estos efectos, ni si son los efectores finales de la protección o simplemente transductores de la señal, pero se cree que la entrada de potasio en la mitocondria dificulta la entrada de calcio al reducir el gradiente iónico que impulsa la

entrada de calcio. La hipoxia crónica parece activar las mismas vías que el preconditionamiento isquémico, pero además afecta también a la expresión de otras proteínas asociadas con el mantenimiento de la homeostasis de O₂ como HIF. Probablemente esta sea la causa de que, aunque la hipoxia crónica protege menos que el preconditionamiento, su protección es más duradera ¹³¹.

Recientemente se está abordando el estudio del postcondicionamiento isquémico, que consiste en someter al tejido a múltiples y cortos episodios de isquemia después del accidente isquémico. También tiene un efecto protector y resulta más útil en clínica porque no es necesario conocer cuándo se va a producir la isquemia. Parece que activa las mismas vías de transducción de señales que el preconditionamiento ^{132,133}.

También se han hecho estudios de neuroprotección farmacológica. En este sentido, para que una molécula sea neuroprotectora debe interferir con uno o más de los componentes de la cascada bioquímica que se desencadenan en la isquemia/recuperación, como la pérdida de las reservas energéticas intracelulares, el desequilibrio de los gradientes iónicos con la consecuente despolarización de la membrana, liberación de potasio, excitotoxicidad y aumento de calcio intracelular, la disminución del pH, el aumento de ROS y todos los procesos que tienen lugar en la mitocondria como el aumento del calcio mitocondrial y la apertura del mPTP. Se han llevado a cabo numerosos estudios, encontrándose moléculas que podrían ser protectoras como los moduladores del receptor de NMDA (selfotel y dextrorfano), que impiden la acción de las grandes cantidades de glutamato y su consecuente excitotoxicidad; inhibidores de la liberación del glutamato (damotrigina y fosfenitoína), inhibidores de la apertura del mPTP (ciclosporina A y ácido bongkrékico); inhibidores de la expresión de p53 (pifitrina α), inhibidores de la liberación de citocromo c, y moléculas con propiedades antioxidantes y con capacidad para estabilizar la expresión de HIF-1 (desferoxamina) ¹³⁴.

Teniendo en cuenta los efectos del preconditionamiento isquémico, se han realizado también estudios de preconditionamiento farmacológico. Para ello se han empleado moléculas que mimetizan los procesos del preconditionamiento, como el diazóxido, que es un activador del mitoK_{ATP} que impide la apertura posterior del mPTP, o factores que imitan la agresión para inducir así tolerancia, como inhibidores de la cadena respiratoria o moléculas estabilizadoras de HIF ¹³⁵.

Sin embargo, aunque todos estos fármacos funcionan en modelos animales, no se ha encontrado ningún tratamiento eficaz en humanos, ya que presentan muchos efectos secundarios y sus efectos beneficiosos son mucho menores que los encontrados en animales de experimentación. Por lo tanto, es necesario seguir investigando para encontrar moléculas neuroprotectoras contra la isquemia que resulten más eficaces que las actuales.

2. OBJETIVOS

El objetivo científico general de esta tesis doctoral consiste en estudiar los mecanismos protectores de la ceramida y esfingosina 1-fosfato sobre la muerte celular inducida por isquemia/recuperación en un modelo experimental *in vitro* en cultivos celulares de neuronas (SH-SY5Y).

1. Valorar el efecto neuroprotector de la ceramida y esfingosina 1-fosfato sobre la muerte celular inducida por isquemia/recuperación.
2. Determinar qué vías de señalización están implicadas en la protección ejercida por ceramida y esfingosina 1-fosfato.
3. Estudiar la acción de la ceramida sobre las alteraciones inducidas por la isquemia en la mitocondria: variaciones de calcio, producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y apertura del poro de transición mitocondrial.
4. Evaluar los efectos de la esfingosina 1-fosfato sobre las alteraciones mitocondriales producidas por isquemia/recuperación: potencial de membrana, variaciones de calcio, especies reactivas de oxígeno (ROS) y apertura del poro de transición mitocondrial.
5. Determinar la implicación del factor inducible por hipoxia (HIF) en el papel neuroprotector de la ceramida y esfingosina 1-fosfato en el proceso de isquemia/recuperación.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 CULTIVO CELULAR

Para todos los experimentos se empleó la línea celular SH-SY5Y (número de ATCC CRL-2266) de neuroblastoma humano. Estas células se cultivaron en medio DMEM (Sigma) suplementado con suero fetal bovino (Sigma) al 10 %, penicilina-estreptomicina (Sigma) al 1% y glutamina (Sigma) al 1% en un incubador humidificado a 37 °C con un 5% de CO₂. El medio se cambió cada 2 días.

Nombre	Concentración	Diana	Función	Procedencia comercial
<i>Bisindolylmaleimide</i> (BSM)	10 nM	PKC	Inhibidor competitivo del centro de unión del ATP en las PKC	Tocris
<i>Wortmannin</i> (WT)	10 nM	PI3K	Inhibidor de PI3K	Sigma
<i>ERK activation inhibitor peptide</i> (IE)	3 μM	ERK1/2	Inhibidor de la activación de ERK	Calbiochem
<i>PKC ε translocation inhibitor peptide</i> (V1-2)	5 μM	PKC ε	Inhibidor de la translocación de PKC ε	Calbiochem
<i>PKC ζ pseudosubstrate inhibitor peptide</i> (PS)	50 nM	PKC ζ	Inhibidor pseudosustrato competitivo de PKC ζ	Calbiochem
<i>Pertussis toxin</i> (PTX)	100 ng/ml	S1PR	Impide la interacción de las proteínas G _i , G _o y G _t con los receptores	Sigma
<i>Cyclosporine A</i> (CsA)	1 μM	mPTP	Inhibidor de la ciclofilina D	Calbiochem
<i>5-hydroxidecanoate</i> (5HD)	300 μM	mitoK _{ATP}	Inhibidor del mitoK _{ATP}	Sigma
Rotenona	10 μM	ROS	Inhibidor del complejo I de la cadena respiratoria	Sigma

Tabla 1. Listado de inhibidores utilizados. Se indica la concentración a la que se utilizaron, diana, mecanismo de acción y procedencia comercial.

3.2 EXPERIMENTACIÓN GENERAL

En todos los experimentos las células se encontraban a un 80% de confluencia, salvo en los experimentos de microscopía confocal, en los que la confluencia fue menor para poder analizar las células de forma individualizada, así como en los experimentos de transfección, en la que es necesaria una menor confluencia para una mayor eficiencia. En los tratamientos con isquemia los esfingolípidos se añadieron a la vez que se indujo la isquemia y se mantuvieron durante toda la isquemia y la recuperación, salvo en los casos de pretratamiento, que se añadieron 3 h antes de la isquemia, o en los experimentos en los que el tratamiento fue sólo en una fase de la isquemia/recuperación, que se añadieron al comienzo de la fase. En este trabajo se ha empleado C₂-ceramida o N-acetilesfingosina. La C₂-ceramida es soluble en agua y permeable a las membranas celulares y, por tanto, es fácil de administrar exógenamente a cultivos celulares²³. Cuando se emplearon inhibidores, estos se añadieron 15 min antes de la ceramida y la SIP. En la Tabla 1 se detallan los inhibidores empleados.

3.3 MODELO DE ISQUEMIA *IN VITRO*

Para simular la isquemia se utilizó un modelo de privación de oxígeno y glucosa (OGD) el tiempo indicado en cada experimento. Para ello, el medio de cultivo celular se sustituyó por el tampón de isquemia (apartado 3.11), sin glucosa y previamente gaseado con nitrógeno, y las células se sometieron a hipoxia en un incubador humidificado a 37 °C con un 5% de CO₂ y un 1% de O₂ (modelo 3141 de Thermo Electron Corporation) Para la recuperación, se sustituyó de nuevo el tampón de isquemia por medio completo y se cultivaron las células en el incubador a 37 °C con un 5% de CO₂ y un 21% de O₂ el tiempo indicado en cada experimento.

3.4 MUERTE CELULAR

Ensayo de viabilidad celular por MTT

Se empleó el método descrito por Alley y cols¹³⁶. Este método se basa en que la sal amarilla de tetrazolio (MTT), soluble en agua, atraviesa las membranas celulares y es

reducida por las reductasas mitocondriales de las células vivas, formando gránulos de formazán de color azul oscuro, insolubles en agua pero no en isopropanol ácido (ácido clorhídrico 0,06 N en isopropanol). La medida espectrofotométrica a 570 nm del formazán formado permite cuantificar la viabilidad celular. Para ello, las células se cultivaron en placas de 96 pocillos, tras los tratamientos se añadió la solución de MTT (Calbiochem) a cada pocillo a una concentración final de 5 mg/ml, incubándose a 37 °C durante 4 h en oscuridad. Pasado este tiempo el formazán fue disuelto en el isopropanol ácido y se midió la absorbancia a 570 nm empleando un espectrofotómetro de placas (Power-Wavex microplate spectrophotometer Bio-Tek Instruments).

Medida de los tipos de muerte por citometría de flujo

La diferenciación entre las células muertas por apoptosis temprana y por necrosis o apoptosis tardía se llevó a cabo mediante citometría de flujo, utilizando un kit de anexina V-FITC e yoduro de propidio (Biosource). En la etapa temprana de la apoptosis, la fosfatidilserina de la cara interna de la membrana celular se transloca a la cara externa, pudiéndose unir la anexina V conjugada con FITC. Por su parte, el yoduro de propidio es un agente intercalante del DNA que emite en el ultravioleta y que sólo puede acceder al DNA cuando las membranas celulares han perdido su integridad, como ocurre en la necrosis o en una etapa muy avanzada de apoptosis. Por tanto, por citometría de flujo se pueden distinguir las células que han entrado en apoptosis, positivas para anexina V y negativas para yoduro de propidio, de las células necróticas o apoptóticas muy avanzadas, positivas para yoduro de propidio. Las células vivas serán aquellas que resulten negativas para ambos marcadores. Tras los distintos tratamientos se recogieron tanto las células adherentes como las células en suspensión por centrifugación y se lavaron con PBS frío dos veces. Después se resuspendieron en el medio de unión (apartado 3.11), y se marcaron en oscuridad $2-3 \times 10^5$ células por tratamiento con anexina V-FITC y con yoduro de propidio durante 15 min a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo se realizó el análisis por citometría de flujo.

3.5 ANÁLISIS PROTEICO

Separación de fracciones de citosol, membrana, núcleo y mitocondrias

La extracción proteica de las fracciones de membrana, núcleo y citosol se realizó según el método descrito por Miguel y cols ¹³⁷. Todo el proceso de extracción se realizó a 4 °C. Tras los distintos tratamientos se recogieron las células, se lavaron con PBS frío, se resuspendieron en el tampón de lisis (apartado 3.11) con los inhibidores de proteasas y se lisaron las células con un homogeneizador Douncer de tipo B. La lisis se confirmó en el microscopio. El lisado celular se centrifugó a 800 g durante 10 min a 4 °C. El sedimento, correspondiente a la fracción nuclear, se resuspendió en el tampón de lisis anterior y se valoró la concentración de proteínas por el método Bradford (Sigma) siguiendo las instrucciones del fabricante y se guardó a -80 °C hasta su uso. El sobrenadante se centrifugó a 100000 g durante una hora a 4 °C para separar la fracción citosólica de la membrana. En el sobrenadante resultante, correspondiente a la fracción citosólica, se valoró la concentración de proteínas, almacenándose a -80 °C hasta su uso. El sedimento se resuspendió en tampón de lisis al que se añadió tritón X-100 al 0,1% para permeabilizar la membrana, se mantuvo en agitación durante 2 h a 4 °C y se centrifugó de nuevo a 100000 g. En el sobrenadante, correspondiente a la fracción de membrana, se valoró la concentración de proteínas, almacenándose a -80 °C hasta su uso.

La extracción proteica de las mitocondrias y del citosol se realizaron según el método descrito por Kim y cols ¹³⁸. Todo el proceso de extracción se realizó a 4 °C. Tras los distintos tratamientos se recogieron las células, se lavaron con PBS frío, se resuspendieron en el tampón de extracción mitocondrial (apartado 3.11) con los inhibidores de proteasas y se lisaron las células pasándolas 5 veces por una aguja de 25 Gauges. La lisis se confirmó en el microscopio. El lisado celular se centrifugó a 1000 g durante 10 min a 4 °C para eliminar los restos celulares. El sobrenadante se centrifugó de nuevo a 10000 g a 4 °C para separar la fracción citosólica de la mitocondrial. El sobrenadante resultante, correspondiente a la fracción citosólica, se centrifugó de nuevo a 100000 g para obtener una fracción citosólica más pura y en el sobrenadante resultante se valoró la concentración de proteínas, almacenándose a -80 °C hasta su uso. El sedimento de la centrifugación anterior se resuspendió en el mismo tampón, se

centrifugó de nuevo a 10000 g a 4 °C para obtener una fracción más pura, y el sedimento resultante se resuspendió en tampón, se valoró la concentración de proteínas y se almacenó a -80 °C hasta su uso.

Western blot

Los extractos proteicos se calentaron durante 5 min a 95 °C con tampón de Laemmli (apartado 3.11) para la desnaturalización de las proteínas, separándose por electroforesis en geles de poliacrilamida con un 10% de acrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE), a una intensidad constante de 40 mA. Posteriormente, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Hybond; Amersham Biosciences) en sistema húmedo durante 3 h a una intensidad constante de 350 mA. Tras la transferencia, las membranas se bloquearon durante una hora con leche en polvo al 5% en TTBS. Después se incubaron con el anticuerpo primario durante una hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C. A continuación se lavaron tres veces durante 10 min con TTBS y se incubaron una hora con el anticuerpo secundario. Tras tres lavados de 10 min se detectaron las proteínas por quimioluminiscencia (ECL) (Amersham Biosciences).

Los anticuerpos utilizados se detallan en la Tabla 2.

Proteína diana	kDa	Dilución del Ac. 1°	C comercial del Ac 1°	Ac 2° anti-	Dilución del Ac 2°	Procedencia comercial del Ac 2°
PKC ϵ	90	1:1000 en leche al 5% en TTBS	Santacruz	Conejo	1:5000 en leche al 5% en TTBS	Calbiochem
PKC ζ	72	1:1000 en leche al 5% en TTBS	Santacruz	Conejo	1:5000 en leche al 5% en TTBS	Calbiochem
PKC δ	78	1:1000 en leche al 5% en TTBS	Santacruz	Conejo	1:5000 en leche al 5% en TTBS	Calbiochem
HIF-1 α	120	1:1000 en leche al 5% en TTBS	Transduction laboratories-BD	Conejo	1:5000 en leche al 5% en TTBS	Calbiochem

Tabla 2. Anticuerpos utilizados. Se indica la proteína diana y su peso molecular, así como la dilución empleada en los anticuerpos primario y secundario, el organismo que reconoce el anticuerpo secundario y la procedencia comercial.

3.6 MEDIDA DE ACTIVIDAD DE CASPASA 3

Para la medida de la actividad de la caspasa 3, se empleó el sustrato colorimétrico Ac-DEVD-*p*NA (Calbiochem). Tras los distintos tratamientos, se recogieron las células, se lavaron con PBS frío, se resuspendieron en el tampón de lisis de caspasas (apartado 3.11) y se incubaron en hielo durante 5 min. Posteriormente, se centrifugaron a 10000 g a 4 °C, recogiendo el sobrenadante y midiendo la concentración de proteína por el método Bradford (Sigma). Alícuotas de 50 µg de cada tratamiento se atemperaron 10 min a 37 °C en el tampón de ensayo de caspasas (apartado 3.11) y se inició la reacción colorimétrica añadiendo el sustrato a una concentración final de 200 µM. La reacción se mantuvo en la oscuridad a 37 °C durante 4 h, midiendo la absorbancia a 405 nm cada 30 min.

3.7 EXPRESIÓN GÉNICA

Extracción del RNA

Para la extracción del RNA total de las células se empleó el reactivo Ultraspec (Biotechx). Tras los distintos tratamientos las células se homogeneizaron en Ultraspec y se mantuvieron 5 min a 4 °C para permitir la disociación completa de los complejos nucleoproteicos. Posteriormente, tras 15 s de fuerte agitación con cloroformo, se mantuvieron a 4 °C 5 min y se centrifugaron a 12000 g 15 min a 4 °C. Tras la centrifugación se separan una fase acuosa y otra orgánica. Se recogió la fase acuosa y se precipitó el RNA con isopropanol manteniéndolo 10 min a 4 °C y centrifugando posteriormente a 12000 g 10 min a 4 °C. El sedimento de RNA se lavó dos veces con etanol al 75%, se secó y se disolvió en agua con DEPC al 0,1%. La concentración de RNA y su pureza se midieron con un Nanodrop (Spectrophotometer Nanodrop ND-1000).

RT-qPCR

De cada muestra se retrotranscribieron 5 µg del RNA total a cDNA en un termociclador (MultiGene II, LabNets) utilizando la retrotranscriptasa SuperScript II (Invitrogen) y

oligómeros oligo(dT) (Invitrogen) como cebadores. A 5 µg de RNA se le añadieron oligómeros oligo(dT) 50µM y una mezcla 10 mM de nucleótidos (dATP, dGTP, dCTP, dTTP). La mezcla se calentó a 65 °C 5 min para eliminar posibles apareamientos secundarios y después se incubó en hielo 1 min. Tras este proceso, se añadió DTT 0,1 M, 2 U/µl del inhibidor de RNasa RNaseOUT (Invitrogen), 20 U/µl de retrotranscriptasa SuperScript II (Invitrogen) y el tampón comercial óptimo para el funcionamiento de la enzima. La mezcla se incubó a 42 °C 50 min y después se inactivó calentando 15 min a 70 °C.

Posteriormente, 10 µl del cDNA obtenido se amplificó usando un termociclador (7900 HT Fast Real Time PCR System, Applied Biosystems) empleando SYBRGreen (Applied Biosystems) para la detección del DNA. Los cebadores empleados se diseñaron a partir de las secuencias de los mRNA humanos de β -actina, PKC ϵ y PKC ζ que aparecen registrados en el GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) con el programa PrimerExpress (Applied Biosystems). Los cebadores utilizados se presentan en la Tabla 3. Los datos se analizaron utilizando el programa informático SDS Software (Applied Biosystems). Cada muestra se analizó por duplicado y se normalizó en función de la expresión del gen de la β -actina.

Gen	Referencia en el NCBI	Cebadores
β -actina	NM_001101.3	Antisentido: 5' CAAATAGTGATGACCTGGCCGT 3' Sentido: 5' AGAGGGAAATCGTGCGTGAC 3'
PKC ϵ	NM_005400.2	Antisentido: 5' GCTGAGTGTCTCCAACACAGG 3' Sentido: 5' ACTTTGGTGAAGACCTGATGC 3'
PKC ζ	NM_002744.4	Antisentido: 5' GCCAGTTATCGATGGGATGG 3' Sentido: 5' AGCCCAAGCCCCTGAGAG 3'

Tabla 3. Cebadores empleados para la RT-qPCR. Se indica el gen diana, la referencia secuencia del mRNA en el NCBI y las secuencias de los cebadores con sentido y antisentido.

3.8 SILENCIAMIENTO DEL RNA

Para el silenciamiento de PKC ϵ se utilizó el RNA de interferencia (siRNA) (5' CTGTGAAGGTCTTAAAGAA) sintetizado por Gene Link. El siRNA se transfectó

con lipofectamina 2000 (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante a células a un 50% de confluencia. Brevemente, 100 pmol de siRNA se diluyeron en medio DMEM sin suero y se mezclaron con la lipofectamina también disuelta en el mismo medio sin suero. Tras 20 min de incubación para la formación de los complejos siRNA-lipofectamina 2000, la mezcla se añadió a las células. Al día siguiente se cambió el medio y se iniciaron los tratamientos.

3.9 MICROSCOPIA CONFOCAL

Los experimentos de microscopía confocal se llevaron a cabo con células a un 60% de confluencia, para poderlas analizar de forma individualizada. Para estos experimentos se emplearon sondas fluorescentes con una cola acetoximetiléster (AM) que las hace permeable a las células. Una vez en el interior de las células, las esterasas intracelulares rompen esta cola AM, quedando la sonda dentro de las células. En estos experimentos, las células se cargaron con la(s) sonda(s) correspondiente(s) el tiempo indicado para cada sonda en oscuridad y en el tampón de carga (apartado 3.11). Pasado este tiempo se lavó el exceso de sonda y se mantuvieron las células en dicho tampón durante 30 min en oscuridad para dejar actuar a las esterasas y para que se eliminase el exceso de sonda del interior de las células. Después las células se colocaron en una cámara sellada y termostaticada sobre el microscopio. Para inducir la isquemia se sustituyó el medio de carga por tampón de isquemia (apartado 3.11) y se gaseó la cámara con nitrógeno. En la recuperación se eliminó la hipoxia y se añadió glucosa como en las condiciones iniciales. Las imágenes se tomaron con un microscopio confocal Leica y se analizaron con el programa LCS Lite. Se analizó la fluorescencia de al menos 40 células por experimento y se normalizó la media respecto al punto inicial.

Apertura del poro de transición mitocondrial

Para medir la apertura del mPTP en células individualizadas empleamos el método descrito por Petronilli y cols¹³⁹. Esta técnica se basa en la carga de las mitocondrias con calceína-AM (Anaspec) ($\lambda_{\text{excitación/emisión}} = 494/517$ nm) y cloruro de cobalto (Sigma). La calceína-AM, no fluorescente, difunde pasivamente en las células gracias a su cola AM y se acumula en los compartimentos celulares, incluyendo las mitocondrias. Una vez dentro de la células, las esterasas intracelulares rompen la cola AM liberando la

calceína, fluorescente y polar. Por su parte, el cloruro de cobalto entra al citosol de las células donde desactiva (*quenching*) la emisión de la calceína, de modo que la fluorescencia de calceína que se detecte corresponderá a la calceína acumulada en las mitocondrias. Cuando el mPTP se abre, la calceína sale a través del poro, observándose un descenso en su fluorescencia.

Para medir la apertura del poro, se cargaron las células con calceína-AM 1 μM y con el cloruro de cobalto 1 μM durante 15 min a 37 °C en la oscuridad, se lavaron y se dejaron 30 min a 37 °C en oscuridad para eliminar el exceso de sonda, obteniéndose imágenes cada 5 min durante 60 min de isquemia.

Potencial de membrana mitocondrial

Para medir el potencial de membrana se empleó tetrametilrodamina metil éster (TMRM) (Anaspec) ($\lambda_{\text{excitación/emisión}} = 549/573$ nm). El TMRM es un fluorescente catiónico permeable a las células y que es secuestrado por las mitocondrias activas, por lo que se emplea para medir el potencial de membrana mitocondrial. Para medir la despolarización del potencial mitocondrial las células se cargaron con TMRM 1 μM durante 15 min a 37 °C en oscuridad, se lavaron y se dejaron 30 min a 37 °C en oscuridad para eliminar el exceso de sonda, tomándose imágenes cada 5 min durante 60 min de isquemia y 25 de recuperación.

Medida del calcio mitocondrial

Para medir el calcio mitocondrial se empleó una sonda específica, rhod-2 AM (Anaspec) ($\lambda_{\text{excitación/emisión}} = 549/578$ nm). Las células se cargaron con rhod-2 AM 2,2 mM durante 15 min a temperatura ambiente en oscuridad, se lavaron y se dejaron 15 min en oscuridad para eliminar el exceso de sonda. Adicionalmente, se pretrataron durante 15 min con tapsigargina 2 μM (Sigma), un inhibidor de la Ca^{2+} /ATPasa del retículo endoplásmico, para evitar interferencias con el calcio del retículo. Se tomaron imágenes cada 15 s durante 60 min de isquemia.

Medida de especies reactivas de oxígeno

Para medir ROS se utilizó dihidrorodamina 123 (DHR 123) (Anaspec) ($\lambda_{\text{excitación/emisión}} = 507/529$ nm). La DHR 123 es un indicador no fluorescente y sin carga que difunde a través de las membranas pasivamente hasta ser oxidado por ROS, convirtiéndose en rodamina 123, catiónica y fluorescente, que se localiza en las mitocondrias. Por eso se emplea para medir las ROS preferentemente generados en la mitocondria. Las células se cargaron con DHR 123 10 μM durante 30 min a 37 °C en oscuridad, se lavaron y se mantuvieron durante 15 min a 37 °C en oscuridad para eliminar el exceso de sonda y se tomaron imágenes cada 5 min durante 60 min de isquemia y 15 de recuperación.

3.10 MEDIDA DEL HINCHAMIENTO MITOCONDRIAL (*SWELLING*)

Aislamiento de las mitocondrias

El aislamiento de las mitocondrias se realizó según el método descrito por Khaliulin y cols ¹⁴⁰. Tras los distintos tratamientos se recogieron las células, se lavaron con PBS frío y seguidamente se resuspendieron en el tampón de aislamiento mitocondrial (apartado 3.11), lisándose con un homogeneizador Douncer de tipo B. Los homogeneizados se centrifugaron a 480 g durante 10 min a 4 °C para eliminar los restos celulares y el sobrenadante, en el que se encuentran las mitocondrias, centrifugándose de nuevo a 10000 g 10 min a 4 °C. El sedimento, correspondiente a las mitocondrias, se lavó y resuspendió en el tampón de resuspensión mitocondrial (apartado 3.11) y se determinó la concentración de proteínas por el método Bradford (Sigma) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Medida del *swelling* mitocondrial

Para medir la capacidad de resistencia al mismo utilizamos el método descrito por Ruiz-Meana y cols ¹⁴¹, que se basa en la relación entre la apertura del mPTP inducida por cloruro cálcico y el aumento del volumen mitocondrial como consecuencia de dicha apertura, medido como un descenso de la absorbancia a 520 nM. Las mitocondrias (0,5 mg de proteína) se resuspendieron en el tampón de *swelling* (apartado...) en una cubeta

de espectrofotometría. Tras 2 min de estabilización se añadió CaCl_2 250 μM midiéndose la absorbancia a 520 nM cada 15 s durante 7 min.

3.11 COMPOSICIÓN DE TAMPONES

Tampón de isquemia

Contiene:

5 mM HEPES, pH 7,4, 154 mM NaCl, 5,6 mM KCl, 3,6 mM NaHCO_3 y 2,3 mM CaCl_2 .

Este tampón se gaseó con nitrógeno antes de ser utilizado.

PBS

Contiene:

8 mM Na_2HPO_4 , 1,5 mM KH_2PO_4 , pH 7,6, 2,7 mM KCl y 0,14 mM NaCl.

Tampón de lisis

Contiene:

20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 5 mM MgSO_4 y 0,5 mM EGTA.

Inhibidores: 1% de 2-mercaptoetanol, 0,1 mM Na_3VO_4 , 20 mM NaF, 10 $\mu\text{g/ml}$ leupectina y 1 mM PMSF.

Tampón de extracción mitocondrial

Contiene:

20 mM HEPES-KOH, pH 7,5, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA- K_2 , 250 mM sacarosa, 1 mM EGTA y 1mM DTT.

Inhibidores: 1% de 2-mercaptoetanol, 0,1 mM Na_3VO_4 , 20 mM NaF, 10 $\mu\text{g/ml}$ leupectina y 1 mM PMSF.

Tampón de Laemmli 1X

Contiene:

6,25 mM Tris-HCl, pH 6,8, 50 mM EDTA, 2% de SDS , 10% de sacarosa , 5% de 2-mercaptoetanol y 0,004% de azul de bromofenol.

TTBS

Contiene:

20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 137 mM NaCl y 0,05% de Tween-20.

Medio de unión para citometría

Contiene:

10 mM HEPES-NaOH, pH 7,4, NaCl 140 mM y CaCl₂ 2,5 mM.

Tampón de lisis de caspasas

Contiene:

50 mM HEPES, pH 7,4, 100 mM NaCl, 0.1% CHAPS, 1 mM DTT, 0,1 mM EDTA.

Tampón de ensayo de caspasas

Contiene:

50 mM HEPES, pH 7,4, 100 mM NaCl, 0.1% CHAPS, 10 mM DTT, 0,1 mM EDTA y 10% de glicerol.

Tampón de carga

Contiene:

10 mM Na-HEPES, pH 7,3, 0,137 M NaCl, 5,4 mM KCl, 0,25 mM Na₂HPO₄, 0,44 mM KH₂PO₄, 1,3 mM CaCl₂, y 1 mM MgSO₄.

Tampón de aislamiento mitocondrial

Contiene:

10 mM MOPS, pH 7,5, 250 mM sacarosa, 1 mM EGTA y 5 mM KH₂PO₄.

Tampón de resuspensión mitocondrial

Contiene:

10 mM MOPS, pH 7,5 250 mM sacarosa y 5 mM KH₂PO₄.

Tampón de *swelling*

Contiene:

10 mM Tris-HCl, pH 7,3, 120 mM sacarosa, 120 mM KCl, 20 mM MOPS y 5 mM KH_2PO_4 .

3.12 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se presentan como la media \pm error estándar. Las comparaciones estadísticas se realizaron mediante una t de Student. Una $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativa. Para el análisis estadístico se empleó el programa Graph Pad Prism 5.

4. RESULTADOS

Acción de la ceramida y de la esfingosina 1-fosfato en la protección de la muerte inducida por isquemia y recuperación

El primer objetivo fue determinar si la ceramida y/o la S1P protegían de la muerte inducida por isquemia en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Para ello, basándose en resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio que mostraban que después de 3 h de isquemia y 16 h de recuperación se producía una muerte de al menos el 30%, las células se sometieron a dicho tratamiento en presencia o ausencia de distintas dosis de ceramida y S1P, midiéndose posteriormente la viabilidad celular mediante un ensayo con MTT. Como se puede ver en la Figura 9, ambos esfingolípidos protegieron de la muerte celular cuando se administraron a concentraciones bajas, no teniendo ningún efecto protector, en el caso de la S1P (Figura 9B), o incluso provocando la muerte de más del 40% de las células a concentraciones más altas en el caso de la ceramida (Figura 9A). La protección fue completa a las concentraciones de 10 μM para ceramida y 1 μM para S1P. En vista de estos resultados se eligieron estas dosis para evaluar el efecto protector de estos esfingolípidos.

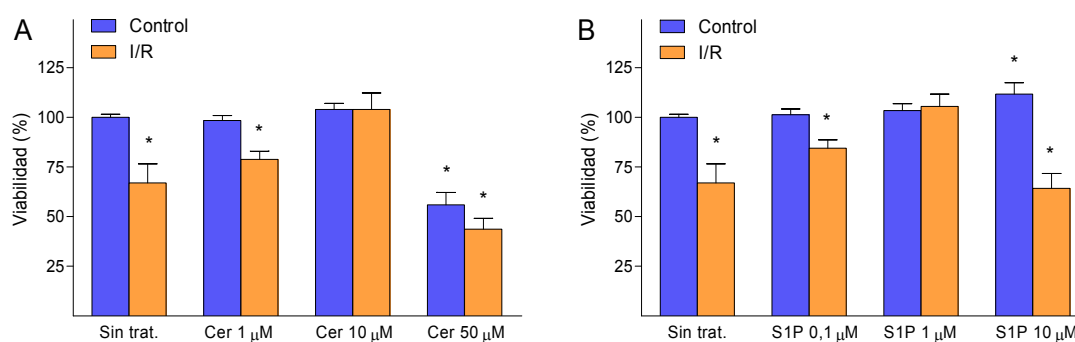


Figura 9. Dosis respuesta de esfingolípidos en la viabilidad celular. Las células fueron sometidas a 3 h de isquemia y 16 h de recuperación (excepto el control) en presencia o ausencia (sin tratamiento) de distintas dosis de los esfingolípidos, midiéndose posteriormente la viabilidad por MTT. (A) Efecto en la viabilidad de distintas dosis de ceramida (Cer). (B) Efecto en la viabilidad de distintas dosis de S1P. * $p < 0,05$.

Teniendo en cuenta que los procesos que suceden durante la isquemia y la recuperación son muy distintos, el siguiente paso fue determinar en qué parte del proceso de la isquemia/recuperación se producía la protección por parte de la ceramida y de la S1P y si un acondicionamiento con los esfingolípidos favorecía la protección como ocurre

con otros protectores ya descritos. Para ello, se formaron 6 grupos de células y se sometieron a 3 h de isquemia y 16 h de recuperación añadiendo el esfingolípido 3 h antes de la isquemia como preconditionamiento y/o durante la isquemia y/o en la recuperación siguiendo el esquema de la Figura 10. Así, en el Grupo 1 el esfingolípido sólo se añadió durante el preconditionamiento, en el Grupo 2 sólo en la isquemia, en el Grupo 3 sólo en la recuperación, en el Grupo 4 en el preconditionamiento y en la isquemia, en el Grupo 5 en la isquemia y en la recuperación y en el Grupo 6 en las tres fases.



Figura 10. Esquema de tratamientos con los esfingolípidos en las distintas fases de la isquemia/recuperación. El esfingolípido se añadió en las fases marcadas con negro.

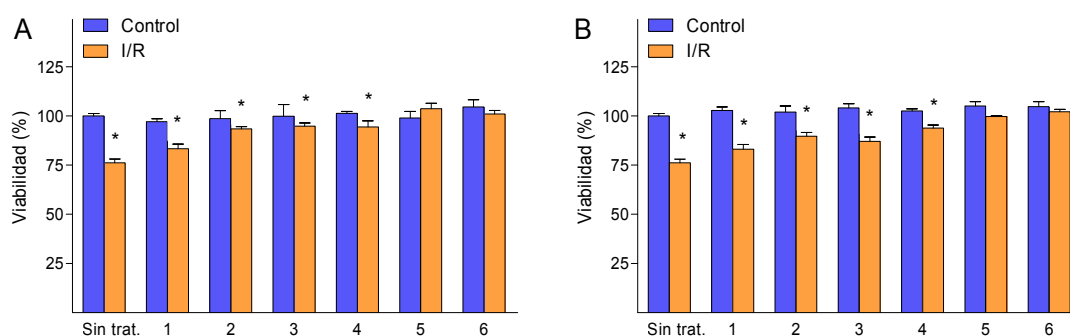


Figura 11. Efecto de los esfingolípidos sobre la viabilidad celular en las distintas fases de la isquemia/recuperación. Las células fueron sometidas a 3 h de isquemia y 16 h de recuperación (excepto el control) en presencia o ausencia (sin trat.) de los esfingolípidos en preconditionamiento (1), durante la isquemia (2), durante la recuperación (3) en preconditionamiento y durante la isquemia (4), en la isquemia y la recuperación (5) y en preconditionamiento, durante la isquemia y la recuperación (6). La viabilidad se midió por MTT. (A) Efecto en la viabilidad del tratamiento con ceramida 10 µM. (B) Efecto en la viabilidad del tratamiento con S1P 1 µM. * $p < 0,05$.

Como se observa en la Figura 11 ambos esfingolípidos protegieron en los seis grupos, produciéndose la mayor protección cuando estaban presentes tanto en la isquemia como en la recuperación. Como la máxima protección se produjo cuando el esfingolípido

estaba presente tanto en la isquemia como en la recuperación, independientemente de que hubiese habido un tratamiento previo (no existen diferencias entre el Grupo 5 y el 6 para ninguno de los esfingolípidos), el resto de los experimentos se realizaron añadiendo el esfingolípidos al inicio de la isquemia y manteniéndolo durante las fases de isquemia y recuperación sin pretratar, ya que el pretratamiento no parece aportar un beneficio extra en este caso.

Acción protectora de la ceramida y de la esfingosina 1-fosfato en la apoptosis y en la necrosis

Los procesos de isquemia y recuperación inducen muerte por apoptosis y por necrosis. Para estudiar la acción protectora de estos esfingolípidos frente a ambos tipos de muerte, tras someter a las células a los procesos de isquemia/recuperación en presencia y ausencia de los esfingolípidos, se llevó a cabo una citometría de flujo con anexina V-FITC e ioduro de propidio para diferenciar los dos tipos de muerte. Como se aprecia en la Figura 12, la isquemia/recuperación provocó un aumento de la apoptosis temprana y de la necrosis y/o apoptosis tardía significativo respecto al control, alcanzándose más de un 10% de apoptosis temprana y de un 25% de necrosis y/o apoptosis tardía. El tratamiento simultáneo con ceramida o con S1P protegió completamente de ambos tipos de muerte.

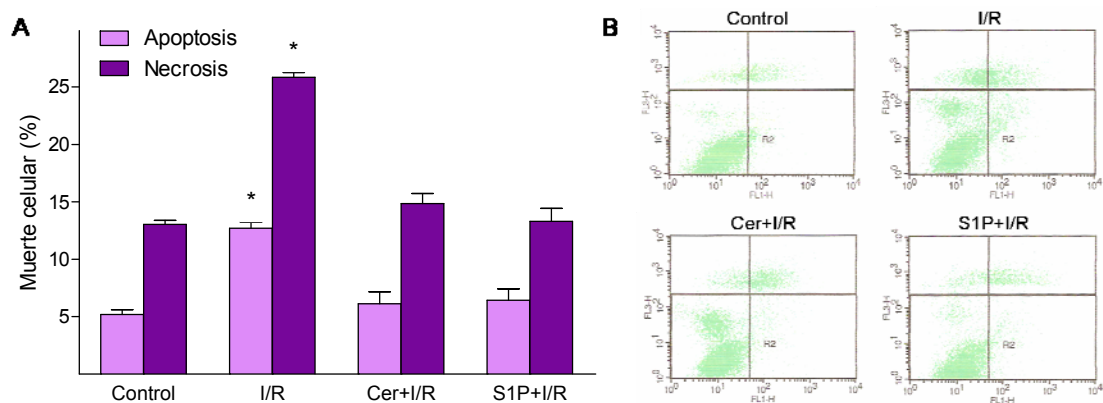


Figura 12. Acción de los esfingolípidos sobre la apoptosis temprana (apoptosis) y la apoptosis tardía (necrosis). Las células fueron sometidas a 3 h de isquemia y 16 h de recuperación (excepto el control) en presencia o ausencia de ceramida (Cer) 10 μ M o S1P 1 μ M midiéndose la apoptosis y la necrosis y/o apoptosis tardía por citometría de flujo con anexina V-FITC e ioduro de propidio. (A) Cuantificación de los porcentajes de muerte * $p < 0,05$. (B) Citometría representativa de los resultados.

Con el fin de analizar si la protección de los esfingolípidos de cada tipo de muerte dependía de en qué fase actuaba el esfingolípido (isquemia o recuperación), tratamos las células con el esfingolípido sólo durante la isquemia (Grupo 2), sólo durante la recuperación (Grupo 3) o en ambas fases (Grupo 5) y se cuantificaron por citometría de flujo la apoptosis temprana y la necrosis y/o apoptosis tardía. En la Figura 13A se observa que la ceramida protegió completamente de la necrosis y/o de la apoptosis tardía tanto durante la isquemia como durante la recuperación, así como cuando estuvo presente en ambas fases. En el caso de la apoptosis temprana, sin embargo, sólo se produjo protección cuando la ceramida estuvo presente en la isquemia y en la recuperación. Por su parte, la S1P protegió completamente de la apoptosis temprana tanto durante la isquemia como en la recuperación y sólo parcialmente de la necrosis y/o de la apoptosis tardía en cada una de las fases, siendo la protección completa al estar presente en ambas (Figura 13B).

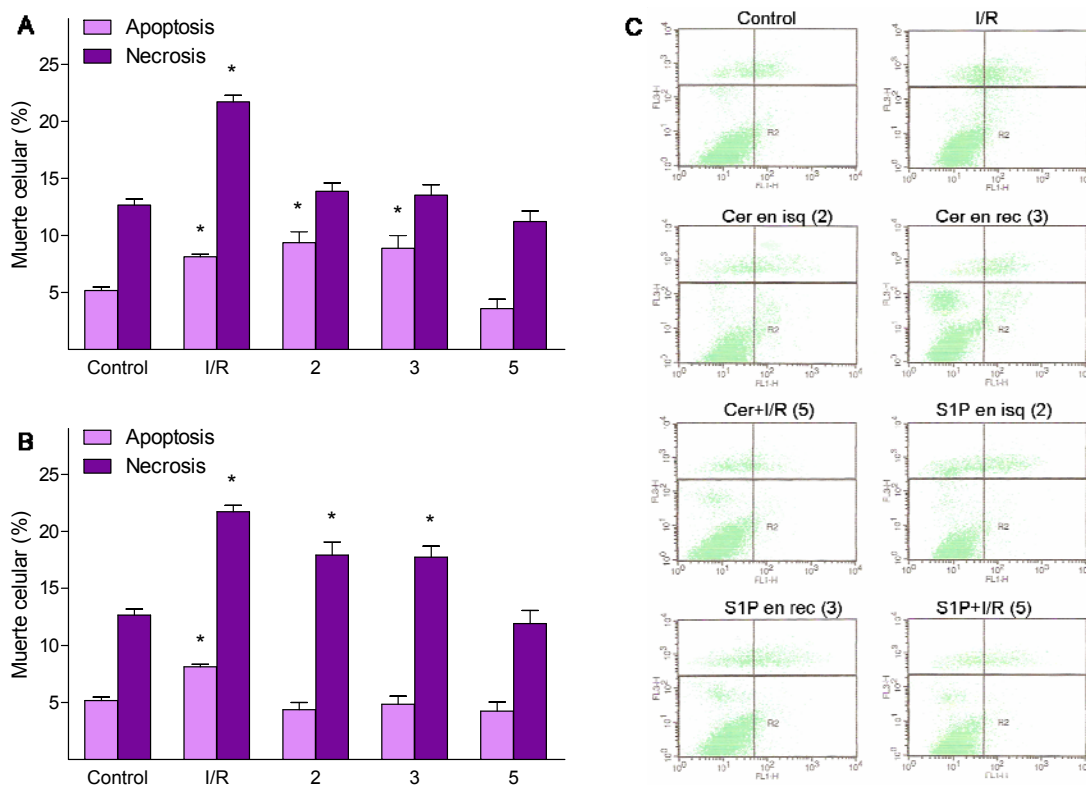


Figura 13. Efecto de los esfingolípidos sobre la apoptosis temprana (apoptosis) y la necrosis y/o la apoptosis tardía en las distintas fases de la isquemia/recuperación. Las células fueron sometidas a 3 h de isquemia y 16 h de recuperación (excepto el control) en presencia o ausencia de los esfingolípidos, durante la isquemia (2), la recuperación (3) o ambas fases (5) y posteriormente se valoró la apoptosis temprana y la necrosis y/o apoptosis tardía por citometría de flujo con anexina-V-FITC e ioduro de propidio. (A) Efecto de ceramida (Cer) 10 μ M en la apoptosis temprana y en la necrosis y/o apoptosis tardía en las distintas fases. (B) Efecto de S1P 1 μ M en la apoptosis y la necrosis en las distintas fases. * $p < 0,05$. (C) Citometría representativa de los resultados.

Rutas de señalización implicadas en la acción de la ceramida y de la esfingosina 1-fosfato

Una vez demostrada la protección que ejercen la ceramida y la S1P frente a la apoptosis y a la necrosis inducidas por isquemia/recuperación, se planteó estudiar qué rutas estarían implicadas en dicha protección. Las vías de distintas proteínas quinasas: PKC, PI3K/Akt y MAPK se han relacionado comúnmente con la supervivencia y son activadas por distintos protectores isquémicos. Utilizando inhibidores específicos de estas quinasas (BSM para las PKC, WT para PI3K e IE para ERK) se llevó a cabo un análisis con MTT para comprobar si estas rutas se activan en respuesta a ceramida y a S1P en isquemia/recuperación. Como se observa en la Figura 14, la protección ejercida tanto por ceramida como por S1P, está mediada por PKC, PI3K y ERK, ya que la protección se impidió completamente con el uso de los inhibidores específicos. En el caso de S1P se muestra también que su efecto protector está mediado por receptor, ya que se impidió completamente en presencia de PTX, un inhibidor de proteínas Gi, a las cuales se acoplan los receptores S1PRs (Figura 14B).

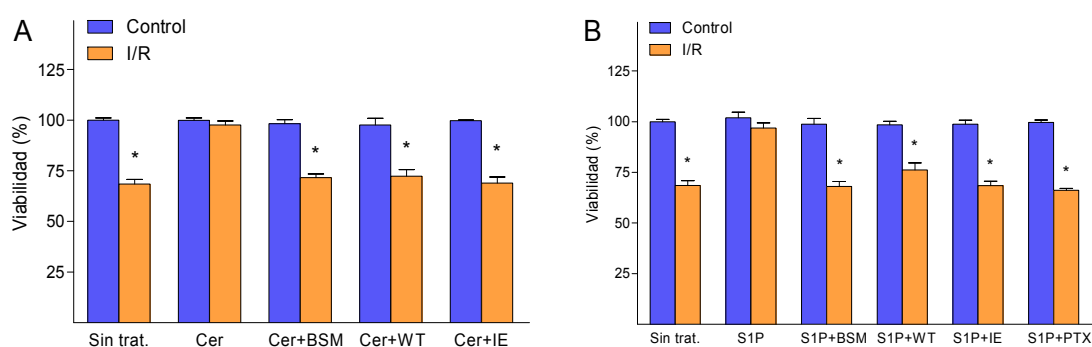


Figura 14. Acción de diferentes inhibidores sobre la protección ejercida por esfingolípidos. Las células fueron sometidas a 3 h de isquemia y 16 h de recuperación (excepto el control) en presencia o ausencia (sin tratamiento) de ceramida (Cer) 10 μ M (A) o S1P 1 μ M (B) y BSM 10 nM, WT 10 nM, IE 3 μ M y 100 ng/ml de PTX cuando se indica. A continuación se valoró la viabilidad por MTT. * $p < 0,05$.

Papel diferencial de las diferentes isoformas de PKC en la acción protectora de ceramida y esfingosina 1-fosfato

Los resultados de la Figura 14 indican que al menos una isoforma de la familia de las PKC es activada en la protección mediada por ceramida y S1P, ya que dicha protección

se inhibe en presencia de BSM. Varios autores han descrito que PKC ϵ está implicada en la acción protectora de distintos compuestos frente a la isquemia, por lo que se procedió a analizar si este era el caso de la ceramida y de la S1P. Para ello, se transfectaron células con siRNA frente a PKC ϵ , analizando la viabilidad por MTT. Como se observa en la Figura 15A la inhibición de PKC ϵ impidió la protección inducida por ambos esfingolípidos.

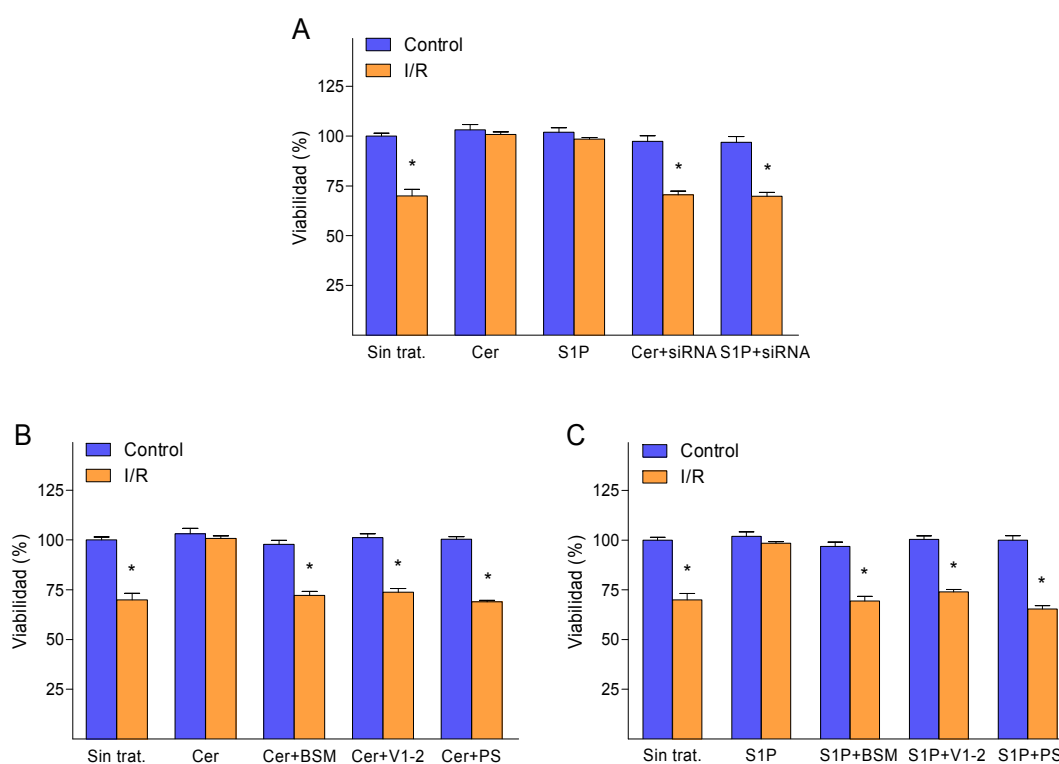


Figura 15. Implicación de PKC ϵ y PKC ζ en la acción de los esfingolípidos sobre la viabilidad celular en isquemia/recuperación. Las células fueron sometidas a 3 h de isquemia y 16 h de recuperación (excepto el control) en presencia o ausencia (sin tratamiento) de ceramida (Cer) 10 μ M (A y B) o S1P 1 μ M (A y C) y siRNA frente a PKC ϵ (A) y BSM 10 nM, V1-2 5 μ M, y PS 50 nM (B y C) cuando se indica. Se valoró la viabilidad mediante ensayos con MTT. * $p < 0,05$.

Teniendo en cuenta, por una parte, que la ceramida y la S1P protegen de la apoptosis y de la necrosis (Figura 12) y por otra que la protección está mediada por PKC ϵ (Figura 15), se planteó la posibilidad de que dicha PKC ϵ podría mediar la protección impidiendo de forma diferencial la muerte por apoptosis o por necrosis. Para comprobarlo se trataron las células con V1-2, inhibidor específico de la translocación de PKC ϵ , y se llevó a cabo una citometría de flujo. Como se aprecia en la Figura 16, V1-2

impidió la protección inducida por los esfingolípidos frente a la necrosis y/o apoptosis tardía. Sin embargo, no fue capaz de inhibir la protección frente a la apoptosis temprana en el caso de la ceramida (Figura 16A) y sólo lo hizo parcialmente en el caso de la S1P (Figura 16B), siendo significativamente distinto del control y de la isquemia/recuperación. Estos resultados indican que PKC ϵ media la protección frente a la necrosis y/o apoptosis tardía en ambos esfingolípidos, pero no frente a la apoptosis temprana para la ceramida y sólo en parte para la S1P. Sin embargo, el tratamiento con BSM impidió completamente la protección de ambos tipos de muerte para los dos esfingolípidos. Estos datos sugerían que al menos otra isoforma de PKC está implicada en la protección de los esfingolípidos frente a la apoptosis inducida por isquemia/recuperación. PKC α , PKC γ y PKC ζ han sido descritas en varias rutas de supervivencia en distintos modelos de muerte, pero datos previos del laboratorio indicaron que no existían modificaciones ni de PKC α ni de PKC γ en nuestras condiciones, por lo que se consideró que la isoforma implicada en la protección podría ser PKC ζ . Para comprobar esta hipótesis se utilizó un inhibidor pseudosustrato de PKC ζ (PS) y se llevó a cabo un estudio por citometría de flujo igual al anterior. Como puede observarse en la Figura 16, en presencia de PS se inhibió completamente la protección frente a la apoptosis temprana de ambos esfingolípidos, así como la de la necrosis y/o apoptosis tardía. La implicación de la PKC ζ en la protección mediada por la ceramida y la S1P la confirmamos mediante un ensayo con MTT (Figura 15).

Teniendo en cuenta que la mitocondria juega un papel fundamental en la regulación de la apoptosis y de la necrosis y, en concreto, en el daño producido por la isquemia/recuperación, y el papel mediador de PKC ϵ y PKC ζ en la protección inducida por ceramida y S1P, se procedió a analizar si estas isoformas son capaces de actuar directamente en la mitocondria. Como los acontecimientos que ocurren en la mitocondria para dar lugar a la muerte posterior son bastante tempranos, se midió la translocación de ambas isoformas a la mitocondria en dos situaciones diferentes (1 hora de isquemia y 3 h de isquemia más 30 min de recuperación) en presencia de los esfingolípidos.

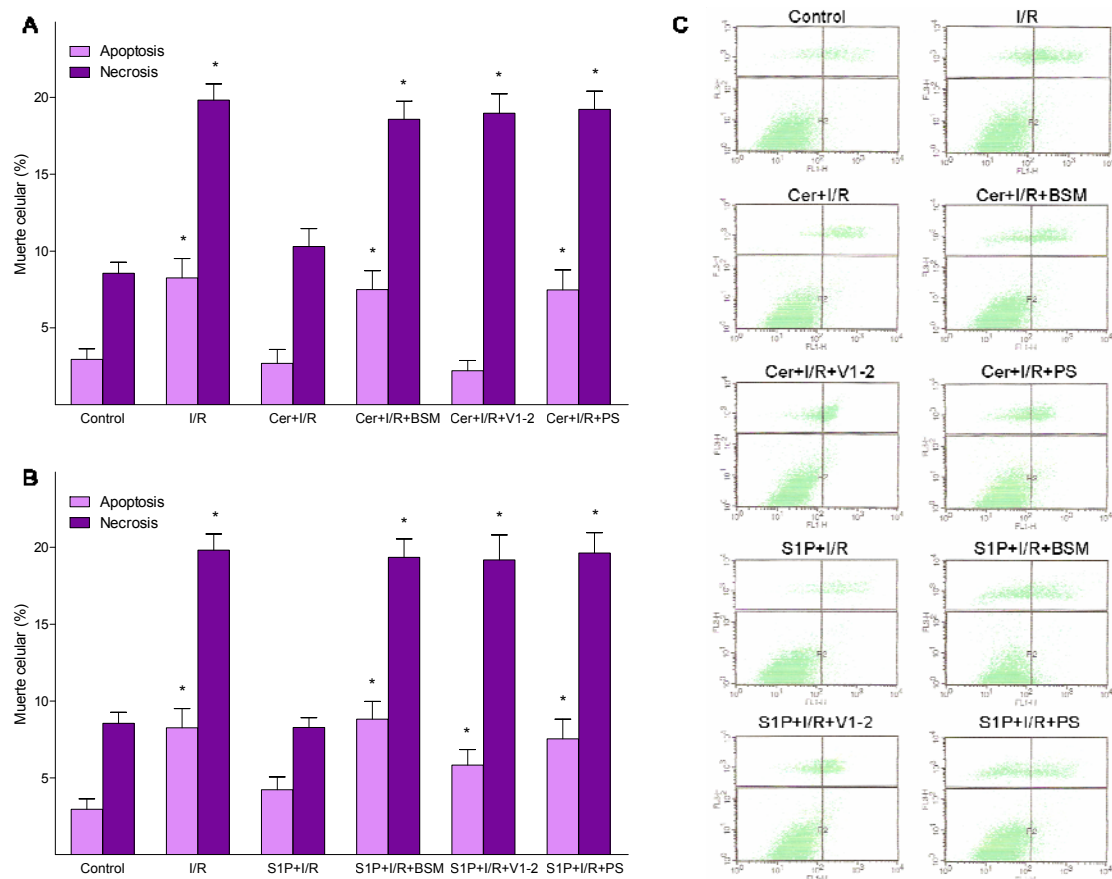


Figura 16. Medida de la apoptosis temprana y de la necrosis y/o apoptosis tardía en presencia de los esfingolípidos y de diferentes inhibidores de PKC. Las células fueron sometidas a 3 h de isquemia y 16 h de recuperación (excepto el control) en presencia o ausencia de ceramida (Cer) 10 μ M (A) o S1P 1 μ M (B) y BSM 10 nM, V1-2 5 μ M, y PS-PKC ζ (PS) 50 nM cuando se indica. Se valoró la apoptosis temprana y la necrosis y/o apoptosis tardía por citometría de flujo con anexina V-FITC e ioduro de propidio. * $p < 0,05$.

En la Figura 17A se observa que tanto la ceramida como 1 h de isquemia por separado indujeron la translocación de PKC ϵ a la mitocondria, mientras que cuando la ceramida fue añadida durante la isquemia la translocación fue menor incluso que el control. A pesar de esta menor translocación, los niveles de PKC fueron mayores de lo esperado, lo que sugiere un aumento general de la expresión. Después de 3 h de isquemia y 30 min de recuperación, tanto la ceramida como la isquemia/recuperación fueron capaces de translocar PKC ϵ , y cuando la ceramida estaba presente durante la isquemia/recuperación el efecto pareció ser aditivo. Respecto a PKC ζ , la ceramida sola indujo su translocación, manteniéndose altos niveles en el citosol, lo que también sugiere un aumento de expresión. En la mitocondria, cuando la ceramida estaba presente durante la isquemia, no se observó diferencia respecto al mismo tiempo de acción de la

isquemia por sí sola, pero los resultados indican que puede haber un aumento de expresión, ya que aumenta la cantidad en el citosol. La isquemia/recuperación provocó la translocación de PKC ζ a la mitocondria, que no varió en presencia de ceramida. Sin embargo, podría haber un aumento de la expresión porque los niveles detectados en el citosol parecen más elevados.

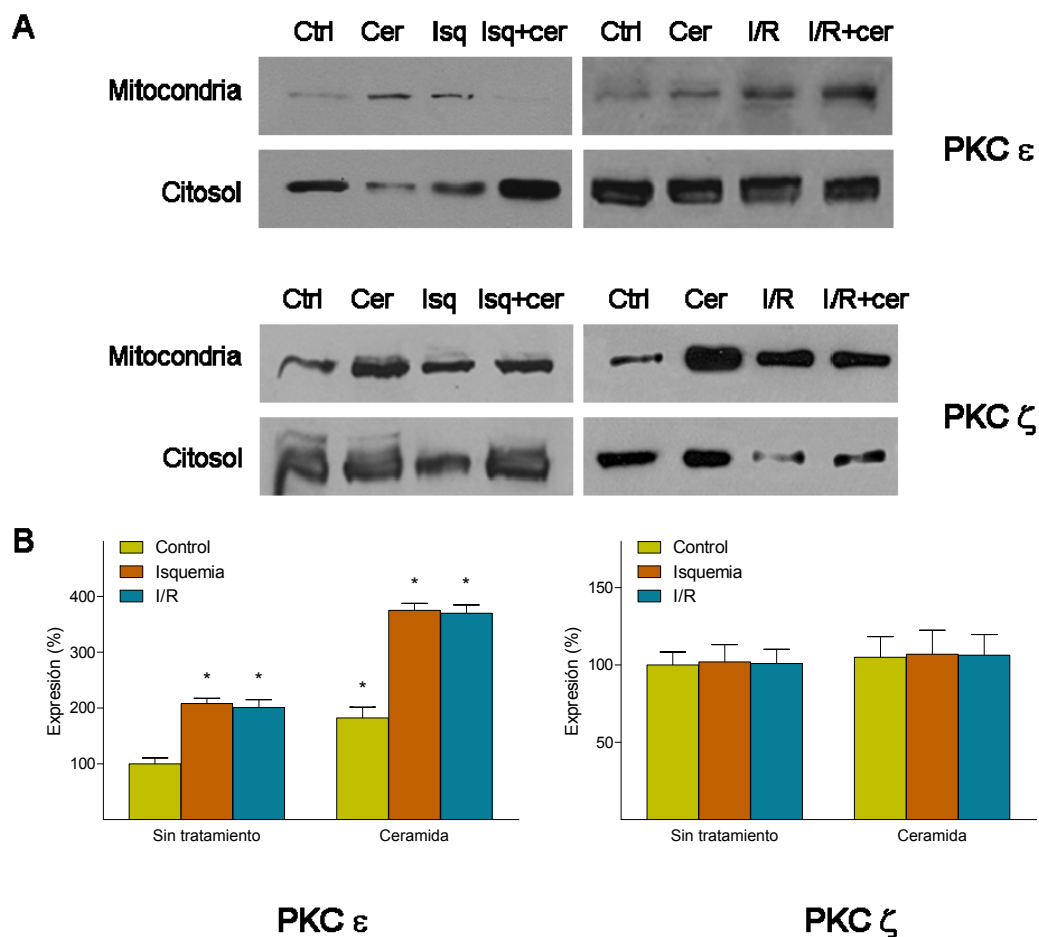


Figura 17. Efecto de la isquemia y de la ceramida sobre los niveles de de PKC ϵ y PKC ζ . Las células fueron sometidas a 1 h de isquemia (Isq) o a 3 h de isquemia y 30 min de recuperación (I/R) (excepto el control) en presencia o ausencia de ceramida. Posteriormente se extrajeron las proteínas de mitocondrias y citosol y se realizó un Western blot frente a PKC ϵ o PKC ζ (A) o se extrajo el RNA y se realizó una RT-qPCR frente a PKC ϵ o PKC ζ utilizando la β -actina como gen de referencia (B). * $p < 0,05$.

Para comprobar el posible aumento de la expresión de las isoformas PKC ϵ y PKC ζ , se llevó a cabo una RT-qPCR. En la Figura 17B se observa que tanto la isquemia como el tratamiento con ceramida por sí solos indujeron un aumento de expresión de PKC ϵ del 100%, siendo el efecto aditivo en las células sometidas a isquemia y tratadas con ceramida, cuadruplicándose los niveles respecto al control. Este aumento se mantuvo

durante la recuperación. Sin embargo, en ningún caso pudieron observarse variaciones en los niveles de PKC ζ .

En cuanto a la acción de la S1P, en la Figura 18A se aprecia que tanto el tratamiento con S1P como la isquemia aumentaron la translocación de PKC ϵ y cuando se administró S1P durante la isquemia, el efecto resultó aditivo. También puede observarse que después de 3 h de isquemia y 30 min de recuperación ocurrió lo mismo. Respecto a PKC ζ , el tratamiento con S1P indujo la translocación de la isoforma, pero no se observaron muchas diferencias en la mitocondria al tratar con S1P durante la isquemia, aunque es posible que haya un aumento de expresión de la enzima en el citosol como ocurría con la ceramida. Sin embargo, la presencia de S1P disminuyó la translocación inducida por la isquemia y la recuperación.

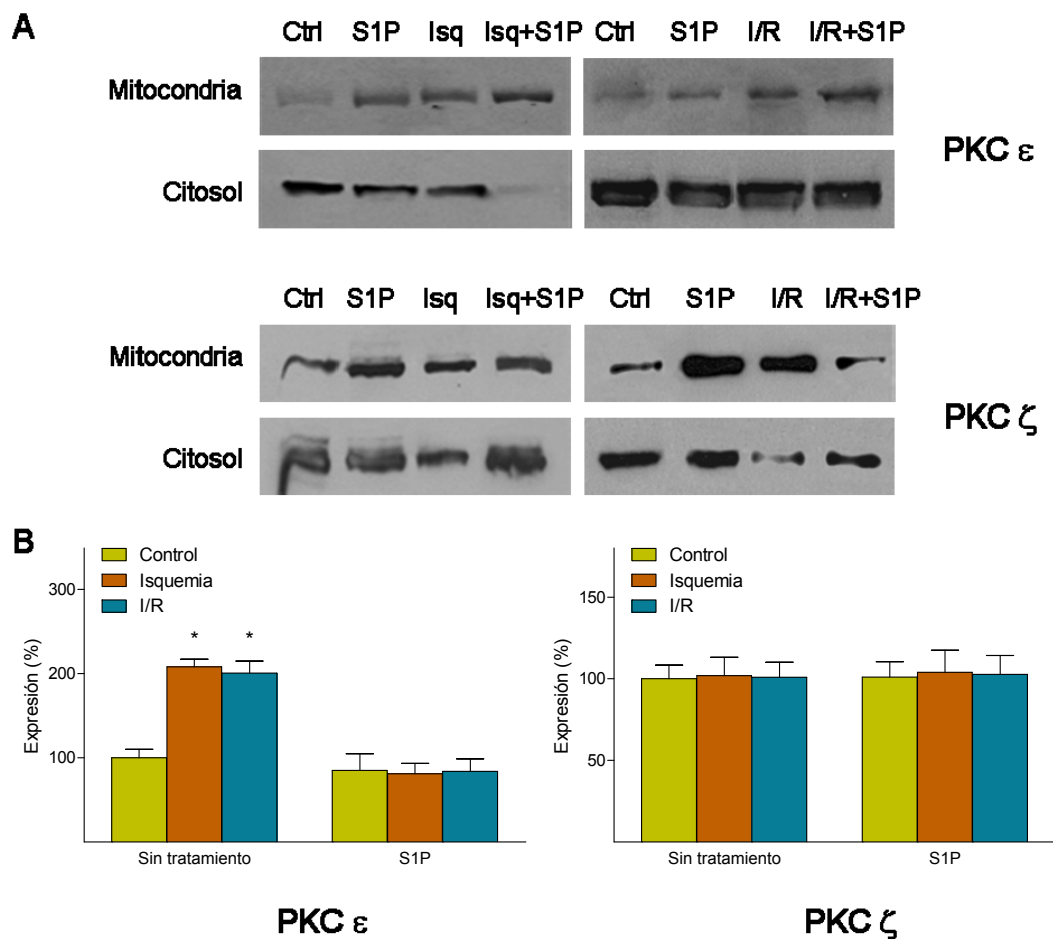


Figura 18. Efecto de la isquemia y de S1P sobre los niveles de de PKC ϵ y PKC ζ . Las células fueron sometidas a 1 h de isquemia (Isq) o a 3 h de isquemia y 30 min de recuperación (I/R) (excepto el control) en presencia o ausencia de S1P. Posteriormente se extrajeron las proteínas de mitocondrias y citosol y se realizó un Western blot frente a PKC ϵ o PKC ζ (A) o se extrajo el RNA y se realizó una RT-PCR frente a PKC ζ utilizando la β -actina como gen de referencia (B).

Los valores del análisis con RT-qPCR para comprobar variaciones en la expresión de PKC ϵ y PKC ζ en presencia de S1P se muestran en la Figura 18B. Puede observarse que la S1P impidió completamente el aumento de PKC ϵ inducido por la isquemia y la isquemia/recuperación. Los niveles de PKC ζ no variaron con los tratamientos.

Papel de la actividad caspasa en la acción protectora de ceramida y esfingosina 1-fosfato

Teniendo en cuenta que la actividad caspasa es una consecuencia de la inducción de apoptosis, se realizaron experimentos encaminados a conocer si la actividad de la caspasa 3 se modificaba tras el tratamiento con los esfingolípidos.

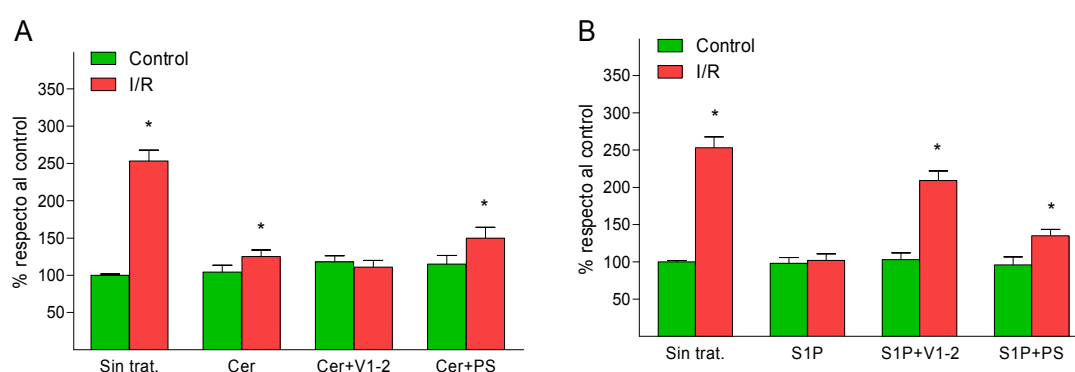


Figura 19. Acción de la isquemia/recuperación y el tratamiento con esfingolípidos sobre la actividad de la caspasa 3. Las células fueron sometidas a 3 h de isquemia y 16 h de recuperación (excepto el control) en presencia o ausencia (sin tratamiento) de ceramida 10 μ M (A) o S1P 1 μ M (B) y V1-2 5 μ M, y PS 50 nM cuando se indica. Posteriormente se extrajeron las proteínas y se valoró la actividad de la caspasa 3 con el sustrato colorimétrico Ac-DEVDpNa. Se muestra el aumento de actividad respecto al control. * $p < 0,05$.

Para ello se realizaron ensayos colorimétricos empleando el sustrato Ac-DEVDpNa específico para la caspasa 3. Como se observa en la Figura 19, la isquemia/recuperación incrementó la actividad de esta enzima más del doble. El tratamiento con los esfingolípidos durante la isquemia/recuperación condujo a una reducción de esta actividad, completamente en el caso de la S1P y manteniéndose ligeramente por encima del control en el caso de la ceramida. La menor actividad resultante del tratamiento con ceramida durante la isquemia/recuperación fue impedido parcialmente al inhibir PKC ζ con PS. Sin embargo, la inhibición de PKC ϵ con V1-2 no tuvo ningún efecto. En el

caso del tratamiento con S1P, la reducción en la actividad caspasa fue inhibida significativamente tanto por V1-2 como por PS. Sin embargo, con ninguno de los inhibidores se alcanzaron los niveles de activación obtenidos durante la isquemia/recuperación en ausencia del esfingolípido, alcanzándose una activación de aproximadamente el 200% en el caso de V1-2 y del 140% en el caso de PS.

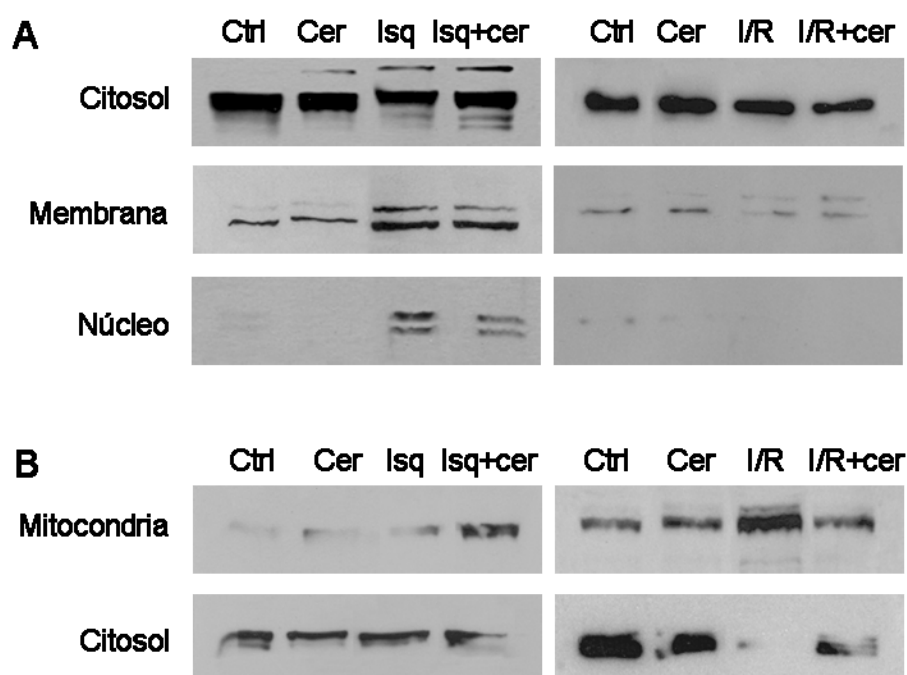


Figura 20. Distribución de PKC δ por acción de la isquemia y el tratamiento con ceramida. Las células fueron sometidas a 1 h de isquemia (Isq) o a 3 h de isquemia y 30 min de recuperación (I/R) (excepto el control) en presencia o ausencia de ceramida (Cer). Posteriormente se extrajeron las proteínas de citosol, membrana y núcleo (A) o de la mitocondria y el citosol (B) y se realizó un Western blot frente a PKC δ .

Un mediador frecuente en la apoptosis y en la necrosis es PKC δ , cuya acción ha sido descrita en la muerte inducida por isquemia/recuperación. Con el fin de analizar si los esfingolípidos tenían algún efecto sobre esta enzima, y teniendo en cuenta que se ha relacionado la muerte celular con la translocación de PKC δ a la membrana plasmática y fundamentalmente al núcleo, se realizó un Western blot para detectar PKC δ en dichas fracciones subcelulares de células sometidas a 1 h de isquemia o a 3 h de isquemia y 30 min de recuperación. Además, dada la importancia de la mitocondria en la muerte inducida por la isquemia/recuperación, se analizó también la translocación de PKC δ a la mitocondria. Como se puede apreciar en la Figura 20, la isquemia indujo la translocación de PKC δ al núcleo y a la membrana plasmática, no observándose ninguna

variación en la mitocondria. El tratamiento con ceramida durante la isquemia redujo la translocación de PKC δ al núcleo y a la membrana, y se provocó su translocación a la mitocondria. Después de 3 h de isquemia y 30 min de recuperación, sin embargo, los niveles de PKC δ tanto en la membrana como en el núcleo disminuyeron, aumentando notablemente en la mitocondria. El tratamiento con ceramida durante la isquemia/recuperación no tuvo ningún efecto en los niveles de PKC δ tanto en la membrana como en el núcleo, pero sí en la mitocondria, donde impidió la translocación inducida por la isquemia/recuperación.

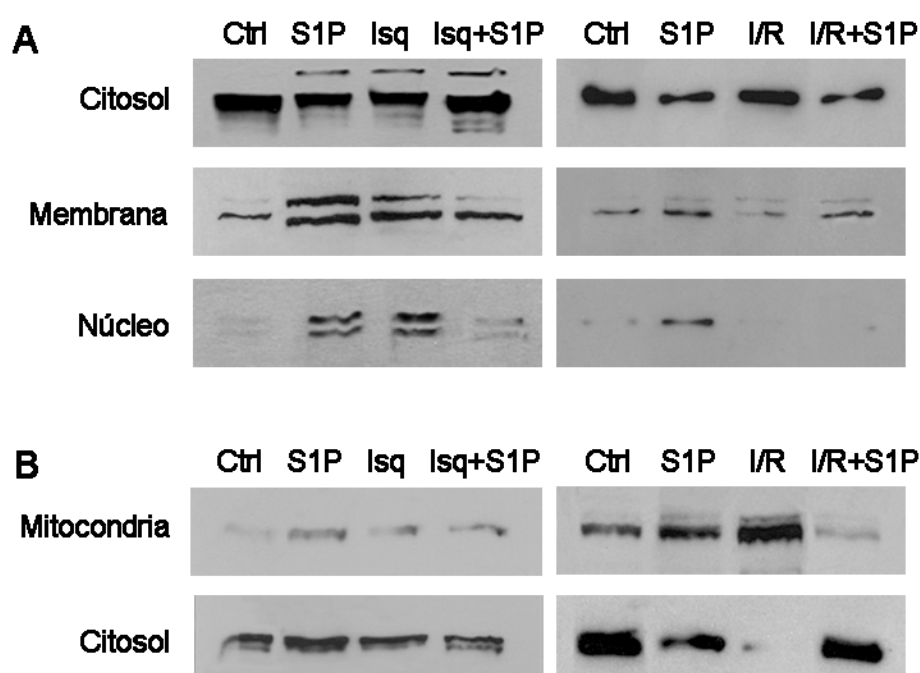


Figura 21. Distribución de PKC δ por acción de la isquemia y el tratamiento con S1P. Las células fueron sometidas a 1 h de isquemia (Isq) o a 3 h de isquemia y 30 min de recuperación (I/R) (excepto el control) en presencia o ausencia de S1P. Posteriormente se extrajeron las proteínas de citosol, membrana y núcleo (A) o de la mitocondria y el citosol (B) y se realizó un Western blot utilizando un anticuerpo anti-PKC δ .

Respecto a la S1P, en la Figura 21 se puede apreciar que tanto la S1P en condiciones normales como la isquemia, indujeron la translocación de PKC δ al núcleo y a la membrana, pero cuando se administró el esfingolípido durante la isquemia, se redujo sorprendentemente la translocación en ambas fracciones. En la mitocondria, la S1P en normoxia provocó un pequeño aumento de la isoforma, pero cuando se administró durante la isquemia no se observaron diferencias respecto a la isquemia. Después de 3 h de isquemia y 30 min de recuperación, sin embargo, los niveles de PKC δ en la

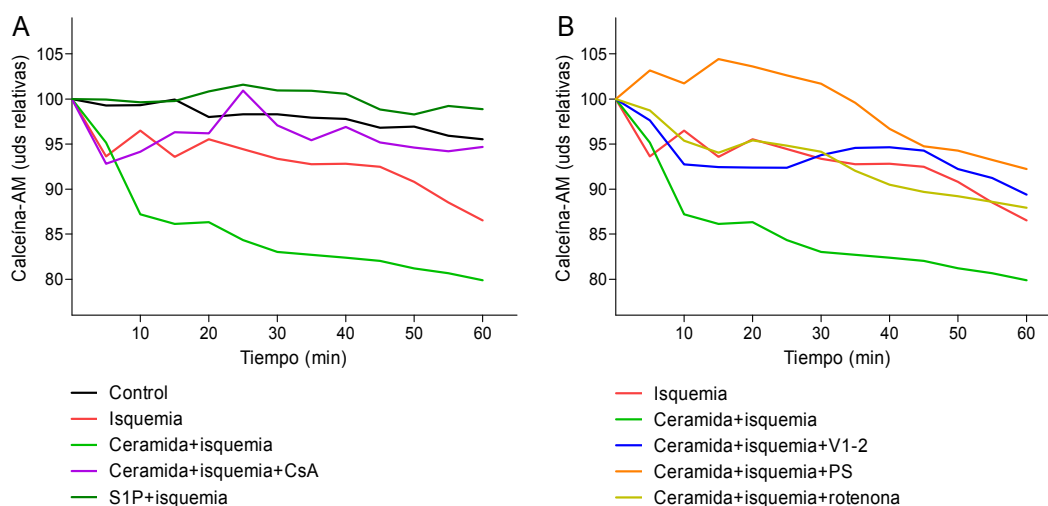
membrana y en el núcleo disminuyeron y aumentaron notablemente en la mitocondria. El tratamiento con S1P durante la isquemia/recuperación aumentó la translocación de PKC δ a la membrana y no tuvo ningún efecto en los niveles de la isoforma en el núcleo. En la mitocondria, el tratamiento con S1P redujo considerablemente la translocación de PKC δ inducida por la isquemia/recuperación incluso por debajo del control.

La ceramida impide la sobrecarga de calcio mitocondrial durante la isquemia a través de ROS y del mPTP

A la vista de los resultados obtenidos implicando a la mitocondria en la protección inducida por ceramida y S1P (Figuras 17, 18 y 19), el siguiente objetivo fue profundizar en el mecanismo de acción de estos esfingolípidos en la mitocondria.

Aunque se ha descrito la apertura del mPTP durante la recuperación, no se ha observado nunca directamente si éste puede abrirse durante la isquemia. Por lo tanto, se procedió a estudiar qué ocurría en nuestro modelo experimental y cuál era el efecto de los esfingolípidos. Para ello analizamos la apertura del poro por microscopía confocal con calceína y cloruro de cobalto. La calceína se acumula en las mitocondrias y en el citosol, pero su fluorescencia es desactivada (*quenching*) en el citosol por cloruro de cobalto. Si el mPTP se abre, se observa un descenso de la fluorescencia de la calceína al salir ésta de las mitocondrias a través del mPTP. En la Figura 22A se muestran los resultados obtenidos, indicando que la isquemia provoca una ligera apertura del mPTP y que el tratamiento conjunto con la ceramida induce una apertura mucho mayor. Se puede asegurar que se trata de apertura del mPTP porque el efecto de la ceramida se inhibe con CsA. Los resultados obtenidos en presencia de los inhibidores V1-2 y PS indican la implicación de las isoformas PKC ϵ y PKC ζ en la apertura inducida por ceramida (Figura 22B). S1P, por su parte, impidió la ligera apertura provocada por la isquemia (Figura 22A).

La apertura controlada y reversible del mPTP puede impedir la sobrecarga de calcio en la mitocondria, que conduce a la apertura irreversible del poro en la recuperación y en consecuencia a la muerte de la célula. Para comprobar si este era el mecanismo de protección de la ceramida, se analizó el calcio mitocondrial por microscopía confocal con la sonda de calcio rhod-2 AM, específica para el calcio mitocondrial. Como se observa en la Figura 23, la isquemia produjo un aumento de la carga de calcio, fundamentalmente a partir de los 40 min de isquemia, de más de un 20%. Por su parte, el tratamiento con ceramida provocó un descenso de la concentración de calcio mitocondrial que fue impedido por el tratamiento con CsA, inhibidor del mPTP, lo que indica que este efecto está mediado por la apertura del mPTP. Para comprobar que esta apertura realmente resultaba protectora, se realizaron ensayos con MTT en presencia de ceramida y CsA. En los resultados mostrados en la Figura 24 se puede apreciar como, efectivamente, la presencia de CsA impidió completamente el efecto protector de la ceramida, por lo que la apertura del mPTP inducida por el esfingolípido protege a las células de la muerte celular. Por otra parte, el tratamiento con CsA durante la recuperación también resultó protector, lo que indica que durante la recuperación se produce la apertura del mPTP, dando lugar al daño celular.



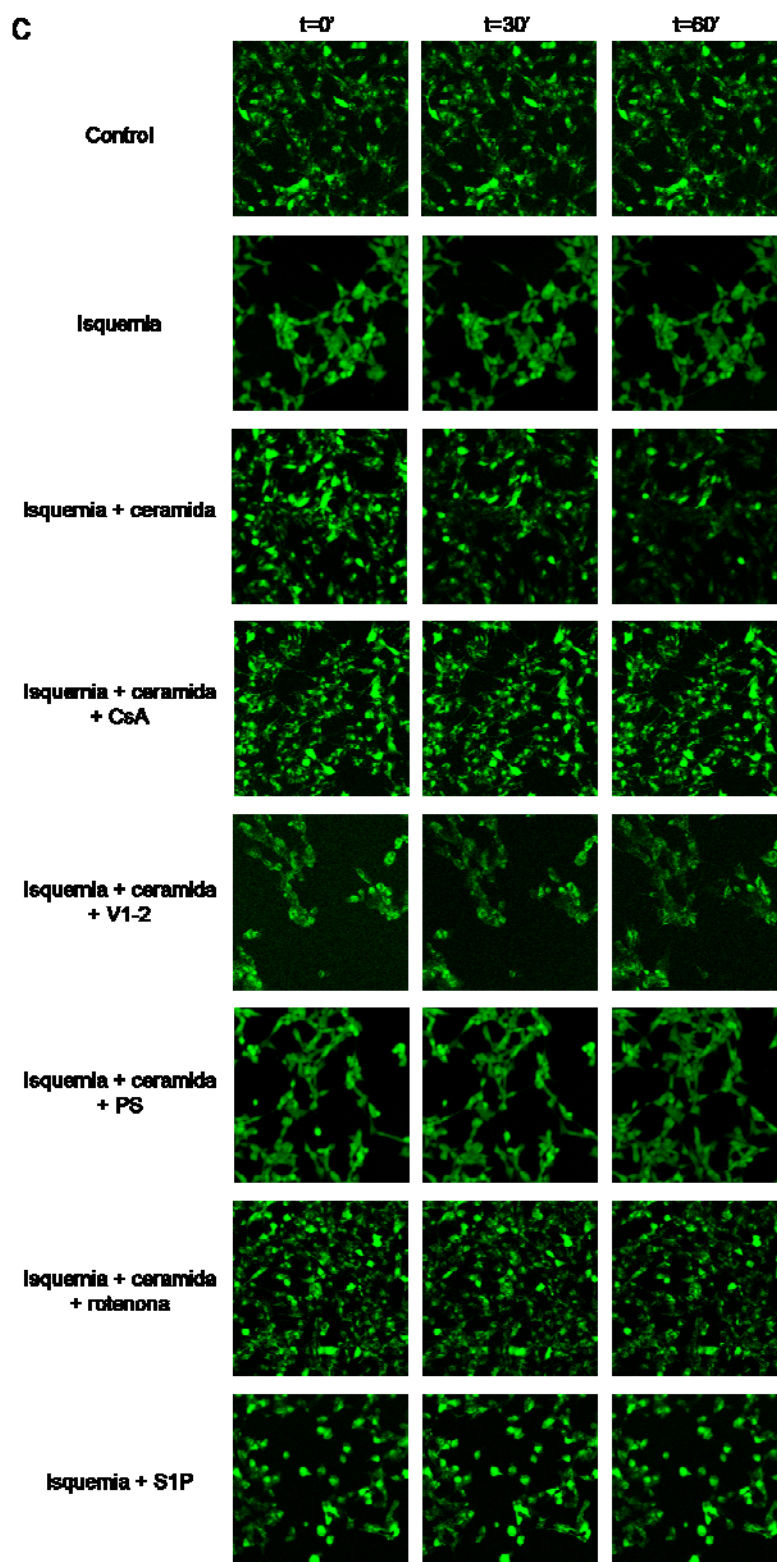
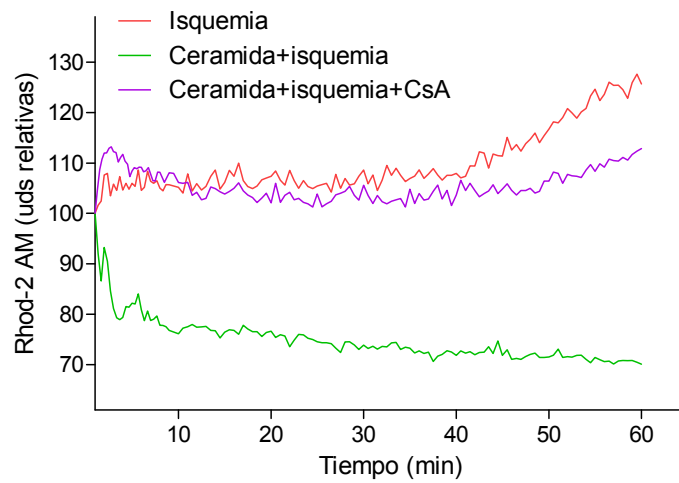


Figura 22. Acción de los esfingolípidos y de la isquemia sobre la apertura del mPTP. Las células fueron marcadas con calceína-AM y CoCl_2 y sometidas a 1 h de isquemia (excepto el control) con o sin ceramida $10 \mu\text{M}$ o S1P $1 \mu\text{M}$ y CsA $1 \mu\text{M}$, V1-2 $50 \mu\text{M}$, PS 50nM o rotenona $100 \mu\text{M}$ cuando se indica. Se adquirieron imágenes cada 5 min. (A y B) Fluorescencia relativa de al menos 40 células normalizadas respecto al punto inicial por cada tratamiento. (C) Fluorescencia de la calceína-AM en el punto inicial ($t=0'$), a los 30 min ($t=30'$) y a la hora ($t=60'$) en los distintos tratamientos.

A



B

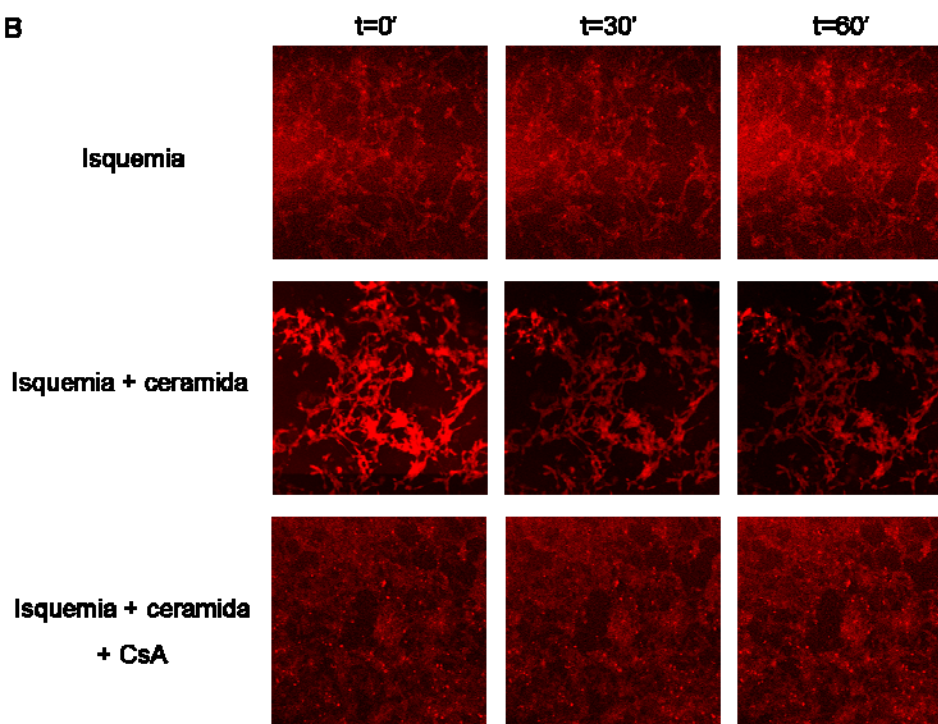


Figura 23. Efecto de la ceramida sobre el calcio mitocondrial durante la isquemia. Las células fueron marcadas con rhod-2 AM y sometidas a 1 h de isquemia con o sin ceramida 10 μ M y CsA 1 μ M cuando se indica. Se adquirieron imágenes cada 15 s. (A) Fluorescencia relativa de al menos 40 células normalizadas respecto al punto inicial por cada tratamiento. (B) Fluorescencia del rhod-2 AM en el punto inicial (t=0), a los 30 min (t=30') y a la hora (t=60') en los distintos tratamientos.

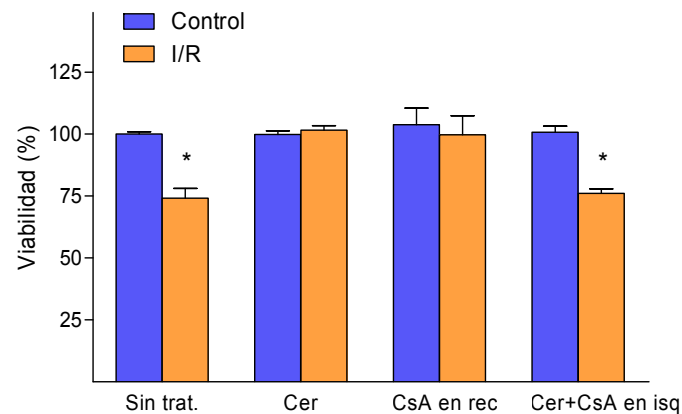


Figura 24. Efecto de la isquemia y de la ceramida sobre la viabilidad celular. Las células fueron sometidas a 3 h de isquemia y 16 h de recuperación (excepto el control) en presencia o ausencia (sin tratamiento) de ceramida (Cer) 10 μ M y CsA 1 μ M cuando se indica. Posteriormente se midió la viabilidad por MTT. isq: isquemia; rec: recuperación. * $p < 0,05$.

Con el fin de determinar a través de qué mecanismo la ceramida induce la apertura del mPTP durante la isquemia, se estudió la producción de ROS por microscopía confocal utilizando la sonda dihidrorodamina 123 (DHR 123). Está establecido que las ROS facilitan la apertura del mPTP, resultando en ocasiones aún más importantes que el propio calcio en dicha función. En la Figura 25 se observa cómo durante la isquemia se detectó un ligero aumento de aproximadamente el 10% en la generación de ROS, mientras que durante la recuperación aumentaron sus niveles más del 100% en pocos minutos. El tratamiento con ceramida durante la isquemia incrementó la producción de ROS alrededor de un 40% por encima de los niveles obtenidos durante la isquemia, mientras que durante el periodo de recuperación se redujeron los niveles de ROS significativamente. La presencia de PS impidió completamente el efecto de la ceramida durante la isquemia y la recuperación, por lo que se puede asegurar que la generación de ROS inducida por la ceramida está mediada por PKC ζ . Además, la acción de V1-2 impidió la formación de ROS durante la isquemia, pero no durante la recuperación, lo que indica que es necesaria la acción de PKC ϵ para la generación de ROS inducida por la ceramida durante la isquemia y por la propia isquemia. Para comprobar que esta mayor formación de ROS era la responsable de la apertura del mPTP durante la isquemia en presencia de ceramida, se trataron las células con rotenona, un inhibidor de la cadena de transporte de electrones, implicada en la producción ROS, y se analizó la

apertura del mPTP con calceína-AM y CoCl_2 . Como se puede apreciar en la Figura 22B, el tratamiento con rotenona inhibió completamente la apertura del mPTP inducida por ceramida, por lo que se puede deducir que las ROS inducidas por la ceramida se generan en la cadena de transporte electrónico y son las responsables de la apertura del poro.

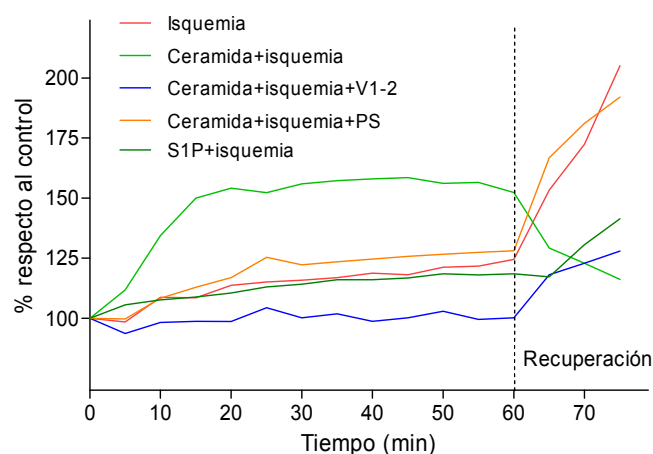


Figura 25. Efecto de la ceramida en la producción de ROS durante la isquemia. Las células fueron marcadas con DHR 123 y sometidas a 1 h de isquemia y 20 min de recuperación con o sin ceramida 10 μM y V1-2 50 μM o PS-PKC ζ 50 nM cuando se indica. Se adquirieron imágenes cada 5 min. (A) Porcentaje de ROS respecto al control de la media de al menos 40 células normalizadas respecto al punto inicial por cada tratamiento.

Efecto protector de la esfingosina 1-fosfato de las alteraciones inducidas por la isquemia en la mitocondria

A la vista de que la S1P no provoca la apertura del mPTP durante la isquemia como ocurre con la ceramida (Figura 22A), y para dilucidar el mecanismo por el que lleva a cabo su protección la S1P, se procedió a analizar otras alteraciones que se producen en la mitocondria durante la isquemia/recuperación para ver si la S1P era capaz de proteger de alguna de ellas. Una de las principales alteraciones es la despolarización de la membrana mitocondrial. El potencial de membrana de la mitocondria se debe fundamentalmente al gradiente de protones generado por la cadena respiratoria. Durante la isquemia la ausencia de O_2 afecta al funcionamiento de la cadena respiratoria y, en consecuencia, la membrana mitocondrial se despolariza. Si la caída de potencial es muy elevada y se mantiene demasiado tiempo, la mitocondria se altera irreversiblemente y la

célula se muere. Para investigar los cambios en el potencial debidos a la isquemia y el efecto del tratamiento con S1P, se midió el potencial de membrana mediante microscopía confocal utilizando la sonda fluorescente TMRM. En la Figura 26 se muestran los resultados obtenidos. El tratamiento con S1P impidió parcialmente la caída de potencial producida por la isquemia y permitió cierta repolarización en la recuperación. Estos efectos fueron inhibidos completamente por V1-2, pero no por PS, lo que indica que están mediados por PKC ϵ pero no por PKC ζ .

Otra alteración significativa que se produce durante la isquemia en la mitocondria es la sobrecarga de calcio, ya observada en la Figura 23, lo que conduce a la apertura del mPTP durante la recuperación, que es una de las principales causas del daño producido en la isquemia/recuperación. Teniendo esto en cuenta, se decidió analizar si el tratamiento con S1P modificaba la sobrecarga de calcio producida por la isquemia en la mitocondria. Como se observa en la Figura 27, el tratamiento con S1P durante la isquemia redujo significativamente la carga de calcio cerca de un 40%. Este efecto fue parcialmente inhibido por V1-2, lo que indica que el efecto está mediado por PKC ϵ . En otros sistemas se ha descrito que PKC ϵ activa el canal de potasio mitoK_{ATP}, cuya apertura está relacionada con la protección frente a la isquemia. El tratamiento con el inhibidor de dicho canal, 5HD, también impidió el descenso de calcio inducido por S1P, por lo que parece que este canal media la protección ejercida por el esfingolípido. La implicación del mitoK_{ATP} se confirmó por MTT, ya que el 5HD impidió parcialmente la protección mediada por S1P como se muestra en la Figura 28.

Otra alteración importante que se produce durante la isquemia/recuperación en la mitocondria es la formación de ROS, observada en la Figura 25. En dicha Figura puede observarse que el tratamiento con S1P no afectó a los niveles de ROS durante la isquemia, pero sí redujo la sobreproducción de ROS durante la recuperación.

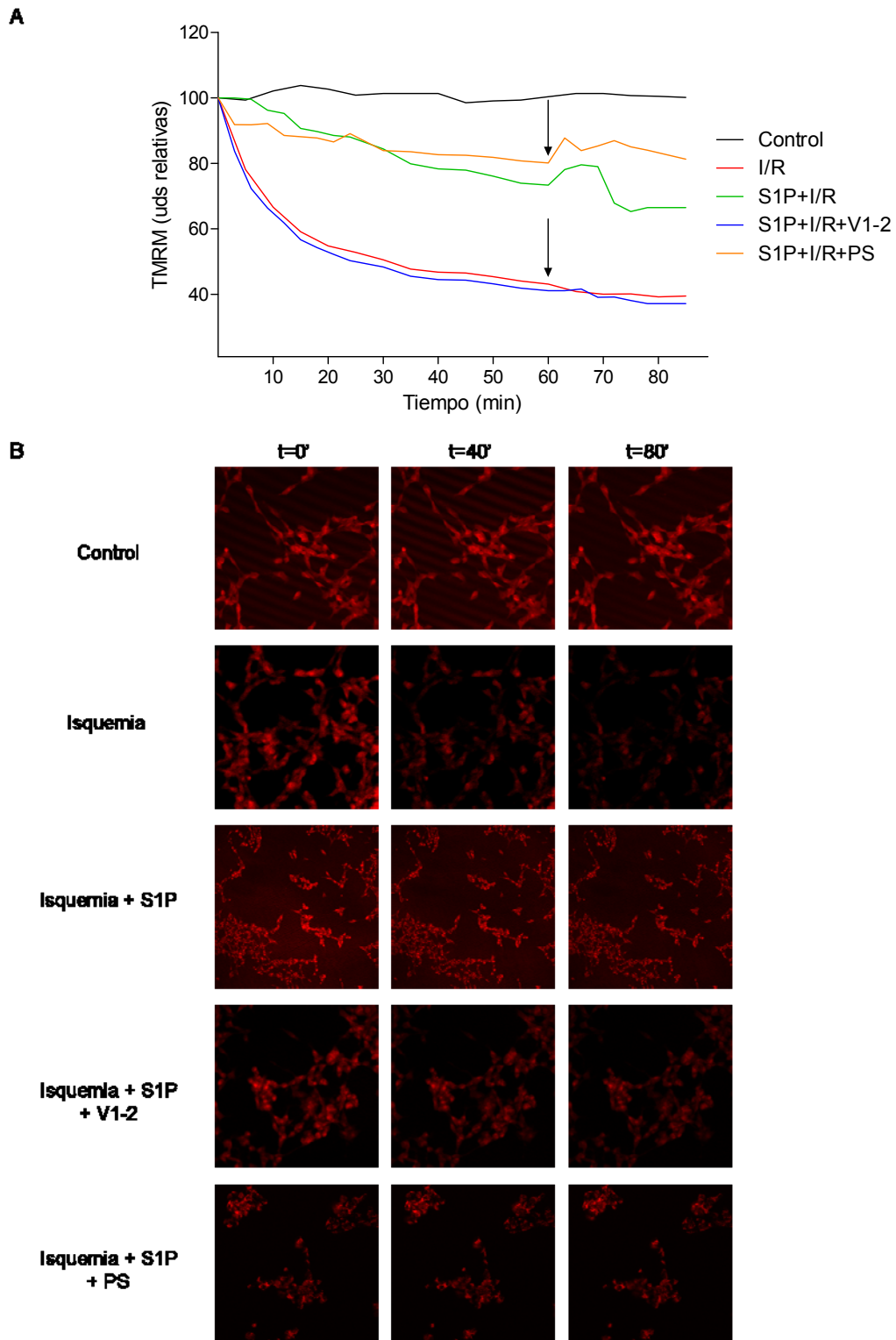


Figura 26. Efecto de la S1P sobre el potencial de membrana mitocondrial durante la isquemia/recuperación. Las células fueron marcadas con TMRM y sometidas a 1 h de isquemia y 25 min de recuperación (excepto el control) con o sin S1P 1 μ M y V1-2 50 μ M o PS 50 nM cuando se indica. Se adquirieron imágenes cada 5 min. (A) Fluorescencia relativa de al menos 40 células normalizadas respecto al punto inicial por cada tratamiento. Las flechas indican el punto de inicio de la recuperación. (B) Fluorescencia del TMRM en el punto inicial (t=0), a los 40 min (t=40') y a los 80 min (t=80') en los distintos tratamientos.

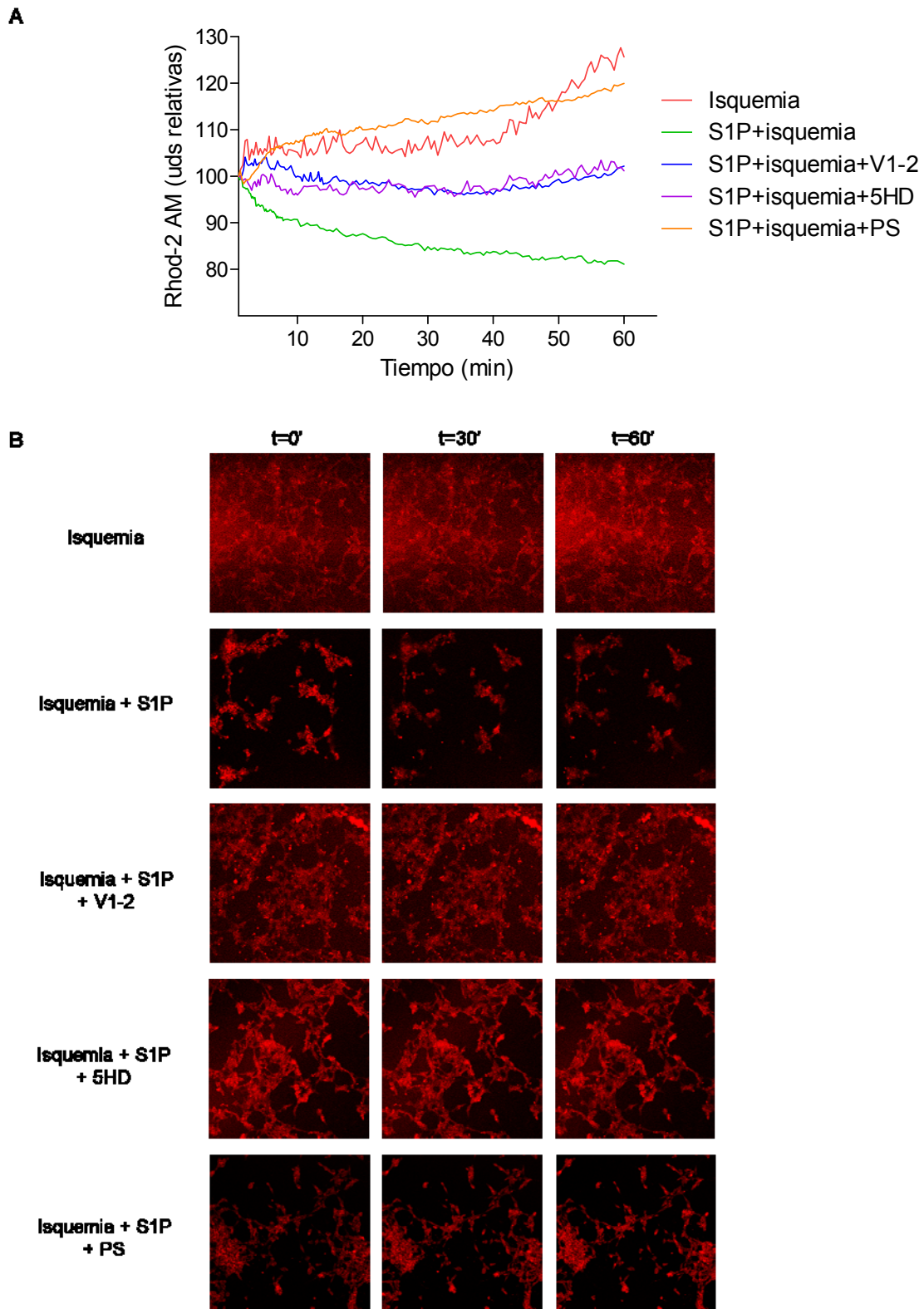


Figura 27. Efecto de la S1P en el calcio mitocondrial durante la isquemia. Las células fueron marcadas con rhod-2 AM y sometidas a 1 h de isquemia con o sin S1P 1 μ M y V1-2 50 μ M, 5HD 300 μ M o PS 50 nM cuando se indica. Se tomaron fotos cada 15 s. (A) Fluorescencia relativa de al menos 40 células normalizadas respecto al punto inicial por cada tratamiento. (B) Fluorescencia del rhod 2-AM en el punto inicial (t=0), a los 30 min (t=30') y a la hora (t=60') en los distintos tratamientos

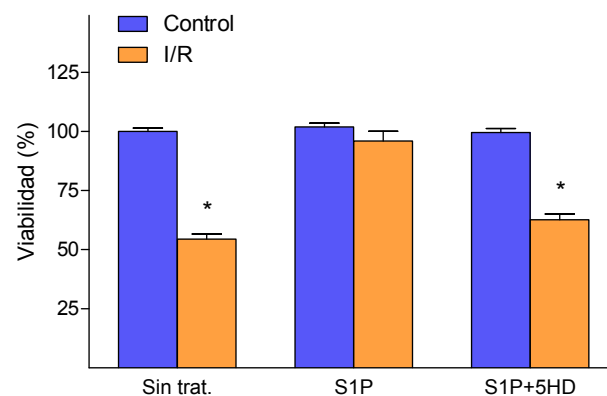


Figura 28. Efecto del 5HD en la acción de la S1P sobre la viabilidad celular en isquemia. Las células fueron sometidas a 3 h de isquemia y 16 h de recuperación (excepto el control) en presencia o ausencia de S1P 1 μ M y 5HD 300 μ M cuando se indica. Posteriormente se midió la viabilidad por MTT. * $p < 0,05$.

Cuando el mPTP se abre durante la recuperación, la entrada de solutos y agua provocan el hinchamiento (*swelling*) de la mitocondria. Si la apertura del mPTP es irreversible, la membrana externa de la mitocondria acaba rompiéndose y la célula muere. La capacidad de las mitocondrias para resistir este *swelling* se ha relacionado con la protección frente a la isquemia/recuperación. Como los resultados de los experimentos indican que la S1P protege a la mitocondria del daño producido por la isquemia/recuperación (Figuras 26 y 27), se procedió a analizar la capacidad de resistencia de las mitocondrias a este *swelling* tras el tratamiento con S1P. Para ello, aislamos mitocondrias de células que habían sido sometidas a 3 h de isquemia en presencia o ausencia de S1P y se midió el *swelling* mitocondrial como un descenso de la absorbancia a 520 nm tras inducir la apertura del mPTP con calcio. Como se puede apreciar en la Figura 29, mientras que en las mitocondrias sometidas a isquemia se produjo un gran *swelling*, correspondiente a un descenso de más del 15% de la absorbancia, éste fue significativamente menor en las mitocondrias tratadas con S1P durante la isquemia, lo que sugiere que la S1P induce el mantenimiento de la integridad de las mitocondrias durante la isquemia.

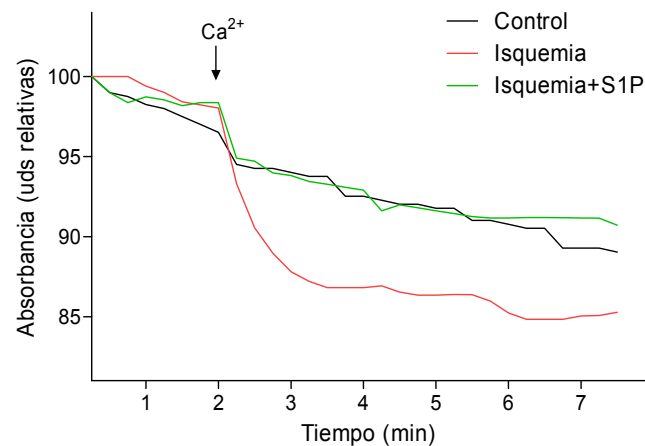


Figura 29. Efecto de la S1P en el hinchamiento de mitocondrias sometidas a isquemia. Las mitocondrias fueron extraídas de células sometidas a 3 h de isquemia y 16 h de recuperación (excepto el control) en presencia o ausencia de S1P 1 μ M y se midió el descenso en la absorbancia a 520 nm tras inducir el hinchamiento con CaCl_2 250 μ M. Se representan los valores normalizados respecto al punto inicial.

Papel de HIF en la protección a largo plazo producida por los esfingolípidos

Los resultados obtenidos indican que los esfingolípidos activan diversos mecanismos durante la isquemia/recuperación que permiten la protección inmediata de la célula, pero también podrían activar mecanismos a más largo plazo. Una forma de conseguir dicha protección sería mediante la inducción del factor de transcripción HIF, el cual se forma durante la isquemia y favorece la expresión de genes relacionados con la protección de la muerte producida por isquemia. Para ver si los esfingolípidos afectaban a la formación de HIF, realizamos un Western blot frente a HIF-1 α en fracciones nucleares de células sometidas a 1 h de isquemia, ya que esta subunidad sólo pasa al núcleo al unirse a HIF- β . De los resultados obtenidos en la Figura 30, se puede deducir que tanto la ceramida como la S1P inducen un incremento de la formación de HIF respecto al aumento ya producido por la isquemia. Este aumento producido por ambos esfingolípidos se inhibió con wortmanina, lo que indica que el efecto está mediado por PI3K. Adicionalmente, el efecto de S1P sobre el incremento de HIF fue impedido por PTX, lo que indica que está mediado por receptor.

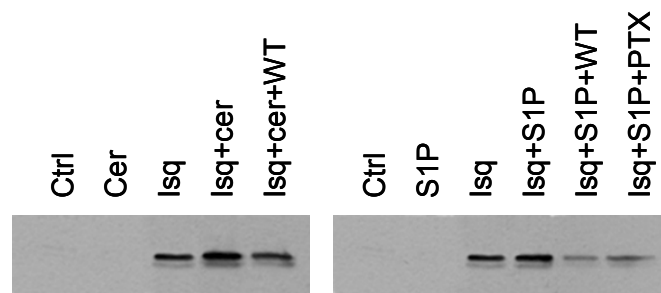


Figura 30. Acción de la ceramida y de S1P en los niveles de HIF. Las células fueron sometidas a 1 h de ischemia (excepto el control) en presencia o ausencia de ceramida 10 μ M (izquierda) o S1P 1 μ M (derecha). Posteriormente se extrajeron las proteínas del núcleo y se realizó un Western blot frente a HIF-1 α .

5. DISCUSIÓN

La isquemia cerebral es un trastorno neurológico originado por la disminución brusca del aporte sanguíneo, en una zona del cerebro, hasta unos niveles que resultan insuficientes para mantener el metabolismo y las funciones normales de las células. En la actualidad, el daño celular que se produce durante un período de isquemia y una posterior recuperación de las condiciones normales está siendo estudiado por muchos grupos de investigación, debido a que los accidentes isquémicos en el cerebro son una de las principales causas de muerte e incapacidad en los países desarrollados ⁶⁸. En este sentido, aunque se ha hecho un gran avance durante los últimos años, todavía no se conocen todos los mecanismos mediante los cuales la isquemia/ recuperación da lugar a la muerte celular. Actualmente, tampoco existe una terapia eficaz para minimizar el daño en los pacientes que sufren un ictus cerebral, ya que las moléculas que ejercen un efecto protector en modelos animales dan lugar a demasiados efectos secundarios en humanos ^{134,135}. Por todo lo anteriormente expuesto, resulta muy interesante encontrar nuevas moléculas con actividad protectora. En esta tesis se presentan dos esfingolípidos, la ceramida y la esfingosina 1-fosfato, como protectores de la muerte celular inducida por isquemia/recuperación, y se describe el mecanismo a través del cual ejercen su acción. Estos dos esfingolípidos son moléculas endógenas en el cerebro, por lo que las posibilidades de que no produzcan los efectos adversos a los que dan lugar otro tipo de moléculas podrían ser mayores.

5.1 MODELO DE ISQUEMIA: PRIVACIÓN DE LA GLUCOSA Y DEL OXÍGENO

La privación de oxígeno y glucosa (OGD) es un modelo altamente empleado para estudiar la isquemia en cultivos celulares ¹⁴²⁻¹⁴⁴. No obstante, presenta diferencias con la isquemia *in vivo*, siendo la principal la tasa de consumo de energía, ya que mientras que durante la isquemia *in vivo* las neuronas consumen toda la energía en pocos min, en cultivos celulares sometidos a OGD la tasa es mucho menor, siendo necesario entre 30 min y ocasionalmente 2 h para alcanzar el estado de ausencia de energía total ¹⁴⁵. Teniendo esto en cuenta, previamente al estudio neuroprotector de los esfingolípidos medimos la muerte provocada por distintos tiempos de isquemia seguidos de recuperación. Estos experimentos mostraron que después de 3 h de isquemia y 16 h de recuperación se producía una muerte de al menos el 30%, suficiente para poder estudiar

la protección. A pesar de estas diferencias, la OGD es un modelo de isquemia que imita muy bien los cambios que se producen a nivel molecular y está ampliamente aceptado.

5.2 PROTECCIÓN POR LA CERAMIDA

Uno de los principales resultados de este estudio es la demostración de que la ceramida protege frente a la muerte inducida por isquemia/recuperación. La ceramida siempre ha estado ligada a la muerte celular^{34,146,147}. Así, muchos inductores de apoptosis activan enzimas de la biosíntesis de los esfingolípidos, como las SMasas, promoviendo la formación de ceramida^{9,37,148}. Sin embargo, en el presente trabajo se demuestra que a una concentración tan baja como 10 μ M, la ceramida puede ser protectora de la muerte celular (Figura 9A). Además, hay que destacar que a esta concentración, la ceramida no produce muerte por necrosis ni por apoptosis. Otros investigadores han sugerido anteriormente que concentraciones bajas de ceramida dan lugar a efectos protectores. Sin embargo, los mecanismos moleculares que median la citoprotección no se conocen todavía^{22,149}. Adicionalmente, se ha observado que el preconditionamiento isquémico induce la formación de determinadas ceramidas y que la inhibición de su síntesis impide la protección mediada por dicho preconditionamiento isquémico¹⁴².

La ceramida protege durante el preconditionamiento, la isquemia y la recuperación

Los resultados obtenidos indican que la protección producida por la ceramida tiene lugar en todas las fases de la isquemia/recuperación, incluso en el preconditionamiento, aunque la protección total de la muerte celular sólo se produce cuando la ceramida está presente al menos durante la isquemia y la recuperación (Figura 11A). Este hecho es importante porque la ceramida podría administrarse antes de la isquemia cuando se conoce el momento en que se va a producir la misma, como en operaciones programadas que impliquen un pequeño periodo de hipoxia, o una vez iniciada la misma, como ocurre en la mayoría de las ocasiones por accidentes cardiovasculares, lo que hace a la ceramida potencialmente ventajosa para la aplicación clínica. La protección producida por la ceramida cuando es administrada sólo en el preconditionamiento se puede explicar porque la ceramida activa distintos procesos que

se mantienen activados o cuyos efectos permanecen un tiempo a pesar de que la ceramida no esté presente, como sucede con el preconditionamiento isquémico. En este sentido, los resultados obtenidos indican que la ceramida en isquemia induce la formación de HIF (Figura 30), que promueve la expresión de diversos genes relacionados con la supervivencia y cuya acción protectora tendrá efecto aunque el tratamiento con ceramida haya cesado.

Por otra parte, los datos obtenidos muestran que siempre que la ceramida esté presente durante la isquemia y la recuperación la protección es completa, independientemente de que haya habido un pretratamiento con ceramida o no (Figura 11A). Por este motivo el resto de los experimentos se realizaron sin pretratar con el esfingolípido.

La ceramida protege de la apoptosis y de la necrosis

En un episodio isquémico las células que sufren directamente la isquemia mueren generalmente por necrosis. Por su parte, las de la zona de penumbra, que rodean la zona donde se produce la isquemia, siguen manteniendo un cierto riego sanguíneo y, por tanto, capacidad para generar ATP, por lo que mueren fundamentalmente por apoptosis^{70,150,151}. Como se demuestra en este trabajo, la ceramida protege de ambos tipos de muerte celular (Figura 12A).

Aparentemente la protección de la necrosis por ceramida se produce tanto en la isquemia como en la recuperación de forma independiente, y es completa en ambos casos (Figura 13A). La muerte por necrosis se debe fundamentalmente a la apertura del mPTP en la recuperación. Esta apertura se produce principalmente por la sobrecarga de calcio que tiene lugar en la mitocondria durante la isquemia y por el aumento brusco de ROS que se produce durante la recuperación¹⁵². En el modelo experimental que se presenta, el tratamiento con ceramida durante la isquemia impide la sobrecarga de calcio, y durante la recuperación frena el aumento de ROS. La disminución de la concentración de calcio mitocondrial se ha relacionado previamente con la inhibición de la apertura del mPTP en la recuperación y con la protección frente a la muerte^{153,154}. Igualmente, la reducción en la formación de ROS se ha observado en el postcondicionamiento isquémico, resultando protectora al impedir la apertura del mPTP^{155,156}. Esto explica que el tratamiento con ceramida en cualquiera de las dos fases inhiba la necrosis totalmente.

En el caso de la apoptosis, sin embargo, los datos obtenidos parecen indicar que para que haya protección es necesario que la ceramida esté presente en ambas fases. Cuando sólo está presente en una de las fases, no sólo no hay protección, sino que además el porcentaje de células apoptóticas es algo mayor (Figura 13A). Ante estos resultados se podría especular que la ceramida, además de proteger de la apoptosis, minimiza el daño en células que en ausencia de ceramida morirían por necrosis, de modo que la alteración en las mismas es menor y algunas células en lugar de morir por necrosis lo hacen por apoptosis. Una posible explicación para esto sería que al encontrarse la ceramida en sólo una de las fases, no inhibe la sobrecarga de calcio y el incremento brusco de ROS a la vez, sino que sólo se inhibe uno de estos factores. De este modo, aunque impida una apertura irreversible del mPTP durante la recuperación, se mantiene una apertura incompleta. Este hecho provocaría la liberación de factores proapoptóticos como el citocromo c y la consecuente muerte por apoptosis¹⁵⁷. Como resultado de todo esto se produce un aumento en el número de células apoptóticas que resulta estar por encima de la media en ausencia de ceramida. Este hecho podría enmascarar la protección de la ceramida frente a la apoptosis. Cuando la ceramida está presente en las dos fases de la isquemia/recuperación, la protección que genera el tratamiento con ceramida es completo, tanto de la apoptosis como de la necrosis, ya que impide la apertura del mPTP completamente. Hay que destacar que el aumento del porcentaje de apoptosis frente al de necrosis es una forma de protección, ya que la necrosis provoca un enorme daño en las células adyacentes al liberarse el contenido citoplasmático de las células¹⁵⁸. Por otra parte, los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la isquemia/recuperación induce la activación de las caspasas, importantes mediadores de la apoptosis. En este sentido, después del tratamiento con ceramida durante la isquemia/recuperación se detecta menos actividad caspasa (Figura 19A), hecho que indica también el efecto protector neto del esfingolípido frente a la apoptosis. Asimismo, los datos aportados indican que la protección frente a la apoptosis también puede deberse a la inhibición de PKC δ . La ceramida impide parcialmente la translocación de dicha PKC a la membrana inducida por la isquemia y completamente su translocación al núcleo (Figura 20A). Esta translocación es un evento temprano en la apoptosis, por lo que en este modelo experimental ya se detecta tras 1 h de isquemia. La activación de PKC δ , y en concreto su translocación al núcleo, ha sido previamente relacionada con la inducción de apoptosis¹⁵⁹. De hecho, la mayoría de las dianas

conocidas de PKC δ son proteínas nucleares, ya sean proteínas estructurales o enzimas. Además, PKC δ regula distintos factores de transcripción relacionados con la apoptosis, como p53, p73 ϵ o STAT1^{160,161}. Por otra parte, la translocación de PKC δ a la mitocondria durante la recuperación se ha relacionado con el daño inducido por la isquemia/recuperación¹⁶²⁻¹⁶⁴. Esta translocación también es inhibida por la ceramida (Figura 20B). Todos estos datos indican que es muy posible que la ceramida proteja de la apoptosis al inhibir PKC δ .

Las rutas clásicas de supervivencia, que implican a diferentes proteínas quinasas (PI3K/Akt, MAPK, PKC) están implicadas en la protección frente a la isquemia por el preconditionamiento isquémico y por distintos fármacos¹⁶⁴⁻¹⁶⁶. Los resultados obtenidos muestran que estas rutas median la acción protectora de la ceramida (Figura 14A). No hay que descartar la posibilidad de que estas vías interactúen entre sí, activándose unas a otras, como ya ha sido previamente descrito en otras ocasiones¹⁶⁵. De todas estas vías activadas por la ceramida, los presentes estudios se han centrado en la familia de las PKCs por estar más directamente relacionada con la protección frente a la isquemia/recuperación^{164,166}. Los resultados presentados demuestran que tanto PKC ϵ como PKC ζ están implicadas en la protección inducida por ceramida (Figura 15A), de modo que PKC ϵ media la protección frente a la necrosis, mientras que la protección frente a la apoptosis parece estar mediada por PKC ζ , que a su vez también protege de la necrosis (Figura 16A). Los resultados obtenidos también demuestran que tanto la ceramida como la isquemia inducen la expresión de PKC ϵ , produciéndose un efecto aditivo cuando la ceramida se administra durante la isquemia (Figura 17B). Son muchos los estudios que demuestran el papel protector de la PKC ϵ frente a la isquemia en distintos órganos, fundamentalmente en corazón¹⁶⁷⁻¹⁶⁹. La PKC ϵ está implicada en el mecanismo protector del preconditionamiento isquémico y de distintos protectores farmacológicos como el diazóxido¹⁷⁰⁻¹⁷². Además, parece que la diana molecular de la PKC ϵ se encuentra en la mitocondria y se han hallado diferentes proteínas que pueden ser reguladas por la PKC ϵ en la mitocondria¹⁶⁷. En este sentido, se ha descrito previamente que PKC ϵ puede actuar abriendo el mitoK_{ATP} (canal de potasio dependiente de ATP que introduce activamente potasio en la mitocondria), hecho que da lugar a un efecto protector. Además, PKC ϵ puede también activarse como consecuencia de dicha apertura¹³⁰. Esta isoforma también puede interactuar directamente con VDAC, la cual se sospecha que podría formar parte del mPTP¹⁷³. Sin

embargo, en el caso de la ceramida, aunque PKC ϵ participa claramente en los eventos que suceden en la mitocondria durante la isquemia, no se detecta un incremento de dicha PKC en la mitocondria cuando la ceramida está presente durante la isquemia (Figura 17A), por lo que es posible que haya un intermediario entre PKC ϵ y la mitocondria. Todos los datos publicados indican que la población de PKC ϵ de la mitocondria inhibe directa o indirectamente la apertura del mPTP^{130,167,173}. Teniendo en cuenta que la ceramida induce la apertura del mPTP durante la isquemia (Figura 22), resultaría lógico que los niveles de PKC ϵ en la mitocondria fuesen menores por el tratamiento con dicho esfingolípido. Durante la recuperación, sin embargo, se detecta una población clara de PKC ϵ en la mitocondria, por lo que su acción puede ser directa. Esto podría correlacionarse con una inhibición del mPTP durante la recuperación.

Por otra parte, aunque el papel de PKC ζ en la supervivencia celular está muy establecido^{51,55,174}, nunca antes se ha relacionado esta isoforma con la protección frente a la isquemia, siendo los datos aquí presentados los primeros aportados en este sentido. En estos se demuestra que la PKC ζ protege de la apoptosis y de la necrosis provocada por la isquemia/recuperación (Figura 16A).

Tras el tratamiento con ceramida durante la isquemia/recuperación se obtiene una menor actividad caspasa 3 (Figura 19A). Ésta menor actividad está sólo parcialmente mediada por PKC ζ . Sin embargo, PKC ζ protege completamente de la apoptosis inducida por la isquemia/recuperación (Figura 16A), por lo que el mecanismo protector de la PKC ζ frente a la apoptosis implica vías independientes de caspasas, o bien, además de actuar antes de la activación de las caspasas, lo hace también posteriormente. Se ha descrito que PKC ζ fosforila la proteína proapoptótica Bad, favoreciendo su secuestro en el citosol por la proteína 14-3-3 e impidiendo, por tanto, su acción¹⁷⁵. Este es un posible mecanismo que explicaría la menor activación de las caspasas. Además, la protección de PKC ζ se ha relacionado tradicionalmente con la activación de NF κ B. La PKC ζ es capaz de fosforilar I κ B promoviendo su degradación y la translocación al núcleo de NF κ B⁵⁷.

Por otro lado, la PKC ζ es un efector habitual de la ceramida, ya que ésta activa directamente a la enzima al unirse a su dominio C1^{57,58}. En estudios anteriores se ha comprobado que bajas concentraciones de ceramida promueven la supervivencia celular ante la ausencia de factores de crecimiento mediante la activación de PKC ζ , que a su vez activa JNK y NF κ B¹⁷⁴.

El hecho de que PKC ζ proteja de la necrosis y de la apoptosis sugiere una importante función de esta enzima en la mitocondria, ya que es en ésta donde se regulan ambos mecanismos de muerte. Además, los resultados obtenidos indican que PKC ζ está implicada en diversos sucesos que se producen en la mitocondria. Sin embargo, al igual que ocurría con PKC ϵ , no se observa un aumento de esta isoforma en dicho orgánulo, ni durante la isquemia ni en la recuperación en presencia de ceramida respecto a la isquemia/recuperación (Figura 17A). Por tanto, las acciones de PKC ζ no parecen deberse a un aumento de dicha enzima en la mitocondria.

El vaciamiento de calcio de la mitocondria inducido por ceramida (Figura 23) mediante una apertura controlada del mPTP (Figura 22) y la reducción del estrés oxidativo durante la recuperación (Figura 25) son mecanismos que posiblemente conducen a que el mPTP no se abra durante la recuperación. Ambos mecanismo están mediados por PKC ϵ y PKC ζ , lo que explica su protección frente a la necrosis, ya que como se ha indicado, la apertura del mPTP tiene un papel fundamental en este tipo de muerte.

Los resultados obtenidos indican que la ceramida protege de la apoptosis mediada por caspasas, pues impide la activación de la caspasa 3, principal caspasa efectora de la vía intrínseca de apoptosis (Figura 19). Esta protección está parcialmente mediada por PKC ζ , lo que concuerda con la implicación de esta isoforma en la protección frente a la apoptosis¹⁷⁵. Sin embargo, según los resultados obtenidos, la inhibición de PKC ζ no impide por completo la protección ejercida por la ceramida en la activación de caspasas, por lo que tiene que haber más factores que medien esta acción. Es posible que esta protección esté mediada por ERK y/o PI3K y Akt, ya que se ha visto la implicación de estas rutas en la protección frente a apoptosis en otros modelos de muerte¹⁶⁵. Además, los datos obtenidos demuestran que estas rutas están claramente implicadas en la protección frente a la muerte celular inducida por isquemia (Figura 14A)

La ceramida impide la sobrecarga de calcio mitocondrial al inducir la apertura del mPTP a través de ROS

En la mitocondria se decide el destino de la célula durante la isquemia/recuperación. En función de su grado de alteración, la célula morirá por necrosis, por apoptosis o se recuperará. En esta decisión es fundamental el papel de la apertura/cierre del mPTP. La función del mPTP en condiciones normales parece ser impedir una sobrecarga de calcio

en la mitocondria, lo cual se consigue con aperturas controladas y transitorias. Sin embargo, una apertura irreversible del mPTP supone la disipación del gradiente de protones generado en la cadena respiratoria, lo que provoca la despolarización de la membrana mitocondrial y el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa. Esto conduce a un descenso de los niveles de ATP, que no sólo no es sintetizado por la ATP sintasa, sino que incluso puede ser hidrolizado por la misma al funcionar en sentido contrario^{84,152,176}. Al despolarizarse la membrana la mitocondria se hincha por la entrada de agua, lo que en último término da lugar a la ruptura de la membrana externa, liberándose las proteínas proapoptóticas de la mitocondria^{73,87}. Si este proceso se produce en la mayoría de las mitocondrias de la célula, el ATP alcanzará niveles tan bajos que las células no podrán mantener la homeostasis iónica, pero tampoco morir por apoptosis, ya que es un proceso dependiente de ATP, de modo que morirán por necrosis. Una apertura reversible del mPTP, sin embargo, conduciría a la muerte por apoptosis o a la recuperación de la célula en función del grado de afectación de las mitocondrias¹⁷⁷.

Durante la isquemia se produce la depleción del ATP, el aumento del fosfato inorgánico y la sobrecarga de calcio necesarias para que se abra el mPTP en la recuperación, cuando se incrementa el estrés oxidativo y se estabiliza el pH¹⁵². La ceramida promueve la formación de ROS en la mitocondria durante la isquemia, lo que induce una apertura controlada del mPTP durante el proceso isquémico, impidiendo la sobrecarga de calcio mitocondrial (Figuras 22, 23 y 25). Esta apertura es claramente protectora, pues la inhibición de la misma con CsA impide la protección mediada por ceramida (Figura 24). Además, la ceramida impide el incremento brusco de generación de ROS que se produce en la recuperación (Figura 25). La menor concentración de calcio en la mitocondria y el menor nivel de estrés oxidativo durante la recuperación, posiblemente provocan una menor inducción de la apertura del mPTP, tanto en el número de poros implicados como en la duración de la apertura, siendo ésta reversible. Además, probablemente hay un menor número de mitocondrias afectadas. De este modo las células se recuperan y se impide el daño en la recuperación. La apertura reversible y controlada del mPTP durante la isquemia ha sido descrita anteriormente como mecanismo protector¹⁵³.

En este trabajo también se demuestra que la formación de ROS y la consecuente apertura del mPTP inducidas por ceramida, están mediadas por PKC ϵ y PKC ζ (Figuras

22 y 25), lo que confirma el papel de estas enzimas en la protección frente a la necrosis. Sin embargo, la forma de actuar de estas isoformas durante la isquemia es claramente distinta. PKC ζ media la formación de ROS inducida por la ceramida, pero no está implicada en el estrés oxidativo generado por la propia isquemia (Figura 25). Esto indica que la isquemia y la ceramida inducen la generación de ROS por vías independientes, o que PKC ζ se encuentra en la vía de señalización de la ceramida por encima de un mecanismo común de formación de ROS. Por su parte, PKC ϵ está implicada en la formación de las ROS inducidas tanto por la isquemia como por la ceramida, lo que indica que PKC ϵ forma parte de un mecanismo común de formación de ROS por parte de la isquemia y de la ceramida, o bien que actúa sobre las dos vías independientes de generación de ROS. Esto sugiere una relación entre PKC ϵ y la cadena respiratoria u otras fuentes de ROS durante la isquemia, o con los sistemas antioxidantes de la célula (Figura 17A).

Es importante destacar que la pequeña apertura del mPTP que puede producirse por la propia isquemia, no se debe al aumento del estrés oxidativo, ya que cuando se inhibe PKC ϵ y, en consecuencia, la formación de ROS, sigue produciéndose esta ligera apertura del mPTP (Figura 22). Por tanto, esta apertura debe depender de factores distintos de ROS.

El hecho de que durante la isquemia la ceramida promueva el aumento del estrés oxidativo y durante la recuperación impida el brusco incremento de ROS (Figura 25), contribuye probablemente a la no apertura del mPTP durante la recuperación, y por tanto, resulta protector. La sobreproducción de ROS en la recuperación puede resultar letal para la célula, no sólo porque promueve la apertura del mPTP, sino también porque las ROS oxidan y reaccionan con diversas moléculas, provocando la alteración de las membranas biológicas al inducir la peroxidación de los lípidos y la desnaturalización de diversas proteínas⁹⁹. La ceramida inhibe este aumento excesivo de ROS a través de PKC ϵ y PKC ζ , de igual forma que durante la isquemia promueve la formación de ROS también a través de estas isoformas (Figura 25). Por consiguiente, tanto la ceramida como estas dos isoformas de PKC actúan de modo contrario en la isquemia y en la recuperación. Esto indica un mecanismo de actuación y posiblemente una diana diferente en la isquemia y en la recuperación. La fuente de ROS durante la isquemia y la recuperación no se conoce bien, aunque es muy posible que se encuentre en la cadena respiratoria de la mitocondria. Además, hay diversos estudios que parecen indicar que el

origen de ROS en la isquemia y en la recuperación es distinto, lo que concuerda con un mecanismo de actuación diferente por parte de la ceramida ¹¹³. Se ha descrito que PKC ϵ interacciona con el complejo IV de la cadena respiratoria y aumenta su actividad, lo que provoca un incremento del flujo de electrones a través de la cadena que reduce la formación de ROS en los complejos I y III, además de acelerar la síntesis de ATP ^{178,179}. Esto estaría de acuerdo con la translocación de PKC ϵ a la mitocondria durante la recuperación que se muestra en la Figura 17A.

La ceramida protege a largo plazo a través de HIF

Hasta ahora todas las formas de protección descritas en este trabajo para la acción de la ceramida, parecen tener un efecto a corto o medio plazo. Una protección a más largo plazo podría implicar la transcripción de diversos genes. Hay que tener en cuenta que durante la isquemia la subunidad α del factor de transcripción HIF deja de degradarse en el proteasoma, heterodimerizando con la subunidad β y pasando al núcleo como factor de transcripción. Una vez en el núcleo HIF induce la transcripción de diversos genes relacionados con la supervivencia ¹¹⁶⁻¹¹⁸. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que esta activación es aún mayor en presencia de ceramida (Figura 30), lo que indica que además de los mecanismos activados por la ceramida para la protección inmediata de la célula, dicho esfingolípido induce también una protección a largo plazo. Además, como se indica en la Figura 14A, la inducción de HIF por parte de la ceramida está mediada por PI3K, que es una de las vías típicas de activación de HIF ^{180,181}, lo que confirma la implicación de esta enzima en la protección inducida por ceramida.

La activación de HIF por ceramida conduce a la transcripción de diversos genes cuyo efecto protector se mantendrá aunque la ceramida deje de estar presente, lo que explica que la ceramida proteja en preconditionamiento.

5.3 PROTECCIÓN POR LA ESFINGOSINA 1-FOSFATO

Otro de los resultados destacables de este estudio es la demostración de que la S1P protege frente a la muerte inducida por isquemia/recuperación. En este trabajo se demuestra que la S1P protege de la muerte inducida por isquemia a una concentración de 1 μ M (Figura 9B), una concentración 10 veces menor que la activa para la ceramida.

Esta protección está mediada por su unión a receptor como demuestran los resultados en presencia de PTX (Figura 14B). Algunos trabajos anteriores ya mostraban protección de la S1P o de la activación de las esfingosina quinasa frente a la isquemia/recuperación en corazón, incluso en organismos vivos, pero sin profundizar en el mecanismo de acción¹⁸²⁻¹⁸⁴.

La esfingosina 1-fosfato protege en preconditionamiento, durante la isquemia y en la recuperación

Como en el caso de la ceramida, esta protección se produce en todas las fases de la isquemia/recuperación, incluso en el preconditionamiento, aunque la mayor protección se produce cuando la S1P está presente al menos durante la isquemia y la recuperación (Figura 11B). Esto podría permitir, al igual que en el caso de la ceramida, el uso de la S1P como molécula protectora en todos los casos de isquemia/recuperación, ya sea provocada o accidental. La protección que ejerce la S1P cuando es administrada en preconditionamiento, se podría explicar por la activación de HIF (Figura 30), con la consecuente expresión de genes relacionados con la protección. Además, la S1P actúa a través de PKC ϵ y del mitoK_{ATP} (Figura 28). Otros protectores que actúan a través de estas moléculas, como el diazóxido, son también efectivos en pretratamiento y, en este sentido, se ha especulado con un posible bucle de retroalimentación positiva, ya que PKC ϵ activa al mitoK_{ATP} y éste a su vez puede activar la PKC ϵ ¹³⁰.

La esfingosina 1-fosfato protege de la necrosis y de la apoptosis

Asimismo, al igual que ocurría con la ceramida, la S1P protege eficazmente de la apoptosis y de la necrosis (Figura 12), lo que la convierte en un prometedor protector frente a la isquemia, ya que se podría utilizar tanto para el núcleo isquémico, donde las neuronas mueren por necrosis fundamentalmente, como para la zona de penumbra, donde predomina la apoptosis.

La protección producida por la S1P frente a la apoptosis es muy eficaz, hasta el punto de que protege completamente de la apoptosis producida por la isquemia/recuperación, tanto si está presente sólo durante la isquemia, como únicamente en la recuperación (Figura 13B). La S1P actúa a través de receptor (Figura 14B), que se activa y

desencadena la respuesta, manteniéndose los efectos incluso en ausencia de S1P. Ese es el caso de la activación de HIF o de la translocación de PKC ϵ a la mitocondria. Esto explicaría por qué puede proteger sólo en preconditionamiento y por qué la protección frente a la apoptosis es completa, aunque el tratamiento con S1P sea sólo durante la isquemia o durante la recuperación.

La mayor parte de la muerte por apoptosis se produce durante la recuperación, que es cuando se puede formar ATP, aunque los procesos que conducen a esta muerte puedan haberse iniciado en la isquemia ¹⁸⁵. La S1P induce la translocación de PKC ϵ a la mitocondria, tanto durante la isquemia como durante la recuperación, y como ya se ha indicado anteriormente, PKC ϵ inhibe la apertura del mPTP y, por tanto, la liberación de las moléculas proapoptóticas a través de dicho poro ¹⁵⁷. La protección frente a la apoptosis también puede deberse a la inactivación de PKC δ . Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la S1P impide la translocación de esta isoforma a la membrana y al núcleo durante la isquemia, impidiendo, por tanto su activación (Figura 21A). Asimismo, la S1P también impide la translocación de PKC δ a la mitocondria durante la recuperación (Figura 21B). La activación de PKC δ se ha relacionado con la apoptosis inducida por diferentes estímulos, encontrándose entre sus dianas algunas proteínas estructurales, proteínas implicadas en la reparación del DNA y factores de transcripción como p53 o STAT1 ¹⁶⁰.

Adicionalmente, la ausencia de actividad de caspasa 3 cuando se administra S1P durante la isquemia/recuperación refleja la protección frente a la apoptosis. (Figura 19B).

La protección de la esfingosina 1-fosfato está mediada por receptor

La mayoría de las acciones de la S1P parecen estar mediadas por su unión a receptor ^{186,187}. Los resultados obtenidos en presencia de PTX indican que la protección frente a la isquemia/recuperación tiene lugar a través de la interacción de S1P con su receptor (Figura 14B).

La protección de la esfingosina 1-fosfato está mediada por PKC

Experimentos realizados con distintos inhibidores específicos han puesto de manifiesto que la unión de la S1P a su receptor activa distintas quinasas, como la familia de PKC, ERK y PI3K, mediadoras del efecto protector de la S1P (Figura 14B), lo cual no descarta que varias de estas enzimas no se encuentren en una misma ruta de señalización, como comúnmente sucede ¹⁶⁵. Dada la importancia de las PKCs en la isquemia/recuperación, los estudios posteriores se centraron en analizar el papel de las mismas. Al igual que sucedía con la ceramida, nuestros resultados indican que tanto PKC ϵ como PKC ζ están implicadas en la protección inducida por S1P (Figura 15B). Ambas isoformas median la protección frente a la apoptosis y a la necrosis, aunque en el caso de la apoptosis, la PKC ϵ protege sólo parcialmente (Figura 16B).

El papel de PKC ϵ en la protección frente a la isquemia/recuperación ha sido previamente descrito. Como se ha indicado anteriormente, PKC ϵ está implicada en el mecanismo protector del preconditionamiento, del postcondicionamiento y de varios fármacos ¹⁶⁷⁻¹⁶⁹. Su diana molecular parece encontrarse dentro de la mitocondria ¹⁶⁷. Los resultados aportados indican que el tratamiento con S1P induce la translocación de PKC ϵ a la mitocondria, al igual que la isquemia y la isquemia/recuperación. Cuando el tratamiento con S1P es durante la isquemia y/o la recuperación, los efectos parecen sumarse, siendo mayor la proporción de enzima en la mitocondria (Figura 18A). Estos hechos apuntan a una función importante de dicha PKC en las mitocondrias. Además, los resultados demuestran que PKC ϵ está implicada en las acciones que ejerce la S1P sobre este orgánulo, como es la regulación del potencial de membrana mitocondrial o su concentración de calcio (Figuras 26 y 27). En las mitocondrias PKC ϵ se ha relacionado fundamentalmente con la apertura del mitoK_{ATP}, y la consecuente inhibición del mPTP ^{170,172,188}, lo que explica su papel protector frente a la necrosis. Los resultados obtenidos demuestran que el descenso en la concentración de calcio mitocondrial está mediado por este canal de potasio (Figura 28), cuya inhibición con 5HD da lugar a una respuesta en la concentración de calcio similar a la que se obtiene al inhibir PKC ϵ , lo que sugiere que podrían encontrarse en la misma vía. Adicionalmente, PKC ϵ se ha asociado al canal mitocondrial dependiente de voltaje VDAC y al complejo IV de la cadena respiratoria, lo que podría explicar su efecto en el potencial de membrana ^{173,179}.

PKC ϵ media parcialmente la protección frente a la apoptosis, lo que concuerda con los resultados obtenidos para caspasas, donde se aprecia una mayor actividad caspasa 3 en presencia del inhibidor (Figura 19B). Esta protección podría deberse a la inhibición de la apertura del mPTP, impidiendo la liberación del citocromo c y, por tanto, la activación del apoptosoma y de la caspasa 3. En este sentido, PKC ϵ se ha relacionado anteriormente con la inhibición de la apoptosis, y entre los efectos descritos se encuentran la inhibición de la liberación del citocromo c y de la consecuente activación de las caspasas^{189,190}.

Por su parte, PKC ζ también está implicada en la protección inducida por S1P (Figura 15B). Hay que tener en cuenta que PKC ζ es un mediador habitual en la supervivencia celular^{51,55,174}, pero hasta ahora nunca se había relacionado con la protección frente a la isquemia/recuperación. La regulación de la apoptosis y necrosis observada en estos resultados por parte de esta isoforma parece indicar una acción sobre la mitocondria, pero al igual que sucedía con la ceramida, y a diferencia de lo que ocurre con PKC ϵ , la S1P no transloca PKC ζ a la mitocondria, ni durante la isquemia ni durante la recuperación (Figura 18A). En este sentido los resultados obtenidos muestran que ni el efecto de la S1P en el potencial de membrana mitocondrial, ni el efecto en la concentración de calcio (Figura 26 y 27), están mediados por PKC ζ , por lo que no parece que la PKC ζ de la mitocondria esté implicada en la protección inducida por la S1P.

Los datos aportados indican que PKC ζ está implicada en la protección frente a la apoptosis. Como se ha indicado anteriormente, PKC ζ puede impedir la inhibición por parte de Bad de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-XL, las cuales inhiben en última instancia la activación de las caspasas y otras vías apoptóticas¹⁷⁵, lo que concuerda con los resultados obtenidos para caspasas, donde se aprecia una mayor actividad caspasa 3 en presencia del inhibidor (Figura 19B). Por otro lado, PKC ζ puede activar NF κ B, que induce la transcripción de diversos genes relacionados con la protección frente a la apoptosis y a la necrosis⁵⁷.

La esfingosina 1-fosfato protege a nivel de la mitocondria e impide su despolarización

En la mitocondria se producen los principales y más determinantes cambios durante la isquemia/recuperación, que conducen a la muerte de la célula o a su recuperación¹⁹¹. Durante la isquemia, debido a la ausencia de O₂, la cadena de transporte electrónico deja de funcionar y se produce un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa. Esto provoca que dejen de bombearse protones al espacio intermembrana, principal causa del potencial mitocondrial, así como un descenso en la concentración de ATP al inhibirse su síntesis, de forma que no se pueden mantener los gradientes iónicos ni de la mitocondria ni de la membrana plasmática^{72,73}. Debido al desequilibrio iónico se produce un aumento de la concentración de calcio en el citosol que conlleva una sobrecarga de calcio en la mitocondria al entrar este ión a través del uniporter de calcio mitocondrial^{76,77}. El resultado de todos estos efectos es una despolarización de la mitocondria, que si es muy alta y mantenida en el tiempo, conduce a una alteración irreversible y a la muerte de la célula, fundamentalmente por necrosis, pues ni hay ATP ni posibilidad de sintetizarlo^{71,177}. Teniendo todo esto en cuenta, un mantenimiento del potencial de membrana mitocondrial se podría relacionar con un efecto protector, pues impediría el daño irreversible de las mitocondrias, de modo que en la recuperación podrían reiniciar sus funciones¹⁹².

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la S1P impide parcialmente la despolarización de membrana producida por la isquemia (Figura 26). Este efecto está mediado por PKC ϵ , pero no por PKC ζ , lo que concuerda con la protección que ejerce PKC ϵ frente a la necrosis.

Un posible mecanismo para explicar esta protección del potencial puede ser que la S1P dé lugar a la translocación de PKC ϵ a la mitocondria, la cual puede unirse al complejo IV de la cadena electrónica e incrementar su actividad¹⁷⁹. Esto activaría el flujo de electrones a través de la cadena respiratoria, manteniéndose un cierto bombeo de protones al espacio intermembrana y, por tanto, el potencial de membrana. Además, PKC ϵ puede activar el mitoK_{ATP}, cuya apertura se ha relacionado con la estabilización del potencial de membrana mitocondrial^{193,194}.

La esfingosina 1-fosfato moviliza el calcio mitocondrial durante la isquemia y reduce el disparo de ROS en la recuperación

Como ya se ha indicado anteriormente, durante la isquemia, debido al desequilibrio iónico por el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa y el consecuente descenso en los niveles de ATP, se produce un aumento de la concentración de calcio en el citosol. El uniporter de calcio de la membrana mitocondrial, para ser funcional, necesita una concentración de calcio superior a la citosólica en condiciones normales⁷³. Al producirse un aumento del calcio en el citosol, el calcio entra en la mitocondria a favor de gradiente, lo que conduce a una sobrecarga de calcio mitocondrial, que junto con el brusco incremento de ROS y otros factores provoca la apertura del mPTP en la recuperación. El principal mecanismo de protección consiste en impedir la apertura del mPTP en la recuperación, lo cual se puede conseguir fundamentalmente impidiendo la sobrecarga de calcio o el disparo de ROS^{84,152}. Los resultados obtenidos indican que la S1P tiene ambos efectos (Figura 27 y Figura 25). En relación al calcio, la S1P no sólo impide el aumento en la concentración de calcio sino que provoca un descenso de la misma (Figura 27). Los datos obtenidos indican que el efecto de la S1P está mediado en parte por PKC ϵ y por el mitoK_{ATP}, pues es inhibido con V1-2 y con 5HD. Además, PKC ϵ y el mitoK_{ATP} parecen estar implicados en la misma ruta, ya que su comportamiento es similar. Varios trabajos parecen indicar que PKC ϵ y el mitoK_{ATP} están asociados en la protección frente a la isquemia/recuperación, y aunque se desconoce el mecanismo de protección, se ha propuesto que puede ser debido a un descenso de la concentración de calcio mitocondrial, el cual impide la apertura del mPTP en la recuperación¹⁹⁴⁻¹⁹⁶. Así, se cree que PKC ϵ activa la apertura del mitoK_{ATP}, el cual favorece la entrada de potasio a la mitocondria, que al ser un catión disminuye el gradiente eléctrico del calcio dificultando su entrada^{154,170,197}. Esto concuerda con los resultados obtenidos, pues la S1P induce la translocación de PKC ϵ a la mitocondria (Figura 18A). La implicación del mitoK_{ATP} en la protección inducida por S1P se confirmó midiendo la viabilidad celular (Figura 28).

Anteriormente se ha descrito la liberación de calcio del retículo endoplásmico y de los núcleos por parte de la S1P¹⁹⁸⁻²⁰⁰, aunque hasta ahora nunca se había observado este efecto en las mitocondrias (Figura 27). Es posible que la S1P actúe sobre el uniporter e impida la entrada de calcio, pero el descenso en la concentración parece indicar que la

S1P favorece la extrusión del calcio. La salida de calcio de la mitocondria está mediada por el transportador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y por un mecanismo independiente de sodio que parece ser un transportador $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ ^{78,79}. Los resultados muestran que la S1P mantiene en parte el potencial de membrana de la mitocondria (Figura 26), de lo que se deduce que el gradiente de protones sigue existiendo, por lo que el transportador $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ podría seguir funcionando, expulsando calcio al citosol.

Por otro lado, la S1P impide parcialmente el incremento de ROS inducido durante la recuperación (Figura 25). Este efecto, puede contribuir junto con el descenso de la concentración de calcio, a la inhibición de la apertura del mPTP durante la recuperación.

La esfingosina 1-fosfato mantiene la integridad de las mitocondrias durante la isquemia/recuperación

De todos estos datos se deduce que la S1P protege a las mitocondrias de los cambios propios de la isquemia/recuperación, como son el descenso del potencial, la sobrecarga de calcio y el brusco incremento de ROS en la recuperación, y por tanto, la apertura del mPTP durante esta fase. Esto se traduce en un cierto mantenimiento de la función mitocondrial, que permite que los niveles de ATP no descieran a la misma tasa que durante la isquemia, manteniéndose una cierta homeostasis iónica, de modo que en la recuperación no se abre el mPTP. Esto se confirma al analizar la resistencia a la apertura del mPTP durante la recuperación en mitocondrias de células tratadas con S1P y sometidas a isquemia (Figura 29). Mientras que las mitocondrias de células isquémicas presentan una mayor sensibilidad a la apertura del mPTP, probablemente debido a su mayor carga de calcio, las mitocondrias procedentes de células tratadas con S1P son más resistentes a esta apertura inducida por la misma concentración de calcio, probablemente porque su concentración de calcio y de ROS es mucho menor, y sus transportadores aún funcionan.

La esfingosina 1-fosfato protege a largo plazo a través de HIF

El efecto de la S1P sobre la mitocondria parece ser inmediato. Sin embargo, la S1P también ejerce una protección a largo plazo al inhibir la degradación de HIF-1 α . Este

efecto está mediado por la unión de S1P a y a través de PI3K (Figura 30), lo que confirma la implicación de esta ruta en la protección inducida por S1P (Figura 14A). HIF-1 α heterodimeriza con la subunidad β y pasa al núcleo donde induce la transcripción de diversos genes relacionados con la supervivencia. La activación PI3K en la formación de HIF ha sido previamente descrita^{180,181}.

Al igual que en el caso de la ceramida, la activación de HIF conduce a la transcripción de diversos genes cuyo efecto protector se mantendrá aunque la S1P deje de estar presente, lo que explica que proteja en preconditionamiento.

5.4 COMPARACIÓN ESFINGOSINA 1-FOSFATO Y CERAMIDA

La ceramida y la S1P tradicionalmente han tenido funciones opuestas²⁰¹. Sin embargo, en este trabajo se demuestra que ambos esfingolípidos protegen de la isquemia/recuperación, aunque a través de mecanismos distintos.

Ambos esfingolípidos protegen en las distintas fases de la isquemia/recuperación, aunque su protección es mayor si están presentes al menos durante la isquemia/recuperación, ambos protegen de la apoptosis y de la necrosis y actúan a través de PKC ϵ y PKC ζ y su principal mecanismo de protección es un descenso de la concentración del calcio mitocondrial durante la isquemia, hecho que probablemente impide la apertura del mPTP en la recuperación. Sin embargo, mientras que la ceramida produce este efecto provocando la apertura del mPTP durante la isquemia a través de un aumento de la formación de ROS, la S1P favorece la salida de calcio de la mitocondria de forma independiente al mPTP por un mecanismo que incluye la activación del mitoK_{ATP}.

Aunque el mecanismo de acción de ambos esfingolípidos es claramente distinto, se podría pensar que las acciones de la ceramida, tradicionalmente considerada como inductor de muerte celular, se deben a su conversión en S1P. Sin embargo, la C2-ceramida, forma utilizada en este trabajo no es reconocida por las ceramidasa, por lo que no puede ser utilizada para formar esfingosina, y por tanto tampoco S1P. Sin embargo, no se puede descartar que la ceramida se transforme en otros esfingolípidos como ceramida-1-fosfato o esfingolípidos más complejos. Esto podría averiguarse utilizando inhibidores de las distintas rutas de biosíntesis de los esfingolípidos. Es importante tener en cuenta que el mecanismo de acción de la ceramida es bastante

agresivo, de modo que su efecto protector se produce cuando se administra a una concentración tan baja que no produce muerte celular. Es probable que la ceramida provoque la muerte a mayor concentración porque da lugar a una apertura del mPTP demasiado alta e irreversible.

En este trabajo de investigación hay que destacar la importancia que tiene conocer los mecanismos de acción de nuevas moléculas protectoras. En este sentido, los prometedores resultados obtenidos para la ceramida y la S1P indican que estos esfingolípidos presentan características que podrían ser potencialmente ventajosas para su aplicación en clínica.

6. CONCLUSIONES

1. La ceramida y la esfingosina 1-fosfato, a concentraciones bajas, protegen completamente de la muerte celular inducida por 3 h de isquemia y 16 h de recuperación, tanto de la apoptosis como de la necrosis. La acción protectora de la esfingosina 1-fosfato está mediado por receptor.
2. El efecto protector ejercido por la ceramida y la esfingosina 1-fosfato está mediado por diferentes rutas de señalización, que implican diferentes proteínas quinasas. Entre ellas destacaremos la proteína quinasa C (PKC). La protección de la apoptosis ejercida por la ceramida está mediada por PKC ζ y de la necrosis por PKC ϵ . En cuanto a la esfingosina 1-fosfato ambos tipos de muerte están mediados por las dos isoformas: PKC ϵ y PKC ζ .
3. El mecanismo protector de la ceramida implica un incremento moderado de ROS durante la isquemia, el cual provoca una apertura controlada del poro de transición mitocondrial. Esta apertura permite la liberación del calcio acumulado en la mitocondria durante la isquemia. Por otro lado, la ceramida impide la formación de ROS durante la recuperación. Este hecho, junto con el descenso de calcio mitocondrial, impiden la apertura del poro de transición mitocondrial durante la recuperación.
4. La esfingosina 1-fosfato ejerce su protección por un mecanismo diferente a la ceramida. Dicho esfingolípido protege manteniendo la integridad de la mitocondria. Así, impide la despolarización de la membrana mitocondrial e impide la acumulación de calcio en la mitocondria por un mecanismo que implica al canal de potasio mitocondrial dependiente de ATP.
5. El tratamiento con ceramida y esfingosina 1-fosfato durante la isquemia da lugar a un incremento en los niveles del factor de transcripción HIF (factor inducible por hipoxia).

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Bartke N, Hannun YA: **Bioactive sphingolipids: metabolism and function.** *Journal of Lipid Research* 2009, **50**(Supplement):91-96.
2. Simons K, Ikonen E: **Functional rafts in cell membranes.** *Nature* 1997, **387**(6633):569-572.
3. Merrill AH: **De novo sphingolipid biosynthesis: A necessary, but dangerous, pathway.** *The Journal of Biological Chemistry* 2002, **277**(29):25843-25846.
4. Futerman AH, Hannun YA: **The complex life of simple sphingolipids.** *EMBO Reports* 2004, **5**(8):777-782.
5. Hannun YA, Obeid LM: **The ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind.** *The Journal of Biological Chemistry* 2002, **277**(29):25847-25850.
6. Linn SC: **Regulation of de novo sphingolipid biosynthesis and the toxic consequences of its disruption.** *Biochemical Society Transactions* 2001, **29**:831-835.
7. Pewzner-Jung Y, Ben-Dor S, Futerman AH: **When do Lasses (longevity assurance genes) become CerS (ceramide synthases)?: insights into the regulation of ceramide synthesis.** *The Journal of Biological Chemistry* 2006, **281**:25001-25005.
8. Causeret C, Geeraert L, Van der Hoeven G, Mannaerts GP, van Veldhoven PP: **Further characterization of rat dihydroceramide desaturase: tissue distribution, subcellular localization, and substrate specificity.** *Lipids* 2000, **35**:1117-1125.
9. Marchesini N, Hannun YA: **Acid and neutral sphingomyelinases: roles and mechanisms of regulation.** *Biochemistry and Cell Biology* 2004, **82**(2):27-44.
10. Shimeno H, Soeda S, Sakamoto M, Kouchi T, Kowakame T, Kihara T: **Partial purification and characterization of sphingosine N-acyltransferase (ceramide synthase) from bovine liver mitochondrion-rich fraction.** *Lipids* 1998, **33**(6):601-605.
11. El Bawab S, Roddy P, Qian T, Bielawska A, Lemasters JJ, Hannun YA: **Molecular cloning and characterization of a human mitochondrial ceramidase.** *The Journal of Biological Chemistry* 2000, **275**(28):21508-21513.

12. Yabu T, Shimuzu A, Yamashita M: **A novel mitochondrial sphingomyelinase in zebrafish cells.** *The Journal of Biological Chemistry* 2009, **284**(30):20349-20363.
13. Hannun YA, Obeid LM: **Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2008, **9**(2):139-150.
14. Wijesinghe DS: **Substrate specificity of human ceramide kinase.** *Journal of Lipid Research* 2005, **46**:2706-2716.
15. Raas-Rothschild A, Pankova-Kholmyansky I, Kacher Y, Futerman AH: **Glycosphingolipidoses: beyond the enzymatic defect.** *Glycoconjugate Journal* 2004, **21**:295-304.
16. Tafesse FG, Ternes P, Holthuis JC: **The multigenic sphingomyelin synthase family.** *The Journal of Biological Chemistry* 2006, **281**:29421-29425.
17. Johnson KR: **Role of human sphingosine-1-phosphate phosphatase 1 in the regulation of intra- and extracellular sphingosine-1-phosphate levels and cell viability.** *The Journal of Biological Chemistry* 2003, **278**:34541-34547.
18. Brindley DN: **Lipid phosphate phosphatases and related proteins: signaling functions in development, cell division, and cancer.** *Journal of Cellular Biochemistry* 2004, **92**:900-912.
19. Sigal YJ, McDermott MI, Morris AJ: **Integral membrane lipid phosphatases/phosphotransferases: common structure and diverse functions.** *Biochemical Journal* 2005, **387**:281-293.
20. Bandhuvula P, Saba JD: **Sphingosine-1-phosphate lyase in immunity and cancer: silencing the siren.** *Trends in Molecular Medicine* 2007, **13**:210-217.
21. Pettus BJ: **The sphingosine kinase 1/sphingosine-1-phosphate pathway mediates COX-2 induction and PGE2 production in response to TNF-alpha.** *The FASEB Journal* 2003, **17**:1411-1421.
22. Liu J, Ginis I, Spatz M, Hallenbeck JM: **Hypoxic preconditioning protects cultured neurons against hypoxic stress via TNF-alpha and ceramide.** *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 2000, **278**(1):144-153.
23. Kitatani K, Idkowiak-Baldys J, Hannun YA: **The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling.** *Cellular Signalling* 2008, **20**(6):1010-1018.

24. Kolesnick RN, Goñi F, M. , Alonso A: **Compartmentalization of ceramide signaling: physical foundations and biological effects.** *Journal of Cellular Physiology* 2000, **184**(3):285-300.
25. Kihara A, Mitsutake S, Mizutani Y, Igarashi Y: **Metabolism and biological functions of two phosphorylated sphingolipids, sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate.** *Progress in Lipid Research* 2007, **46**(2):126-144.
26. Okazaki T, Bell RM, Hannun YA: **Sphingomyelin turnover induced by vitamin D3 in HL-60 cells. Role in cell differentiation.** *The Journal of Biological Chemistry* 1989, **264**(32):19076-19080.
27. Venable ME, Lee JY, Smyth MJ, Bielawska A, Obeid LM: **Role of ceramide in cellular senescence.** *The Journal of Biological Chemistry* 1995, **270**:30701-30708.
28. Hetz CA, Hunn M, Rojas P, Torres V, Leyton L, Quest AFG: **Caspase-dependent initiation of apoptosis and necrosis by the Fas receptor in lymphoid cells: onset of necrosis is associated with delayed ceramide increase.** *Journal of Cell Science* 2002, **115**(23):4671-4683.
29. Adam D, Heinrich M, Kabelitz D, Schütze S: **Ceramide: does it matter for T cells?** *Trends in Immunology* 2002, **23**(1):1-4.
30. Obeid LM, Linardic CM, Karolak LA, Hannun YA: **Programmed cell death induced by ceramide.** *Science* 1993, **259**:1769-1771.
31. Wang G: **Direct binding to ceramide activates protein kinase C zeta before the formation of a pro-apoptotic complex with PAR-4 in differentiating stem cells.** *The Journal of Biological Chemistry* 2005, **280**:26415-26424.
32. Chalfant CE, Szulc Z, Roddy P, Bielawska A, Hannun YA: **The structural requirements for ceramide activation of serine-threonine protein phosphatases.** *Journal of Lipid Research* 2004, **45**:496-506.
33. Chalfant CE, Kishikawa K, Mumby MC, Kamibayashi C, Bielawska A, Hannun YA: **Long chain ceramides activate protein phosphatase-1 and protein phosphatase-2A.** *The Journal of Biological Chemistry* 1999, **274**(29):20313-20317.
34. Ruvolo PP: **Intracellular signal transduction pathways activated by ceramide and its metabolites.** *Pharmacological Research* 2003, **47**(5):383-392.

35. Smyth MJ, Obeid LM, Hannunf YA, Scott HK: **Ceramide: A novel lipid mediator of apoptosis**. *Advances in Pharmacology* 1997, **41**:133-154.
36. Huwiler A, Xin C, Brust A-K, Briner VA, Pfeilschifter J: **Differential binding of ceramide to MEKK1 in glomerular endothelial and mesangial cells**. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 2004, **1636**(2-3):159-168.
37. Basu S, Kolesnick R: **Stress signals for apoptosis: ceramide and c-Jun kinase**. *Oncogene* 1998, **17**(25):3277-3285.
38. Hait NC, Oskeritzian CA, Paugh SW, Milstien S, Spiegel S: **Sphingosine kinases, sphingosine 1-phosphate, apoptosis and diseases**. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 2006, **1758**(12):2016-2026.
39. An S, Bleu T, Huang W, Hallmark OG, Coughlin SR, Goetzl EJ: **Identification of cDNAs encoding two G protein-coupled receptors for lysosphingolipids**. *FEBS Letters* 1997, **417**(3):279-282.
40. Yamazaki Y, Kon J, Sato K, Tomura H, Sato M, Yoneya T, Okazaki H, Okajima F, Ohta H: **Edg-6 as a putative sphingosine 1-phosphate receptor coupling to Ca²⁺ signaling pathway**. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2000, **268**(2):583-589.
41. Van Brocklyn JR, Graler MH, Bernhardt G, Hobson JP, Lipp M, Spiegel S: **Sphingosine-1-phosphate is a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-6**. *Blood* 2000, **95**(8):2624-2629.
42. Im D-S, Heise CE, Ancellin N, O'Dowd BF, Shei G-j, Heavens RP, Rigby MR, Hla T, Mandala S, McAllister G *et al*: **Characterization of a novel sphingosine 1-phosphate receptor, Edg-8**. *The Journal of Biological Chemistry* 2000, **275**(19):14281-14286.
43. Lee MJ: **Sphingosine-1-phosphate as a ligand for the G protein coupled receptor EDG-1**. *Science* 1998, **279**:1552-1555.
44. Gräler MH, Bernhardt G, Lipp M: **EDG6, a novel G-protein-coupled receptor related to receptors for bioactive lysophospholipids, is specifically expressed in lymphoid tissue**. *Genomics* 1998, **53**(2):164-169.

45. Glickman M, Malek RL, Kwitek-Black AE, Jacob HJ, Lee NH: **Molecular cloning, tissue-specific expression, and chromosomal localization of a novel nerve growth factor-regulated G-protein-coupled receptor, nrg-1.** *Molecular and Cellular Neuroscience* 1999, **14**(2):141-152.
46. Ishii I, Friedman B, Ye X, Kawamura S, McGiffert C, Contos JJA, Kingsbury MA, Zhang G, Brown JH, Chun J: **Selective loss of sphingosine 1-phosphate signaling with no obvious phenotypic abnormality in mice lacking its G protein-coupled receptor, LPB3/EDG-3.** *The Journal of Biological Chemistry* 2001, **276**(36):33697-33704.
47. Kluk MJ, Hla T: **Signaling of sphingosine-1-phosphate via the S1P/EDG-family of G-protein-coupled receptors.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 2002, **1582**(1-3):72-80.
48. Okamoto H, Takuwa N, Yokomizo T, Sugimoto N, Sakurada S, Shigematsu H, Takuwa Y: **Inhibitory regulation of Rac activation, membrane ruffling, and cell migration by the G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptor EDG5 but not EDG1 or EDG3.** *Molecular and Cellular Biology* 2000, **20**(24):9247-9261.
49. Taha TA, Argraves KM, Obeid LM: **Sphingosine-1-phosphate receptors: receptor specificity versus functional redundancy.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 2004, **1682**:48-55.
50. Lee MJ: **Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate.** *Cell* 1999, **99**:301-312.
51. Dempsey EC, Newton AC, Mochly-Rosen D, Fields AP, Reyland ME, Insel PA, Messing RO: **Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses.** *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 2000, **279**(3):429-438.
52. Schauble S, King CC, Darshi M, Koller A, Shah K, Taylor SS: **Identification of ChChd3 as a novel substrate of the cAMP-dependent protein kinase (PKA) using an analog-sensitive catalytic subunit.** *The Journal of Biological Chemistry* 2007, **282**(20):14952-14959.
53. Newton AC: **Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm.** *Biochemical Journal* 2003, **370**(2):361-371.

54. Barnett ME, Madgwick DK, Takemoto DJ: **Protein kinase C as a stress sensor**. *Cellular Signalling* 2007, **19**(9):1820-1829.
55. Steinberg SF: **Structural basis of protein kinase C isoform function**. *Physiological Reviews* 2008, **88**(4):1341-1378.
56. Parekh DB, Ziegler W, Parker PJ: **Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation**. *EMBO Journal* 2000, **19**(4):496-503.
57. Moscat J, Rennert P, Diaz-Meco MT: **PKC zeta at the crossroad of NF-kappaB and Jak1//Stat6 signaling pathways**. *Cell Death and Differentiation* 2005, **13**(5):702-711.
58. Moscat J, Diaz-Meco MT, Albert A, Campuzano S: **Cell signaling and function organized by PB1 domain interactions**. *Molecular Cell* 2006, **23**(5):631-640.
59. Sonnenburg ED, Gao T, Newton AC: **The phosphoinositide-dependent kinase, PDK-1, phosphorylates conventional protein kinase C isozymes by a mechanism that is independent of phosphoinositide 3-kinase**. *Journal of Biological Chemistry* 2001, **276**(48):45289-45297.
60. Edwards AS, Faux MC, Scott JD, Newton AC: **Carboxyl-terminal phosphorylation regulates the function and subcellular localization of protein kinase C β II**. *The Journal of Biological Chemistry* 1999, **274**(10):6461-6468.
61. Nguyen TA, Takemoto LJ, Takemoto DJ: **Inhibition of gap junction activity through the release of the C1B domain of protein kinase C γ (PKC γ) from 14-3-3**. *The Journal of Biological Chemistry* 2004, **279**(50):52714-52725.
62. Schultz A, Ling M, Larsson C: **Identification of an amino acid residue in the protein kinase C C1b domain crucial for its localization to the Golgi network**. *The Journal of Biological Chemistry* 2004, **279**(30):31750-31760.
63. Zeidman R, Troller U, Raghunath A, Pahlman S, Larsson C: **Protein kinase C epsilon actin-binding site is important for neurite outgrowth during neuronal differentiation**. *Molecular Biology of the Cell* 2002, **13**(1):12-24.

64. Li L, Lorenzo PS, Bogi K, Blumberg PM, Yuspa SH: **Protein kinase C delta targets mitochondria, alters mitochondrial membrane potential, and induces apoptosis in normal and neoplastic keratinocytes when overexpressed by an adenoviral vector.** *Molecular and Cellular Biology* 1999, **19**(12):8547-8558.
65. Eitel K, Staiger H, Rieger J, Mischak H, Brandhorst H, Brendel MD, Bretzel RG, Haring H-U, Kellerer M: **Protein kinase C delta activation and translocation to the nucleus are required for fatty acid-induced apoptosis of insulin-secreting cells.** *Diabetes* 2003, **52**(4):991-997.
66. Inagaki K, Mochly-Rosen D: **δ PKC-mediated activation of ϵ PKC in ethanol-induced cardiac protection from ischemia.** *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2005, **39**(2):203-211.
67. Cross TG, Scheel-Toellner D, Henriquez NV, Deacon E, Salmon M, Lord JM: **Serine threonine protein kinases and apoptosis.** *Experimental Cell Research* 2000, **256**:34-41.
68. Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP: **Mechanisms of ischemic brain damage.** *Neuropharmacology* 2008, **55**(3):310-318.
69. Lipton P: **Ischemic cell death in brain neurons.** *Physiological Reviews* 1999, **79**(4):1431-1568.
70. Touzani O, Roussel S, MacKenzie ET: **The ischaemic penumbra.** *Current Opinion in Neurology* 2001, **14**(1):83-88.
71. Krnjevic K: **Electrophysiology of cerebral ischemia.** *Neuropharmacology* 2008, **55**(3):319-333.
72. Vessey DA, Li L, Kelley M, Zhang J, Karliner JS: **Sphingosine can pre- and post-condition heart and utilizes a different mechanism from sphingosine 1-phosphate.** *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 2008, **22**(2):113-118.
73. Halestrap AP, Pasdois P: **The role of the mitochondrial permeability transition pore in heart disease.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 2009, **1787**(11):1402-1415.
74. Olney JW: **Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate.** *Science* 1969, **164**(3880):719-721.

75. Sattler R, Tymianski M: **Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity.** *Journal of Molecular Medicine* 2000, **78**(1):3-13.
76. Rizzuto R, Pozzan T: **Microdomains of intracellular Ca²⁺: molecular determinants and functional consequences.** *Physiological Reviews* 2006, **86**(1):369-408.
77. Putney Jr JW, Thomas AP: **Calcium signaling: double duty for calcium at the mitochondrial uniporter.** *Current Biology* 2006, **16**(18):812-815.
78. Walsh C, Barrow S, Voronina S, Chvanov M, Petersen OH, Tepikin A: **Modulation of calcium signalling by mitochondria.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 2009, **1787**(11):1374-1382.
79. Gunter TE, Buntinas L, Sparagna G, Eliseev R, Gunter K: **Mitochondrial calcium transport: mechanisms and functions.** *Cell Calcium* 2000, **28**(5-6):285-296.
80. Woodfield K, Rück A, Brdiczka D, Halestrap AP: **Direct demonstration of a specific interaction between cyclophilin-D and the adenine nucleotide translocase confirms their role in the mitochondrial permeability transition.** *Biochemical Journal* 1998, **336**(2):287-290.
81. Halestrap AP: **Calcium-dependent opening of a non-specific pore in the mitochondrial inner membrane is inhibited at pH values below 7. Implications for the protective effect of low pH against chemical and hypoxic cell damage.** *Biochemical Journal* 1991, **278**:715-719.
82. Petronilli V, Nicolli A, Costantini P, Colonna R, Bernardi P: **Regulation of the permeability transition pore, a voltage-dependent mitochondrial channel inhibited by cyclosporin A.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1994, **1187**(2):255-259.
83. Halestrap AP: **What is the mitochondrial permeability transition pore?** *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2009, **46**(6):821-831.
84. Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA: **Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion-a target for cardioprotection.** *Cardiovascular Research* 2004, **61**(3):372-385.
85. Martinou J-C, Green DR: **Breaking the mitochondrial barrier.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2001, **2**(1):63-67.

86. Crompton M, Barksby E, Johnson N, Capano M: **Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their involvement in cell death.** *Biochimie* 2002, **84**(2-3):143-152.
87. Green DR, Kroemer G: **The pathophysiology of mitochondrial cell death.** *Science* 2004, **305**(5684):626-629.
88. Juhaszova M, Wang S, Zorov DB, Nuss HB, Gleichmann M, Mattson MP, Sollott SJ: **The identity and regulation of the mitochondrial permeability transition pore.** *Annals of the New York Academy of Sciences* 2008, **1123**(Control and Regulation of Transport Phenomena in the Cardiac System):197-212.
89. Kokoszka JE, Waymire KG, Levy SE, Sligh JE, Cai J, Jones DP, MacGregor GR, Wallace DC: **The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore.** *Nature* 2004, **427**(6973):461-465.
90. Krauskopf A, Eriksson O, Craigen WJ, Forte MA, Bernardi P: **Properties of the permeability transition in VDAC1-/- mitochondria.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 2006, **1757**(5-6):590-595.
91. Jonas EA: **Molecular participants in mitochondrial cell death channel formation during neuronal ischemia.** *Experimental Neurology* 2009, **218**(2):203-212.
92. He L, Lemasters JJ: **Regulated and unregulated mitochondrial permeability transition pores: a new paradigm of pore structure and function?** *FEBS Letters* 2002, **512**(1-3):1-7.
93. Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE: **Mitochondrial permeability transition and oxidative stress.** *FEBS Letters* 2001, **495**(1-2):12-15.
94. Finkel T: **Oxygen radicals and signaling.** *Current Opinion in Cell Biology* 1998, **10**(2):248-253.
95. Suzuki YJ, Forman HJ, Sevanian A: **Oxidants as stimulators of signal transduction.** *Free Radical Biology and Medicine* 1997, **22**(1-2):269-285.
96. Yeh L-H, Park YJ, Hansalia RJ, Ahmed IS, Deshpande SS, Goldschmidt-Clermont PJ, Irani K, Alevriadou BR: **Shear-induced tyrosine phosphorylation in endothelial cells requires Rac1-dependent production of ROS.** *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 1999, **276**(4):838-847.

97. Sun Y, Oberley LW: **Redox regulation of transcriptional activators.** *Free Radical Biology and Medicine* 1996, **21**(3):335-348.
98. Monteiro HP, Stern A: **Redox modulation of tyrosine phosphorylation-dependent signal transduction pathways.** *Free Radical Biology and Medicine* 1996, **21**(3):323-333.
99. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J: **Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.** *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2007, **39**(1):44-84.
100. Thannickal VJ, Fanburg BL: **Reactive oxygen species in cell signaling.** *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 2000, **279**(6):1005-1028.
101. Rhee SG, Chang T-S, Bae YS, Lee S-R, Kang SW: **Cellular regulation by hydrogen peroxide.** *Journal of the American Society of Nephrology* 2003, **14**:211-215.
102. Stowe DF, Camara AKS: **Mitochondrial reactive oxygen species production in excitable cells: modulators of mitochondrial and cell function.** *Antioxidants & Redox Signaling* 2009, **11**(6):1373-1414.
103. Poyton RO, Ball KA, Castello PR: **Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling.** *Trends in Endocrinology & Metabolism* 2009, **20**(7):332-340.
104. Guzy RD, Schumacker PT: **Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia.** *Experimental Physiology* 2006, **91**(5):807-819.
105. Bienert GP, Schjoerring JK, Jahn TP: **Membrane transport of hydrogen peroxide.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 2006, **1758**(8):994-1003.
106. Bienert GP, Mållner ALB, Kristiansen KA, Schulz A, Mållner IM, Schjoerring JK, Jahn TP: **Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes.** *The Journal of Biological Chemistry* 2007, **282**(2):1183-1192.

107. Kimura S, Zhang G-X, Nishiyama A, Shokoji T, Yao L, Fan Y-Y, Rahman M, Suzuki T, Maeta H, Abe Y: **Role of NAD(P)H Oxidase- and Mitochondria-Derived Reactive Oxygen Species in Cardioprotection of Ischemic Reperfusion Injury by Angiotensin II.** *Hypertension* 2005, **45**(5):860-866.
108. Baudry N, Laemmel E, Vicaut E: **In vivo reactive oxygen species production induced by ischemia in muscle arterioles of mice: involvement of xanthine oxidase and mitochondria.** *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 2008, **294**(2):821-828.
109. Chen Q, Camara AKS, Stowe DF, Hoppel CL, Lesnefsky EJ: **Modulation of electron transport protects cardiac mitochondria and decreases myocardial injury during ischemia and reperfusion.** *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 2007, **292**(1):137-147.
110. Lesnefsky EJ, Chen Q, Moghaddas S, Hassan MO, Tandler B, Hoppel CL: **Blockade of electron transport during ischemia protects cardiac mitochondria.** *The Journal of Biological Chemistry* 2004, **279**(46):47961-47967.
111. Lesnefsky EJ, Gudz TI, Migita CT, Ikeda-Saito M, Hassan MO, Turkaly PJ, Hoppel CL: **Ischemic Injury to mitochondrial electron transport in the aging heart: Damage to the iron-sulfur protein subunit of electron transport complex III.** *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2001, **385**(1):117-128.
112. Javadov S, Karmazyn M: **Mitochondrial permeability transition pore opening as an endpoint to initiate cell death and as a putative target for cardioprotection.** *Cellular Physiology and Biochemistry* 2007, **20**(1-4):1-22.
113. Becker LB: **New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology.** *Cardiovascular Research* 2004, **61**(3):461-470.
114. Halestrap AP, Clarke SJ, Khaliulin I: **The role of mitochondria in protection of the heart by preconditioning.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 2007, **1767**(8):1007-1031.
115. Leung AWC, Halestrap AP: **Recent progress in elucidating the molecular mechanism of the mitochondrial permeability transition pore.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 2008, **1777**(7-8):946-952.

116. Semenza GL: **HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia.** *Journal of Applied Physiology* 2000, **88**(4):1474 -1480.
117. Hu C-J, Wang L-Y, Chodosh LA, Keith B, Simon MC: **Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2 alpha in hypoxic gene regulation.** *Molecular and Cellular Biology* 2003, **23**(24):9361-9374.
118. Schumacker PT: **Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1).** *Critical Care Medicine* 2005, **33**(12):423-425.
119. Loor G, Schumacker PT: **Role of hypoxia-inducible factor in cell survival during myocardial ischemia-reperfusion.** *Cell Death and Differentiation* 2008, **15**(4):686-690.
120. Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, Marti HH: **Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension.** *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 1996, **271**(4):1172-1180.
121. Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearhart JD, Lawler AM, Yu AY *et al*: **Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 α** *Genes & Development* 1998, **12**(2):149-162.
122. Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF: **Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998, **95**(14):7987-7992.
123. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL: **Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995, **92**(12):5510-5514.
124. Jaakkola P, Mole DR, Tian Y-M, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, Kriegsheim Av, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ *et al*: **Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau Ubiquitylation Complex by O₂-Regulated Prolyl Hydroxylation.** *Science* 2001, **292**(5516):468-472.
125. Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG, Jr.: **HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing.** *Science* 2001, **292**(5516):464-468.

126. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang G-W, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ: **The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis.** *Nature* 1999, **399**(6733):271-275.
127. Obrenovitch TP: **Molecular physiology of preconditioning-induced brain tolerance to ischemia.** *Physiological Reviews* 2008, **88**(1):211-247.
128. Akihiko H, Toshiki N, Hisae K, Teiji Y: **Ischemic tolerance in chemical preconditioning: Possible role of astrocytic glutamine synthetase buffering glutamate-mediated neurotoxicity.** *Journal of Neuroscience Research* 2006, **84**(1):130-141.
129. Stenzel-Poore MP, Stevens SL, Xiong Z, Lessov NS, Harrington CA, Mori M, Meller R, Rosenzweig HL, Tobar E, Shaw TE *et al*: **Effect of ischaemic preconditioning on genomic response to cerebral ischaemia: similarity to neuroprotective strategies in hibernation and hypoxia-tolerant states.** *The Lancet* 2003, **362**(9389):1028-1037.
130. Costa ADT, Garlid KD: **Intramitochondrial signaling: interactions among mitoKATP, PKC epsilon, ROS, and MPT.** *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 2008, **295**(2):874-882.
131. Zhu Y, Zhang Y, Ojwang BA, Brantley MA, Gidday JM: **Long-term tolerance to retinal ischemia by repetitive hypoxic preconditioning: role of HIF-1alpha and heme oxygenase-1.** *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 2007, **48**(4):1735 - 1743.
132. Granfeldt A, Lefer DJ, Vinten-Johansen J: **Protective ischaemia in patients: preconditioning and postconditioning.** *Cardiovascular Research* 2009, **83**(2):234-246.
133. Pignataro G, Meller R, Inoue K, Ordonez AN, Ashley MD, Xiong Z, Simon RP: **In vivo and in vitro characterization of a novel neuroprotective strategy for stroke: ischemic postconditioning.** *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2007, **28**(2):232-241.
134. Gomez L, Li B, Mewton N, Sanchez I, Piot C, Elbaz M, Ovize M: **Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening: translation to patients.** *Cardiovascular Research* 2009, **83**(2):226-233.

135. Dirnagl U, Becker K, Meisel A: **Preconditioning and tolerance against cerebral ischaemia: from experimental strategies to clinical use.** *The Lancet Neurology* 2009, **8**(4):398-412.
136. Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL, Abbott BJ, Mayo JG, Shoemaker RH, Boyd MR: **Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay.** *Cancer Research* 1988, **48**(3):589-601.
137. Miguel BG, Calcerrada MC, Catalán RE, Martínez AM: **Sphingolipid derivatives modulate intracellular Ca²⁺ in rat synaptosomes.** *Acta Neurobiologiae Experimentalis* 2001, **61**(2):113-117.
138. Kim R, Saxena S, Gordon DM, Pain D, Dancis A: **J-domain protein, Jac1p, of yeast mitochondria required for iron homeostasis and activity of Fe-S cluster proteins.** *The Journal of Biological Chemistry* 2001, **276**(20):17524-17532.
139. Petronilli V, Miotto G, Canton M, Brini M, Colonna R, Bernardi P, Di Lisa F: **Transient and long-lasting openings of the mitochondrial permeability transition pore can be monitored directly in intact cells by changes in mitochondrial calcein fluorescence.** *Biophysical Journal* 1999, **76**(2):725-734.
140. Khaliulin I, Schwalb H, Wang P, Houminer E, Grinberg L, Katzeff H, Borman JB, Powell SR: **Preconditioning improves postischemic mitochondrial function and diminishes oxidation of mitochondrial proteins.** *Free Radical Biology and Medicine* 2004, **37**(1):1-9.
141. Ruiz-Meana M, Garcia-Dorado D, Miro-Casas E, Abellan A, Soler-Soler J: **Mitochondrial Ca²⁺ uptake during simulated ischemia does not affect permeability transition pore opening upon simulated reperfusion.** *Cardiovascular Research* 2006, **71**(4):715-724.
142. Bhuiyan MIH, Islam MN, Jung SY, Yoo HH, Lee YS, Jin C: **Involvement of ceramide in ischemic tolerance induced by preconditioning with sublethal oxygen-glucose deprivation in primary cultured cortical neurons of rats.** *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 2010, **33**(1):11-17.
143. Hertz L: **Bioenergetics of cerebral ischemia: A cellular perspective.** *Neuropharmacology* 2008, **55**(3):289-309.

144. Fordel E, Thijs L, Martinet W, Schrijvers D, Moens L, Dewilde S: **Anoxia or oxygen and glucose deprivation in SH-SY5Y cells: A step closer to the unraveling of neuroglobin and cytoglobin functions.** *Gene* 2007, **398**(1-2):114-122.
145. Erecinska M, Silver IA: **Tissue oxygen tension and brain sensitivity to hypoxia.** *Respiration Physiology* 2001, **128**(3):263-276.
146. Morales A, Lee H, Goñi F, Kolesnick R, Fernandez-Checa J: **Sphingolipids and cell death.** *Apoptosis* 2007, **12**(5):923-939.
147. Posse de Chaves EI: **Sphingolipids in apoptosis, survival and regeneration in the nervous system.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 2006, **1758**(12):1995-2015.
148. Mathias S, Peña LA, Kolesnick RN: **Signal transduction of stress via ceramide.** *Biochemical Journal* 1998, **335**(3):465-480.
149. Furuya K, Ginis I, Takeda H, Chen Y, Hallenbeck JM: **Cell permeable exogenous ceramide reduces infarct size in spontaneously hypertensive rats supporting in vitro studies that have implicated ceramide in induction of tolerance to ischemia.** *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2001, **21**(3):226-232.
150. Love S: **Apoptosis and brain ischaemia.** *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 2003, **27**(2):267-282.
151. Kametsu Y, Osuga S, Hakim AM: **Apoptosis occurs in the penumbra zone during short-duration focal ischemia in the rat.** *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2003, **23**(4):416-422.
152. Halestrap AP: **Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die.** *Biochemical Society Transactions* 2006, **34**(2):232-237.
153. Saotome M, Katoh H, Yaguchi Y, Tanaka T, Urushida T, Satoh H, Hayashi H: **Transient opening of mitochondrial permeability transition pore by reactive oxygen species protects myocardium from ischemia-reperfusion injury.** *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 2009, **296**(4):1125-1132.

154. Murata M, Akao M, O'Rourke B, Marban E: **Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels attenuate matrix Ca²⁺ overload during simulated ischemia and reperfusion: possible mechanism of cardioprotection.** *Circulation Research* 2001, **89**(10):891-898.
155. Khaliulin I, Clarke SJ, Lin H, Parker J, Suleiman MS, Halestrap AP: **Temperature preconditioning of isolated rat hearts - a potent cardioprotective mechanism involving a reduction in oxidative stress and inhibition of the mitochondrial permeability transition pore.** *The Journal of Physiology* 2007, **581**(3):1147-1161.
156. Sun H-Y, Wang N-P, Kerendi F, Halkos M, Kin H, Guyton RA, Vinten-Johansen J, Zhao Z-Q: **Hypoxic postconditioning reduces cardiomyocyte loss by inhibiting ROS generation and intracellular Ca²⁺ overload.** *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 2005, **288**(4):1900-1908.
157. Kinnally K, Antonsson B: **A tale of two mitochondrial channels, MAC and PTP, in apoptosis.** *Apoptosis* 2007, **12**(5):857-868.
158. Jin Z, El-Deiry W: **Overview of cell death signaling pathways.** *Cancer Biology & Therapy* 2005, **4**(2):139-163.
159. DeVries TA, Neville MC, Reyland ME: **Nuclear import of PKC delta is required for apoptosis: identification of a novel nuclear import sequence.** *EMBO Journal* 2002, **21**(22):6050-6060.
160. Reyland ME: **Protein kinase C δ and apoptosis.** *Biochemical Society Transactions* 2007, **35**(5):1001-1004.
161. Brodie C, Blumberg PM: **Regulation of cell apoptosis by protein kinase C δ .** *Apoptosis* 2003, **8**(1):19-27.
162. Murriel CL, Churchill E, Inagaki K, Szweda LI, Mochly-Rosen D: **Protein kinase C delta activation induces apoptosis in response to cardiac ischemia and reperfusion damage: A mechanism involving Bad and the mitochondria.** *The Journal of Biological Chemistry* 2004, **279**(46):47985-47991.
163. Chou W-H, Messing RO: **Protein kinase C isozymes in stroke.** *Trends in Cardiovascular Medicine* 2005, **15**(2):47-51.

164. Churchill EN, Mochly-rosen D: **The roles of PKC δ and ϵ isoenzymes in the regulation of myocardial ischaemia/reperfusion injury.** *Biochemical Society Transactions* 2007, **35**(5):1040-1042.
165. Gao X, Zhang H, Takahashi T, Hsieh J, Liao J, Steinberg GK, Zhao H: **The Akt signaling pathway contributes to postconditioning's protection against stroke; the protection is associated with the MAPK and PKC pathways.** *Journal of Neurochemistry* 2008, **105**(3):943-955.
166. Bright R, Mochly-Rosen D: **The role of protein kinase C in cerebral ischemic and reperfusion injury.** *Stroke* 2005, **36**(12):2781-2790.
167. Budas GR, Mochly-rosen D: **Mitochondrial protein kinase C ϵ (PKC ϵ): emerging role in cardiac protection from ischaemic damage.** *Biochemical Society Transactions* 2007, **35**(5):1052-1054.
168. Teng J, Kay H, Chen Q, Adams J, Grilli C, Guglielmello G, Zambrano C, Krass S, Bell A, Young L: **Mechanisms related to the cardioprotective effects of protein kinase C epsilon (PKC ϵ) peptide activator or inhibitor in rat ischemia/reperfusion injury.** *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 2008, **378**(1):1-15.
169. Inagaki K, Churchill E, Mochly-Rosen D: **Epsilon protein kinase C as a potential therapeutic target for the ischemic heart.** *Cardiovascular Research* 2006, **70**(2):222-230.
170. Ardehali H: **Signaling mechanisms in ischemic preconditioning: interaction of PKC epsilon and mitoKATP in the inner membrane of mitochondria.** *Circulation Research* 2006, **99**(8):798-800.
171. Kim MY, Kim MJ, Yoon IS, Ahn JH, Lee SH, Baik EJ, Moon CH, Jung YS: **Diazoxide acts more as a PKC epsilon activator, and indirectly activates the mitochondrial KATP channel conferring cardioprotection against hypoxic injury.** *British Journal of Pharmacology* 2006, **149**(8):1059-1070.
172. Liu H, Zhang HY, Zhu X, Shao Z, Yao Z: **Preconditioning blocks cardiocyte apoptosis: role of KATP channels and PKC-epsilon.** *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 2002, **282**(4):1380-1386.

173. Baines CP, Song C-X, Zheng Y-T, Wang G-W, Zhang J, Wang O-L, Guo Y, Bolli R, Cardwell EM, Ping P: **Protein kinase C epsilon interacts with and inhibits the permeability transition pore in cardiac mitochondria.** *Circulation Research* 2003, **92**(8):873-880.
174. Wang Y, Seibenhener ML, Vandenplas ML, Wooten MW: **Atypical PKC ζ is activated by ceramide, resulting in coactivation of NF- κ B/JNK kinase and cell survival.** *Journal of Neuroscience Research* 1999, **55**(3):293-302.
175. Grunicke HH, Spitaler M, Mwanjewe J, Schwaiger W, Jenny M, Ueberall F: **Regulation of cell survival by atypical protein kinase C isozymes.** *Advances in Enzyme Regulation* 2003, **43**(1):213-228.
176. Halestrap AP, Kerr PM, Javadov S, Woodfield KY: **Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1998, **1366**(1-2):79-94.
177. Halestrap AP, Doran E, Gillespie JP, O'Toole A: **Mitochondria and cell death.** *Biochemical Society Transactions* 2000, **28**(2):170-177.
178. Guo D, Nguyen T, Ogbi M, Tawfik H, Ma G, Yu Q, Caldwell RW, Johnson JA: **Protein kinase C-epsilon coimmunoprecipitates with cytochrome oxidase subunit IV and is associated with improved cytochrome-c oxidase activity and cardioprotection.** *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 2007, **293**(4):2219-2230.
179. Ogbi M, Johnson JA: **Protein kinase C epsilon interacts with cytochrome c oxidase subunit IV and enhances cytochrome c oxidase activity in neonatal cardiac myocyte preconditioning.** *Biochemical Journal* 2006, **393**(1):191-199.
180. Yun SP, Lee MY, Ryu JM, Song CH, Han HJ: **Role of HIF-1alpha and VEGF in human mesenchymal stem cell proliferation by 17beta-estradiol: involvement of PKC, PI3K/Akt, and MAPKs.** *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 2009, **296**(2):317-326.
181. Page EL, Robitaille GA, Pouyssegur J, Richard DE: **Induction of hypoxia-inducible factor-1alpha by transcriptional and translational mechanisms.** *The Journal of Biological Chemistry* 2002, **277**(50):48403-48409.

182. Jin Z-Q, Zhang J, Huang Y, Hoover HE, Vessey DA, Karliner JS: **A sphingosine kinase 1 mutation sensitizes the myocardium to ischemia/reperfusion injury.** *Cardiovascular Research* 2007, **76**(1):41-50.
183. Theilmeyer G, Schmidt C, Herrmann J, Keul P, Schafers M, Herrgott I, Mersmann J, Larmann J, Hermann S, Stypmann J *et al*: **High-density lipoproteins and their constituent, sphingosine-1-phosphate, directly protect the heart against ischemia/reperfusion injury in vivo via the S1P3 lysophospholipid receptor.** *Circulation* 2006, **114**(13):1403-1409.
184. Jin Z-Q, Goetzl EJ, Karliner JS: **Sphingosine kinase activation mediates ischemic preconditioning in murine heart.** *Circulation* 2004, **110**(14):1980-1989.
185. Freude B, Masters TN, Robicsek F, Fokin A, Kostin S, Zimmermann R, Ullmann C, Lorenz-Meyer S, Schaper J: **Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion.** *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2000, **32**(2):197-208.
186. Rosen H, Gonzalez-Cabrera PJ, Sanna MG, Brown S: **Sphingosine 1-phosphate receptor signaling.** *Annual Review of Biochemistry* 2009, **78**(1):743-768.
187. Singh IN, Hall ED: **Multifaceted roles of sphingosine-1-phosphate: How does this bioactive sphingolipid fit with acute neurological injury?** *Journal of Neuroscience Research* 2008, **86**(7):1419-1433.
188. Costa ADT, Jakob R, Costa CL, Andrukhiv K, West IC, Garlid KD: **The mechanism by which the mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel opening and H₂O₂ inhibit the mitochondrial permeability transition.** *The Journal of Biological Chemistry* 2006, **281**(30):20801-20808.
189. Lu D, Sivaprasad U, Huang J, Shankar E, Morrow S, Basu A: **Protein kinase C- ϵ protects MCF-7 cells from TNF-mediated cell death by inhibiting Bax translocation.** *Apoptosis* 2007, **12**(10):1893-1900.
190. Okhrimenko H, Lu W, Xiang C, Hamburger N, Kazimirsky G, Brodie C: **Protein kinase C epsilon regulates the apoptosis and survival of glioma cells.** *Cancer Research* 2005, **65**(16):7301-7309.

191. Belizário JE, Alves J, Occhiucci JM, Garay-Malpartida M, Sesso A: **A mechanistic view of mitochondrial death decision pores.** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2007, **40**:1011-1024.
192. Iijima T: **Mitochondrial membrane potential and ischemic neuronal death.** *Neuroscience Research* 2006, **55**(3):234-243.
193. Xu M, Wang Y, Ayub A, Ashraf M: **Mitochondrial KATP channel activation reduces anoxic injury by restoring mitochondrial membrane potential.** *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 2001, **281**(3):1295-1303.
194. Wang Y, Ashraf M: **Role of protein kinase C in mitochondrial KATP channel-mediated protection against Ca²⁺ overload injury in rat myocardium.** *Circulation Research* 1999, **84**(10):1156-1165.
195. Korge P, Honda HM, Weiss JN: **Protection of cardiac mitochondria by diazoxide and protein kinase C: Implications for ischemic preconditioning.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002, **99**(5):3312-3317.
196. Hausenloy DJ, Maddock HL, Baxter GF, Yellon DM: **Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning?** *Cardiovascular Research* 2002, **55**(3):534-543.
197. Hassouna A, Matata BM, Galinanes M: **PKC epsilon is upstream and PKC alpha is downstream of mitoKATP channels in the signal transduction pathway of ischemic preconditioning of human myocardium.** *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 2004, **287**(5):1418-1425.
198. Temes E, Martin-Puig S, Aragones J, Jones DR, Olmos G, Merida I, Landazuri MO: **Role of diacylglycerol induced by hypoxia in the regulation of HIF-1alpha activity.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004, **315**(1):44-50.
199. Young KW, Nahorski SR: **Sphingosine 1-phosphate: a Ca²⁺ release mediator in the balance.** *Cell Calcium* 2002, **32**(5-6):335-341.
200. Rapizzi E, Donati C, Cencetti F, Pinton P, Rizzuto R, Bruni P: **Sphingosine 1-phosphate receptors modulate intracellular Ca²⁺ homeostasis.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2007, **353**(2):268-274.

201. Taha TA, Mullen TD, Obeid LM: **A house divided: Ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate in programmed cell death.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 2006, **1758**(12):2027-2036.

8. ARTÍCULOS PUBLICADOS

Involvement of mitochondria on neuroprotective effect of sphingosine-1-phosphate in cell death in an in vitro model of brain ischemia

Alba Agudo-López, Begoña G. Miguel, Inmaculada Fernández, Ana M. Martínez*

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Química, Universidad Complutense de Madrid, E-28040 Madrid, Spain

article info

Article history:

Received 2 November 2009

Received in revised form

22 December 2009

Accepted 28 December 2009

Keywords:

Sphingosine-1-phosphate

Ischemia

Mitochondria

Neuroprotection

abstract

Sphingosine-1-phosphate (S1P) has been demonstrated to be an important regulator of cell death and survival. Although it has been suggested that the sphingolipid may act as a neuroprotector in the cell apoptosis induced by traumatic brain injury, the mechanisms involved in this action are unknown. In this study, the relationship between S1P and neuroprotective effect was studied in an in vitro model of ischemia, maintaining SH-SY5Y human neuroblastoma cells under oxygen–glucose deprivation (OGD). When cells were treated with 1-MS1P simultaneously with OGD and recovery, cell viability increases in a dose–response manner. S1P treatment reduces significantly both necrosis and apoptosis cell death. On the other hand, the treatment with specific PKC δ (V1-2), prevents S1P protective effect of OGD/recovery-induced necrosis. Moreover, S1P treatment provokes the translocation of PKC δ to the mitochondria. From these results, it is reasonable to assume that S1P protection from necrosis is mediated by PKC δ . We also studied the action of S1P on mitochondrial inner membrane potential and mitochondrial Ca^{2+} levels during ischemia. In this regard, we must point out that S1P treatment reduces the OGD-induced membrane depolarization and also reduces the increase of Ca^{2+} in mitochondria during OGD. Results also indicate that mitochondria from OGD treated cells have significantly less ability to resist swelling on Ca^{2+} loading than those obtained in presence of oxygen and glucose. Nevertheless, when S1P was added, this resistance increases considerably. These findings suggest that S1P may have a potential role as a neuroprotective agent in brain injury.

© 2009 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.