

EVENTOS DE SEÑALIZACIÓN LIPÍDICA DURANTE INJURIAS OXIDATIVAS EN EL SISTEMA NERVIOSO

Gabriela A. Salvador*, Melina V. Mateos#, Romina M. Uranga#,
Guadalupe Rodríguez Díez y Norma M. Giusto

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca, Universidad Nacional del Sur, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Camino La Carrindanga Km7 B8000FWB, Bahía Blanca, Argentina.
E-mail: salvador@criba.edu.ar

Resumen

Diversas patologías del sistema nervioso central tienen su origen en un desbalance de los mecanismos normales de oxidación-reducción celular. En este aspecto, se le ha asignado al estrés oxidativo inducido por la acumulación de hierro un rol significativo en el desarrollo de enfermedades tales como la enfermedad de Parkinson (EP) y la enfermedad de Alzheimer (EA). La acumulación de hierro, sin el concomitante incremento en ferritina ocurre en el cerebro tanto en el proceso de envejecimiento neuronal como en los procesos neurodegenerativos. En este sentido la metaloneurobiología ha estado y se encuentra estudiando el rol de distintos metales de transición en los procesos de injuria neuronal y su relación con la aparición de los primeros signos de neurodegeneración. Las neuronas han desarrollado diversos mecanismos de protección contra el estrés oxidativo, entre ellos se encuentra la activación de diversas vías de señalización. La respuesta final dependerá de la identidad, la intensidad y la persistencia del insulto oxidativo. La caracterización de los mecanismos que median los efectos de los procesos de injuria oxidativa mediados por la acumulación de hierro en la disfunción y en la muerte neuronal son centrales para el entendimiento de los mecanismos patológicos que intervienen en diversos procesos neurodegenerativos. Actualmente existen importantes evidencias acerca de la relación entre una anormal o desregulada señalización lipídica y los eventos de injuria oxidativa en el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas. En este artículo describiremos el rol de diferentes vías de señalización lipídica tales como la fosfatidilinositol 3-quinasa/Akt, la fosfolipasa C específica para fosfatidilcolina, la fosfolipasa D y la fosfolipasa A₂ en los eventos de señalización disparados por la neurotoxicidad inducida por la acumulación de hierro.

Palabras clave: hierro, neurodegeneración, señalización lipídica

Abstract

Lipid signaling events during oxidative injury in nervous system. The importance of oxidative damage to the pathogenesis of many neurodegenerative processes has become increasingly apparent over the past few years. Furthermore, it has been suggested that iron-induced oxidative stress can play a key role in the pathogenesis of several neurodegenerative diseases. Iron progressively accumulates in the brain both during normal aging and neurodegenerative processes. However, iron accumulation occurs without the concomitant increase in tissue ferritin, which could increase the risk of oxidative stress. Moreover, high iron concentrations in the brain have been consistently observed in Alzheimer's (AD) and Parkinson's (PD) diseases. In this connection, metalloneurobiology has become extremely important in establishing the role of iron in the onset and progression of neurodegenerative diseases. Neurons have developed several protective mechanisms against oxidative stress, among them the activation of cellular signaling pathways. The final response will depend on the identity, intensity and persistence of the oxidative insult. The characterization of the mechanisms mediating the effects of iron-mediated increase in cell oxidants on neuronal dysfunction and death is central to understanding the pathology of a number of neurodegenerative disorders. Accumulating evidence points toward a potentially important link between abnormal or deregulated lipid signaling and oxidative stress in the development of neurodegenerative diseases. In this article, we will review the role of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt, phosphatidylcholine-specific phospholipase C, phospholipase D and phospholipase A₂ pathways in signaling events triggered by iron neurotoxicity.

Key words: free iron, neurodegeneration, lipid signaling

#Ambos autores contribuyeron en partes iguales a la realización de este trabajo.

Introducción

Las reacciones de oxido-reducción participan en múltiples procesos biológicos del metabolismo celular. Estas reacciones implican la transferencia de electrones y pueden generar productos conocidos como radicales libres (RL) o especies reactivas de oxígeno (ROS). En condiciones fisiológicas existe un equilibrio entre los factores que promueven la oxidación y los factores protectores que regulan la formación de RL. Un desbalance entre la generación de RL y los procesos de defensa antioxidante genera estrés oxidativo. La injuria oxidativa induce en la célula efectos tóxicos por oxidación de lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos, hecho que produce la acumulación de agregados intracelulares, disfunción mitocondrial, excitotoxicidad y apoptosis.

El cerebro es un órgano particularmente sensible a la injuria oxidativa debido a la elevada tasa de consumo de oxígeno, su alto contenido de sustancias fácilmente oxidables como los ácidos grasos poliinsaturados y las catecolaminas, además de su escasa defensa antioxidante [1-3]. La peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados en las membranas celulares inicia un deterioro acumulativo de las funciones de membrana y provoca disminución en su fluidez, reducción en el potencial electroquímico y aumento de la permeabilidad de la misma. La formación de lípidos modificados por oxidación puede causar disfunción celular, y en células posmitóticas como las neuronas, la muerte [1-4]. Otro tejido particularmente susceptible al daño oxidativo es la retina debido a su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados y a su constante exposición a la luz [5,6]. A su vez, el estrés foto-oxidativo puede estar exacerbado por un desbalance en la homeostasis de los metales de transición. Diversas investigaciones sugieren que el hierro es importante en los procesos neurodegenerativos retinianos y que los niveles de este metal se encuentran aumentados en la degeneración macular relacionada con la edad [7].

El hierro, metal importante para muchos procesos celulares normales, puede actuar como generador de radicales libres en diversas patologías [1,8,9] provocando peroxidación lipídica, deterioro en los transportes de glutamato y glucosa, y disfunción mitocondrial. El efecto de este metal de transición sobre las membranas biológicas es comparable al producido por el péptido beta-amiloide (β A), dado que la peroxidación lipídica parece ser uno de los eventos primarios inducidos por el péptido y que estaría causalmente ligado a la disrupción de la homeostasis iónica, al aumento en la concentración intracelular de calcio, y al daño y muerte celular [10-12]. La acumulación de

hierro, sin el aumento concomitante de ferritina, es una observación constante tanto en la enfermedad de Alzheimer, como en la enfermedad de Parkinson [13].

El cobre es otro metal de transición que se comporta como inductor de estrés oxidativo y por ende también ha sido relacionado con enfermedades neurodegenerativas [14]. Investigaciones recientes han indicado que los niveles de Cu libre están incrementados en los pacientes con EA y que este metal podría estar involucrado en la patogénesis de la enfermedad. Diversos estudios demuestran que una ingesta elevada de Cu, como la que se produce a raíz de diversos suplementos dietarios, junto con una dieta alta en grasas incide en una mayor declinación de las propiedades cognitivas [15].

A su vez ha sido demostrada una estrecha correlación entre los metales de transición y la agregación de péptidos amiloidogénicos tales como el β A y la α -sinucleína (presente en los cuerpos de Lewis de la EP) [16]. Ambos péptidos poseen la habilidad de unir metales de transición y, como consecuencia, se los postula como mediadores de las reacciones redox [17]. De hecho, el péptido β A (1-42) posee sitios de unión para Zn(II), Cu(II) y Fe(II) en su extremo hidrofílico N-terminal [18]. Como se mencionó anteriormente, la homeostasis del Fe y del Cu se encuentra alterada en la EA y la concentración de estos metales alcanza valores de 3 a 5 veces superiores a las fisiológicas [19]. Asimismo, existen evidencias concluyentes acerca del rol del hierro y del cobre en el proceso de agregación y formación de fibrillas tanto del β A como de la α -sinucleína. Todos estos datos permiten establecer una estrecha correlación entre distintas entidades patológicas como la acumulación de metales de transición, la agregación proteica y el daño oxidativo en neuronas [18,20].

Las neuronas han desarrollado diversos mecanismos de neuroprotección contra el estrés oxidativo, entre los cuales se encuentra la activación de diferentes mecanismos de señalización celular. Tanto la actividad como el estado metabólico de las terminales nerviosas son capaces de regular la expresión génica en neuronas, proceso esencial para la supervivencia, la diferenciación y plasticidad neuronales [21]. La capacidad del sistema nervioso central de comunicar un estímulo transitorio desde la sinapsis al núcleo celular, para regular la expresión génica, requiere la relocalización de factores de transcripción, los cuales después de su activación pueden migrar desde el citoplasma axonal al núcleo o viceversa [22]. Particularmente en las enfermedades neurodegenerativas como la EA se ve afectada la actividad sináptica. Está reportado que las pri-

meras manifestaciones de la EA ocurren a nivel de las sinapsis, y tanto el estudio de las mismas como la exposición de las terminales a insultos oxidativos constituyen un modelo adecuado para el estudio de los mecanismos moleculares de esta patología [21,23,24].

Ante la injuria oxidativa, la decisión celular entre vivir o morir queda sujeta a la estricta regulación e integración de múltiples vías de señalización. En líneas generales, la activación de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) se correlaciona con la supervivencia celular. Las PI3Ks han sido clasificadas en tres grandes subfamilias de acuerdo a su estructura y a su especificidad de sustrato. La clase IA es un heterodímero formado por una subunidad regulatoria p85 (p85 α , p85 β y p55 γ) y una subunidad catalítica p110 (p110 α , p110 β y p110 δ). La clase I de las PI3Ks tiene como efector principal a la serina/treonina quinasa Akt (PKB). Una vez activa, Akt incrementa la síntesis de glucógeno y el metabolismo celular a través de la inactivación de los factores de transcripción de la familia FOXO y de la glucógeno sintetasa quinasa 3 β (GSK3 β) [25-30]. Asimismo, la vía PI3K/Akt promueve la supervivencia celular mediante la fosforilación e inhibición de diferentes proteínas inductoras de muerte tales como: GSK3 β , la proteína de muerte asociada a Bcl-2/BclxL (BAD), la caspasa 9, y los factores de transcripción de la familia FOXO [31-34]. Recientemente, ha sido reportado que Akt también fosforila e inactiva a diferentes miembros de la familia de las JNK [35]. Por otro lado, la fosfatasa PTEN (fosfatasa y homólogo de la tensina) juega un rol clave en los procesos de supervivencia y apoptosis mediante la inhibición de fosfoproteínas activadas por la vía PI3K/Akt. PTEN es entonces el mayor regulador negativo de la vía PI3K/Akt, ya que cataliza la degradación de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP₃) a fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP₂). Diversos estudios sugieren que la inhibición de PTEN tendría roles neuroprotectivos en desórdenes de tipo neurodegenerativo [36-38].

La familia de las quinasas ERK, se encuentra activada en un amplio rango de procesos celulares. En neuronas específicamente, ERK puede funcionar promoviendo tanto la supervivencia como la muerte celular. Por otro lado, existen evidencias de que la PI3K actúa como activador de ERK en procesos de injuria oxidativa. Diversos factores de transcripción han sido identificados como sustratos de Akt activada, los cuales podrían mediar la expresión de enzimas antioxidantes. Como se mencionó anteriormente, Akt fosforila diversos factores de transcripción de la familia FOXO y también participa en la activación del factor nuclear kappa B (NF- κ B) [36]. En este as-

pecto, ha sido demostrado que la activación de la vía PI3K/Akt aumenta la expresión de la enzima superóxido dismutasa a través de la activación de NF- κ B [39]. A pesar de los datos existentes, aún quedan numerosos interrogantes acerca del rol de la vía PI3K/Akt en los procesos de injuria oxidativa neuronal.

Otra importante vía de señalización lipídica es la generación de mediadores a partir de la fosfatidilcolina (PC). Este fosfolípido es el más abundante de las membranas celulares, tanto en eucariotas así como también en algunas células procariotas, constituyendo entre el 40 y el 50% de los fosfolípidos (PL) totales. La PC se considera una fuente de mediadores lipídicos ya que a partir de su hidrólisis se generan mensajeros intracelulares tales como el diacilglicerol (DAG), el ácido fosfatídico (PA), el ácido araquidónico (AA) y la lisofosfatidilcolina (LPC) [40-42]. La generación de estos segundos mensajeros se debe a la acción de fosfolipasas, enzimas cuya activación puede ser disparada por diversos estímulos como factores de crecimiento, citoquinas, neurotransmisores, hormonas y otras señales extracelulares [43-45].

Al ser hidrolizada por una fosfolipasa D (PLD), la PC genera PA mientras que la acción subsiguiente de una fosfatasa de PA genera DAG. Por otro lado una fosfolipasa C específica para PC (PC-PLC) puede hidrolizar directamente la PC a DAG y fosfocolina [40-42]. Estudios más recientes concluyeron que la actividad enzimática correspondiente a la hidrolasa de PA es ejercida por una familia de isoenzimas con especificidad por varios lípidos fosforados como el PA, el LPA, la esfingosina-1-fosfato y la ceramida-1-fosfato entre otros. Estas enzimas son ahora conocidas como lípido fosfato fosfatasa (LPPs), proteínas integrales de membrana de las cuales se han descrito 3 isoformas en mamíferos: LPP1 (PAP2a), LPP2 (PAP2c) y LPP3 (PAP2b) con una mayor eficiencia catalítica para LPA, PA y esfingosina-1-fosfato respectivamente [46-49].

Se ha especulado que la activación de estas vías generadoras de DAG a partir de la PC, que no conducen a un aumento del Ca²⁺ intracelular, participarían en la activación de isoformas de proteínas quinasas C (PKCs) independientes de Ca²⁺ [50]. Si bien las PKCs fueron las primeras proteínas en las cuales se describió la capacidad reguladora del DAG, desde este descubrimiento hasta la fecha se han descrito otras cinco familias de proteínas capaces de ser moduladas por el DAG: las proteínas quinasas D (PKD), las quimerinas, las proteínas liberadoras de nucleótidos de guanina de Ras (RasGRPs), las Munc13s y las DAG quinasas (DAGKs). Todas

estas proteínas se caracterizan por la presencia en su secuencia de al menos un dominio conservado 1 (C1), con diferentes especificidades y afinidades por el DAG [51].

El DAG además juega importantes roles en la estructura y en la dinámica de las membranas biológicas. Cuando este lípido bioactivo se concentra en pequeñas regiones de la membrana, su curvatura negativa y su falta de carga inducen regiones inestables y asimétricas en la bicapa lipídica participando en los procesos de fusión y fisión de membranas [47].

En mamíferos se han reportado dos genes (ambos con variantes de "splicing") que codifican para dos isoformas de la *PLD*: *PLD1* y *PLD2* [52-54]. El sitio activo de estas enzimas está compuesto por dos dominios catalíticos HKD, los cuales se encuentran particularmente bien conservados tanto en las *PLDs* de eucariotas como en las bacterianas. Además, estas proteínas poseen un dominio PH (implicado en la unión a fosfatidilinositol bi y trifosfato) y un dominio PX (de homología a phox). Ambas isoformas presentan un requerimiento prácticamente absoluto de PIP_2 [55].

Aunque existe una homología considerable entre los genes, los subtipos *PLD1* y *2* presentan diferencias significativas en cuanto a su distribución subcelular y regulación. La *PLD1* es una proteína de 120 kDa, localizada en la región perinuclear y en el Golgi, que prácticamente no posee actividad basal y que es regulada por la *PKC α* y por proteínas G pequeñas tales como *ARF* y *Rho*. En cambio, la *PLD2* tiene un peso molecular de 100 kDa, se localiza principalmente en la membrana plasmática y presenta una alta actividad basal en comparación con la isoforma *PLD1* [44, 50, 55, 56]. Las isoformas de la *PLD* están presentes tanto en las neuronas (independientemente de su neurotransmisor) como en los astrocitos y en los oligodendrocitos. En ratas adultas, la *PLD1* se expresa en áreas del cerebro ricas en neuronas colinérgicas y en células gliales como los oligodendrocitos, mientras que la *PLD2* se expresa altamente en los astrocitos [50].

Un rol fundamental de la *PLD* en el sistema nervioso central es su participación en los procesos de exo y endocitosis, dado que el PA promueve la distorsión de la bicapa lipídica estimulando la fusión de membranas [57, 58]. Además, las interacciones *ARF-PLD1* controlan pasos específicos en el tráfico vesicular y en la fusión de membranas [56, 59]. Algunos estudios también han postulado a la *PLD* como un regulador de los niveles de colina y de la síntesis de acetilcolina en las neuronas colinérgicas [50,60]. Tanto la sobreexpresión de la *PLD1* como de la *PLD2* aumentó

la síntesis de acetilcolina en células colinérgicas murinas SN56 [61]. El PA producido por ambas isoformas de la *PLD* es reconocido como un lípido de señalización y participa como efector de múltiples procesos celulares tales como proliferación, diferenciación y respuesta inmune [44, 55, 62]. Diversos estudios han demostrado que la *PLD* puede ser activada por estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en células endoteliales, en astrocitos y en músculo liso. Entre los mecanismos de activación de la vía de la *PLD* por injuria oxidativa se encuentran varios factores tales como ciertas tirosina-quinasa, *PKC* y *MAPK*. A su vez, se ha relacionado la activación de la *PLD* inducida por H_2O_2 como una condición indispensable para la activación de la *PI3K*.

La vía de generación de DAG menos explorada hasta el momento es la vía de la *PC-PLC*. Si bien el rol y la estructura de esta enzima han sido bien estudiados en células procariontes en mamíferos la *PC-PLC* no ha sido aún clonada, aunque sí se ha demostrado la generación de DAG y fosfocolina a partir de *PC* en diversos tejidos de rata, en sinaptosomas de cerebro de ratón y en el plasma seminal de toro [63-67].

Sin duda, el rol de la *PC-PLC* en mamíferos ha sido mayoritariamente estudiado en células del sistema inmune, tales como células B provenientes de linfomas murinos en donde se demostró que la actividad de la *PC-PLC* es necesaria para la activación de *STAT6* luego de la estimulación con la interleuquina 4 (*IL-4*) [68]. En monocitos la activación del receptor de *IL-4* origina un aumento en los niveles de DAG y de fosfocolina, producto de la actividad de la *PC-PLC* [69]. También en células "natural killers" (*NK*) se demostró la colocalización de la *PC-PLC* con los gránulos de perforinas y su rol fundamental en la citotoxicidad mediada por estas células [70-72]. Nuevos roles de la *PC-PLC* han sido descritos recientemente en macrófagos, como la participación de esta enzima en la secreción de la citoquina *CCL2* y la regulación de la producción del factor de necrosis tumoral alfa (*TNF α*) y de la *IL-1 β* en la respuesta inflamatoria inducida por la sílica en macrófagos alveolares [73, 74]. A pesar de estos antecedentes reportados en las células del sistema inmune, muy pocos son los estudios que se han realizado para dilucidar el rol de la *PC-PLC* en el sistema nervioso.

De lo expuesto anteriormente se deduce que la caracterización de los eventos de señalización celular que involucran mediadores lipídicos es un campo prácticamente inexplorado, el cual podría contribuir al menos en parte, al esclarecimiento de las bases moleculares de la neurodegeneración.

Modelo de estrés oxidativo inducido por Fe²⁺ en terminales sinápticas de ratas adultas y seniles

Dado que la pérdida de las terminales sinápticas parece ser un evento temprano en el daño celular que ocurre en la EA y que constituye el parámetro mejor relacionado con el grado de avance de la enfermedad, el uso de sinaptosomas es ampliamente aceptado para el estudio de las bases moleculares que actúan en los procesos neurodegenerativos. En este estudio se estableció un modelo *in vitro* de estrés oxidativo inducido sobre terminales sinápticas obtenidas a partir de corteza cerebral de ratas de la cepa Wistar adultas (4 meses) y seniles (28 meses). En el establecimiento de este modelo se incubaron las terminales sinápticas purificadas con distintas concentraciones de Fe²⁺ (sulfato ferroso) y de Cu²⁺ (sulfato de cobre). Los ensayos de inducción de daño oxidativo se llevaron a cabo en función del tiempo (5-60 min) y para evaluar el grado de injuria sináptica se determinaron diversos parámetros tales como la capacidad reductora de la mitocondria, la integridad de la membrana plasmática, la funcionalidad del transportador de glutamato y el grado de peroxidación lipídica.

El transporte de glutamato ha sido reportado como uno de los parámetros comprometidos, junto con la función mitocondrial, en los desórdenes neurodegenerativos que involucran estrés oxidativo. La incorporación de [³H]-glutamato en sinaptosomas (Syn) expuestos a Fe²⁺ 50 μM ha demostrado no presentar alteraciones a cortos tiempos de exposición. Sin embargo, los tiempos crecientes de exposición al metal resultaron en una disminución dependiente del tiempo en la incorporación de este aminoácido. Contrariamente, la actividad mitocondrial y la integridad de la membrana plasmática mostraron ser los parámetros más tempranamente afectados. Los estudios de viabilidad sinaptosomal han demostrado que el Fe²⁺ en diferentes concentraciones (10, 50, y 200 μM) es capaz de disminuir la capacidad reductora normal de las mitocondrias sinápticas significativamente en todos los tiempos de incubación ensayados (5, 30 y 60 minutos). Esto demuestra que aun los tiempos cortos de exposición (5 minutos) son suficientes para la aparición de los primeros signos de injuria oxidativa. De manera similar, los estudios de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) demostraron que, efectivamente, la integridad de la membrana sinaptosomal también se ve significativamente deteriorada luego de 5 minutos de exposición al Fe²⁺, y que dicho deterioro es dependiente tanto de la concentración del metal como del tiempo de exposición al mismo [75].

El 4-hidroxinonenal (HNE) es considerado el más abundante y tóxico producto de la peroxidación lipídica [76] y ha demostrado ser el responsable del deterioro del transporte de glutamato y de la funcionalidad mitocondrial por su capacidad de unirse covalentemente a las proteínas y modificar su función. Por otra parte, se estima que sería un mediador importante de la disfunción y la degeneración sinaptosomales inducidas por insultos oxidativos. En efecto, se ha comprobado la generación de HNE como consecuencia de la incubación de los sinaptosomas con Fe²⁺, resultado consistente con los reportes de Keller *et al.* [10,11]. Una incubación breve (5 minutos) en presencia Fe²⁺ ha demostrado ser suficiente para aumentar la generación de HNE en la terminal sináptica aislada [77].

Debido al conocido enriquecimiento en hierro y cobre que presentan las placas amiloides encontradas en la enfermedad de Alzheimer [19], también estudiamos el efecto del Cu²⁺ sobre las terminales sinápticas de rata purificadas. En este caso, la concentración utilizada se eligió de acuerdo a lo reportado por la literatura como concentraciones halladas en el espacio sináptico durante el proceso de transmisión (10-15 μM) [78]. En este caso, se ha observado que el Cu²⁺ produce un daño mitocondrial leve pero significativo luego de una breve incubación, el cual aumenta ligeramente tras 30 minutos, pero no induce un daño superior a mayor tiempo de exposición.

Actividad y regulación de la vía PI3K/Akt en terminales sinápticas expuestas a injuria oxidativa por metales de transición

Los efectos del estrés oxidativo sobre la vía de señalización PI3K/Akt fueron abordados a través de diferentes estrategias experimentales: a) estudios de marcación de los fosfoinosítidos endógenos (presentes en las membranas sinaptosomales) empleando [³²P]ATP y un conocido inhibidor de la PI3K, LY294002; b) estudio de la actividad de la PI3K en inmunoprecipitados de sinaptosomas expuestos al metal; c) estudio de la fosforilación de Akt mediante la técnica de Western blot en sinaptosomas incubados con el metal. A partir de cualquiera de las tres aproximaciones experimentales se ha observado que la vía PI3K/Akt es activada solo luego de breves exposiciones al metal en cuestión, es decir, en condiciones de injuria oxidativa leve. Adicionalmente, se estudió el estado de fosforilación (y consiguiente inactivación) de la enzima GSK3β, importante efectora de la vía que se encuentra corriente abajo de Akt. También en este caso se ha comprobado que la fosforilación de la enzima GSK3β aumenta notablemente tras 5 minutos de exposición al Fe²⁺

(coincidiendo temporalmente con la activación de las enzimas PI3K y Akt) aunque también se ha advierte un aumento menor a los 30 minutos en presencia del metal.

De acuerdo a investigaciones realizadas por Luo *et al.* [79], el β A activa a la PI3K, tanto en neuronas corticales como en células PC12, por un mecanismo mediado por quinasas de tirosinas. Dado que han sido descritas las similitudes en los mecanismos generadores de daño por parte del β A y del Fe^{2+} (ambos generan HNE por peroxidación lipídica, el cual sería responsable de los efectos deletéreos), se procedió a indagar los efectos del Fe^{2+} 50 μM sobre los niveles de fosforilación en tirosinas de las proteínas presentes en la terminal sináptica. En concordancia con esos resultados, se ha observado que la exposición de los sinaptosomas al metal provoca un marcado incremento en la fosforilación de los residuos tirosinas de varias proteínas sinaptosomales. Además, los ensayos enzimáticos han demostrado que la fosforilación en tirosinas es un proceso íntimamente involucrado en la activación de la PI3K por Fe^{2+} . Diversos estudios han demostrado la participación de la quinasa Src en el proceso de activación de Akt por fosforilación de sus residuos Tyr315 y Tyr326; se considera que ambas fosforilaciones preceden a las descritas para los residuos Ser473 y Thr308 [80]. Se atribuye a la quinasa Src la capacidad de fosforilar ambos residuos tirosinas [80]. El mecanismo propuesto indica que Akt translocaría a la membrana plasmática como consecuencia de la activación de la PI3K, y allí quedaría disponible para la fosforilación por parte de Src en primera instancia, y por PDK1 y PDK2, luego. En nuestro sistema experimental se ha demostrado la asociación (por coimmunoprecipitación) entre Akt y Src, y no se han hallado diferencias en los niveles de asociación de ambas quinasas entre los sinaptosomas sometidos al insulto oxidativo y los controles. Sin embargo, se ha comprobado que la fracción de Akt fosforilada en Ser473 asociada a Src es notablemente mayor en la condición expuesta al estrés oxidativo. Este hallazgo podría denotar que frente a la injuria oxidativa el mecanismo de transducción de la señal corriente abajo de la PI3K involucra a la quinasa Src, la cual podría asociarse a Akt y catalizar la fosforilación en tirosinas de la misma en forma previa a la fosforilación en Ser473, o coincidentemente con ella.

Las especies reactivas de oxígeno son consideradas un factor clave en el proceso de envejecimiento del sistema nervioso. En relación al cerebro y el envejecimiento, han sido reportados varios cambios que contribuirían al deterioro de las funciones sinápticas, por ejemplo: cambios en

la fluidez de la membrana plasmática neuronal, en la homeostasis del calcio y en la señalización intracelular [81,82]. Varios estudios han sugerido que el deterioro en el funcionamiento mitocondrial como consecuencia del estrés oxidativo es el principal contribuyente a las alteraciones cerebrales asociadas con la edad [83,84]. En este sentido, las mitocondrias cerebrales de individuos seniles son particularmente vulnerables a la peroxidación lipídica, debido al alto consumo de oxígeno que presentan, asociado a su elevado contenido de ácidos grasos poliinsaturados; a esto se suma una deficiente defensa antioxidante y un alto contenido de metales de transición cerebrales. Por todo esto, se ha investigado el efecto del estrés oxidativo inducido por Fe^{2+} en terminales sinápticas de corteza cerebral de ratas seniles y se ha comparado con el observado en los sinaptosomas de animales adultos. En este caso, se ha encontrado que tanto la capacidad reductora normal de las mitocondrias como la integridad de la membrana sinaptosomal se ven deterioradas (al igual que lo hallado en los adultos) significativamente luego de incubar los sinaptosomas en presencia de Fe^{2+} durante los tres tiempos estudiados. Por lo tanto, también para las terminales sinápticas seniles los tiempos cortos de exposición (5 minutos) son suficientes para la aparición de los primeros signos de injuria oxidativa. Lo interesante de estos resultados es que frente a las exposiciones intermedia y prolongada, las terminales sinápticas seniles han demostrado ser mucho más vulnerables a los efectos del Fe^{2+} que las adultas, tanto en términos de viabilidad mitocondrial como en lo atinente a la integridad de la membrana plasmática sinaptosomal. Este hecho podría explicar parcialmente el signo patognomónico de varios desórdenes neurodegenerativos asociados al envejecimiento que cursan con estrés oxidativo: la pérdida masiva de las terminales sinápticas.

De manera similar a lo observado en animales adultos, la fosforilación de Akt en Ser473 se ve aumentada luego de 5 minutos de exposición al insulto oxidativo, pero a diferencia de los resultados obtenidos en animales adultos, esta activación persiste hasta los 30 minutos. Del mismo modo, la inactivación de GSK3 β no solamente coincide temporalmente con la estimulación de la PI3K sino que además es dependiente de la misma [77].

Al investigar la participación de la quinasa Src en el proceso de fosforilación de Akt, se ha encontrado que el mecanismo de activación de esta difiere del hallado en los adultos: Akt no aumenta su asociación a la quinasa Src para lograr su activación en condiciones de estrés oxidativo, sino que tanto los niveles de Akt como aquellos de p Akt asociados a Src son equivalentes en ambas

condiciones: sinaptosomas controles y sinaptosomas expuestos al metal. Estas observaciones sugieren que el proceso de activación de Akt en respuesta al insulto oxidativo en las terminales sinápticas de animales seniles podría ser diferente (a nivel del mecanismo operante) al que ocurre en las terminales sinápticas de animales adultos.

La activación de Akt frente al Cu^{2+} ha sido observada a tiempos de exposición más prolongados que la observada frente al Fe^{2+} . De estos datos puede concluirse que pequeñas variaciones en la exposición de las terminales sinápticas a diferentes metales de transición (tal es el caso de las enfermedades neurodegenerativas que cursan con una desregulación de la homeostasis de este tipo de metales) pueden conducir a la activación de distintas vías de señalización responsables de llevar adelante las funciones necesarias para contrarrestar los efectos sufridos.

Generación de lípidos bioactivos a partir de la fosfatidilcolina en terminales sinápticas expuestas a injuria oxidativa por metales de transición

Resultados de nuestro laboratorio demostraron por primera vez la presencia de la PC-PLC en las terminales sinápticas de la corteza cerebral de la rata. Mediante la utilización de etanol como marcador de la actividad de la PLD se demostró que en los sinaptosomas tanto la vía PLD/LPP como la PC-PLC contribuyen a la generación de DAG a partir de la PC [85]. En presencia de alcoholes primarios la PLD cataliza una reacción de transfosfatidilación formando, en nuestro caso, fosfatidiletanol (PEth). La propiedad de catalizar esta reacción de transfosfatidilación, única de la PLD, hace del etanol (y de otros alcoholes primarios) una herramienta sumamente confiable y específica para discriminar el origen del DAG producto de la hidrólisis de la PC. Dado que el PEth no puede ser hidrolizado por las LPPs, la utilización etanol permite evaluar la generación de DAG proveniente de la vía PC-PLC [85-90].

En las terminales sinápticas de la corteza cerebral de la rata se estudió también el efecto del D609. Esta sal de xantato que posee propiedades antivirales y antitumorales, ha sido aceptado y utilizado como inhibidor de la PC-PLC en diversos sistemas tales como células de astrocitoma, macrófagos y "Natural Killers" entre otros [70, 74, 91, 92]. En nuestro modelo experimental el D609 inhibió la generación de DAG en la misma magnitud que la observada en presencia de etanol, corroborando el aporte de la vía PC-PLC [85].

Aunque la estructura de la PC-PLC en células eucariotas no se conoce todavía, Clark y colaboradores demostraron que los anticuerpos

dirigidos contra la enzima de *Bacillus cereus* también reaccionaba específicamente con una proteína con actividad PC-PLC presente en monocitos humanos [93]. Utilizando un suero policlonal anti-PC-PLC dirigido contra la enzima de *Bacillus cereus* pudimos observar en los sinaptosomas la presencia de dos bandas muy próximas de un peso molecular cercano a 66 kDa, tanto en las terminales sinápticas de ratas adultas como de ratas seniles [85,88]. Resultados similares fueron obtenidos en fibroblastos NIH 3T3 y en subpoblaciones de linfocitos B periféricos. En estas células se observó una banda de 66 kDa utilizando también un Ac policlonal anti-PC-PLC de *B. cereus* [72, 94, 95].

Por otra parte, la actividad PC-PLC se localizó en la fracción de la membrana plasmática sinaptosomal, siendo prácticamente indetectable en la fracción soluble [85]. Recientemente demostramos una localización diferencial de las isoformas de la PLD y de la PC-PLC en dominios de la membrana sinaptosomal resistentes a detergentes, DRMs [88]. Estos dominios DRMs presentaron características de "rafts" de membrana o balsas lipídicas, tales como el enriquecimiento en esfingomielina y colesterol y en proteínas marcadoras de "rafts" como caveolina, c-Src y flotilina. Además, las DRMs presentaron especies moleculares de fosfolípidos con una marcada disminución en el contenido de ácidos grasos poliinsaturados, con respecto a la composición de los sinaptosomas enteros [88].

Los microdominios tipo "rafts" y las caveolas son capaces de compartimentalizar diversos procesos celulares, tales como la adhesión celular, el tráfico intracelular y los eventos de transducción de señales, ya que facilitan la formación de complejos proteicos y la activación de vías de señalización específicas [96-98]. En nuestro modelo experimental observamos una distribución diferencial de las enzimas capaces de hidrolizar la PC: mientras que las DRMs (provenientes tanto de sinaptosomas de animales adultos como seniles) se encontraron enriquecidas en PC-PLC y en la isoforma PLD1, la PLD2 fue excluida de estos microdominios. Sin embargo, la generación de DAG a partir de la PC en las DRMs provino exclusivamente de la vía PC-PLC, sin evidenciarse la reacción de transfosfatidilación de la PLD, a pesar de encontrarse estos dominios enriquecidos en la isoforma PLD1 [88]. Esto sugiere que la localización de la PLD1 en las DRMs podría constituir un mecanismo de regulación de la actividad de esta isoforma.

Resultados nuestros demostraron por primera vez que el daño oxidativo inducido por FeSO_4 estimula fuertemente la generación de

DAG a partir de la PC, tanto en las terminales sinápticas de la corteza cerebral de ratas adultas como en los sinaptosomas de ratas seniles. Mediante la utilización del etanol y la medición de PEth, demostramos que tanto la vía de la PC-PLC como la vía de la PLD/LPP participan en la generación del DAG inducida bajo condiciones de estrés oxidativo [87]. Ambas vías generadoras de DAG a partir de la PC fueron estimuladas por el Fe^{2+} luego de tiempos cortos de incubación y permanecieron activadas al menos por 60 min, cuando el efecto dañino del hierro se evidenciaba ya a nivel mitocondrial y por la pérdida de la integridad de la membrana.

Con anterioridad a nuestros hallazgos prácticamente no existían reportes acerca de la activación de la PC-PLC en condiciones de injuria oxidativa en el sistema nervioso central y son muy escasos los antecedentes publicados en otros sistemas. En la línea celular de hipocampo de ratón (HT22) se reportó la participación de la actividad PC-PLC en la muerte celular inducida por glutamato. En esta forma de muerte celular conocida como "toxicidad oxidativa del glutamato" las concentraciones elevadas de glutamato interfieren con la captación de cisteína a través del antiportador de cisteína/glutamato lo que lleva a la depleción intracelular de glutatión [99].

Zhao y colaboradores relacionaron la formación de DAG por la vía de la PC-PLC y la generación de especies reactivas de oxígeno en la diferenciación de células del blastodisco de pollo a células endoteliales vasculares [100]. En macrófagos alveolares se demostró que la sílica induce la producción de H_2O_2 con la subsiguiente activación de la PC-PLC [74]. Por otra parte, se ha reportado que el inhibidor de la enzima y antioxidante, D609, es capaz de proteger a las neuronas en cultivo y a los sinaptosomas del daño oxidativo producido por el A β [101, 102].

A diferencia de la PC-PLC, la activación de la PLD ha sido ampliamente estudiada en situaciones de estrés oxidativo y se encontró una actividad aumentada de esta enzima en los cerebros *post mortem* de pacientes con la enfermedad de Alzheimer [103]. En células de neuroblastoma humano se reportó que el péptido A β (25-35) induce la activación de la PLD, esta activación fue independiente del Ca^{2+} pero dependiente de la fosforilación en tirosinas y de la actividad de la PKC [104]. También en neuronas de hipocampo de rata el péptido A β (1-40) indujo la activación de la PLD, la cual fue acompañada de un aumento en la liberación de LDH [105] mientras que en células PC12 la actividad de la PLD se estimuló por el tratamiento con H_2O_2 [106, 107]. Sin embargo, no se conoce aun con certeza si la activación de la

PLD es parte de la cascada patológica del Alzheimer o si constituye una vía de rescate celular.

Asimismo, se demostró que el H_2O_2 estimula a la PLD en astrocitos de cerebro de rata [108] y se observó un aumento de esta enzima en los astrocitos tras el daño de la espina dorsal de rata producido por compresión [109]. Luego de la isquemia cerebral también se reportó un aumento masivo en la expresión de la PLD1 en astrocitos reactivos de hipocampo, este aumento en la actividad de la PLD aparentemente acompaña la astrogliosis y la remodelación del tejido luego de la injuria lo que sugiere un posible rol neuroprotectivo de la enzima [50,110].

La participación de la PLD en situaciones de injuria oxidativa también se describió en cardiomiocitos [111, 112], así como también en células de músculo liso vascular y en células endoteliales de aorta [109, 113]. Sin embargo, nuestros resultados constituyen la primera evidencia de la activación de la PLD en respuesta al estrés oxidativo en la terminal sináptica de la corteza cerebral de rata [87].

Por otra parte, la activación de las fosfolipasas A2 (PLA $_2$) por el estrés oxidativo también es considerada una de las principales causas subyacentes en patologías como la enfermedad de Alzheimer, la isquemia cerebral y la esclerosis múltiple [114-117]. Estas enzimas clivan el ácido graso esterificado en la posición sn-2 de los glicerofosfolípidos para generar ácidos grasos libres y lisofosfolípidos. Esta reacción es de particular importancia cuando el ácido graso liberado es el araquidónico, dado que éste puede ser metabolizado por las ciclooxigenasas y las lipooxigenasas generando eicosanoides bioactivos como las prostaglandinas, los leucotrienos y los tromboxanos.

La peroxidación lipídica en membranas y lipoproteínas es un fenómeno común que se presenta luego de un evento de estrés oxidativo. La peroxidación de lípidos bajo condiciones normales ocurre y se halla controlada por diversas maquinarias que posee la célula, pero puede verse incrementada cuando la producción de radicales libres y otros prooxidantes supera la capacidad antioxidante que posee la célula. Cualquier modificación oxidativa de los PL, ya sea enzimática o no, es deletérea para la célula. El mejor modo de subsanar este hecho es clivar el PL peroxidado y reemplazarlo por uno nuevo. Los PL de membrana poseen AG poliinsaturados fundamentalmente en la posición sn-2, y estos son los más susceptibles de sufrir lipooxidación o peroxidación lipídica, por lo que la PLA $_2$ es la enzima mejor diseñada para reparar el error.

Apoyando esta hipótesis está el ejemplo de la glutatión peroxidasa, la cual puede detoxi-

ficar efectivamente de los AG peroxidados, pero solo luego de que los mismos han sido liberados por la PLA₂ [118]. La iPLA₂ se cree que protege a la membrana del retículo endoplásmico (RE) de la peroxidación lipídica inducida por estrés oxidativo [118]. A su vez, la RE-iPLA₂ es inactivada por los agentes oxidantes mediante un mecanismo que involucra la oxidación en grupos sulfhidrilo, dando origen a un círculo vicioso que aumenta cada vez más el nivel de daño [119].

Cerca de veinte isoformas de la PLA₂ han sido identificadas en varios tejidos de mamíferos [120]. Estas enzimas, ubicuas en neuronas y en células gliales, han sido clasificadas en tres familias según su requerimiento de Ca²⁺: las independientes de Ca²⁺ (iPLA₂) y entre las PLA₂ dependientes de Ca²⁺ se encuentran las citosólicas (cPLA₂) y las extracelulares o secretadas (sPLA₂) [115]. Las cPLA₂ requieren Ca²⁺ para su translocación a la membrana y poseen preferencia por fosfolípidos que contiene AA mientras que las iPLA₂ no presentan especificidad por ninguna especie molecular de los diferentes fosfolípidos [121].

Se demostró que las PLA₂ citosólicas pueden ser activadas por compuestos oxidantes como el H₂O₂ o la menadiona [122,123]. También se reportó la activación de la PLA₂ en células piramidales de hipocampo sometidas a situaciones de privación de glucosa y de oxígeno. Mediante la utilización de inhibidores para las diferentes PLA₂, se demostró que la isoforma responsable de este aumento de actividad en las células de hipocampo era una cPLA₂ [124]. En modelos de isquemia cerebral global se reportó que tanto la actividad como la expresión de las cPLA₂ aumentan significativamente luego de 20 min, así como también aumenta su actividad en neuronas corticales expuestas al fragmento 1-42 del péptido A α [125,126].

Sin embargo, en nuestro modelo experimental la liberación de ácidos grasos libres se vio significativamente inhibida en los sinaptosomas expuestos al Fe²⁺ [87]. Nuestro resultado difiere del reportado en otros sistemas y esto podría deberse a la inhibición de una fosfolipasa A independiente de calcio en las condiciones de estrés oxidativo. Otro factor determinante podría ser la naturaleza saturada del sustrato utilizado para los ensayos enzimáticos, la dipalmitoil PC (DPPC). Este tipo de sustrato solo nos permite evaluar la actividad de las isoformas de PLA con afinidad por fosfolípidos de composición saturada.

Entre los eventos de aparición temprana en los procesos que involucran estrés oxidativo se encuentra la fosforilación en tirosinas de diversas proteínas. Sin embargo, la generación de DAG a

partir de la PC en nuestro modelo experimental no fue modificada por la coincubación con inhibidores de tirosinas quinasas (genisteína y herbimicina A) ni por el inhibidor de la enzima PI3K (LY294002). Estos resultados indican que la activación de las vías de la PC-PLC y de la PLD en nuestras condiciones experimentales se produce por un mecanismo diferente e independiente, tanto de la activación de tirosinas quinasas como de la enzima PI3K y su efector corriente abajo, Akt [87].

Las diferencias en los mecanismos que llevan a la activación de la PLD en condiciones de estrés oxidativo (como la dependencia o no de la fosforilación en tirosinas así como también el requerimiento o no de calcio), demuestran que las vías de señalización involucradas en la activación de esta fosfolipasa pueden variar dependiendo del tipo celular y del inductor de la injuria oxidativa en estudio.

Cuando evaluamos la hidrólisis de la PC en los sinaptosomas de animales seniles sometidos a injuria oxidativa se obtuvieron los mismos resultados que los observados en individuos adultos, la formación de DAG se vio estimulada por el Fe²⁺ en la misma proporción que en los sinaptosomas de las ratas adultas y la generación de AGL se inhibió también a los mismos niveles observados en animales adultos. Sin embargo, la inhibición de la PIP₂-PLC en individuos adultos disminuyó significativamente la formación de DAG luego de 5 y de 60 min de incubación con el Fe²⁺, mientras que en individuos seniles el tratamiento con el U73122 solo disminuyó los niveles de DAG luego de 5 min de incubación con el hierro. Estos resultados indican que, si bien el efecto final de la injuria oxidativa en la hidrólisis de la PC es equivalente en los sinaptosomas de las ratas adultas y seniles, existen diferencias en la regulación de estas vías enzimáticas generadoras de DAG a partir de la PC por parte de la vía de la PIP₂-PLC [87].

Experimentos recientemente realizados indicaron que en los sinaptosomas sometidos a estrés oxidativo inducido por el Fe²⁺ la fracción DRM es altamente resistente a la peroxidación lipídica, evaluada como la generación de malondialdehído (MDA) (Datos nuestros aún no publicados). Esto es consistente con la composición en ácidos grasos más saturados de dichos microdominios con respecto a la composición de los sinaptosomas. Además, en la fracción DRM obtenida a partir de terminales sinápticas sometidas a injuria oxidativa, no se observó un incremento en la generación de DAG en comparación a las DRMs de la situación control. Los mismos resultados se observaron en las DRMs obtenidas de animales seniles (Datos nuestros aún no publicados).

Estos nuevos datos sugieren que el pool de la PC-PLC localizado en la fracción DRM sería insensible al estrés oxidativo, ya sea por la existencia de una relación directa entre la

peroxidación lipídica y la activación de la enzima o por la ausencia en dichos microdominios de otras proteínas de señalización involucradas en la activación de la PC-PLC en condiciones de estrés

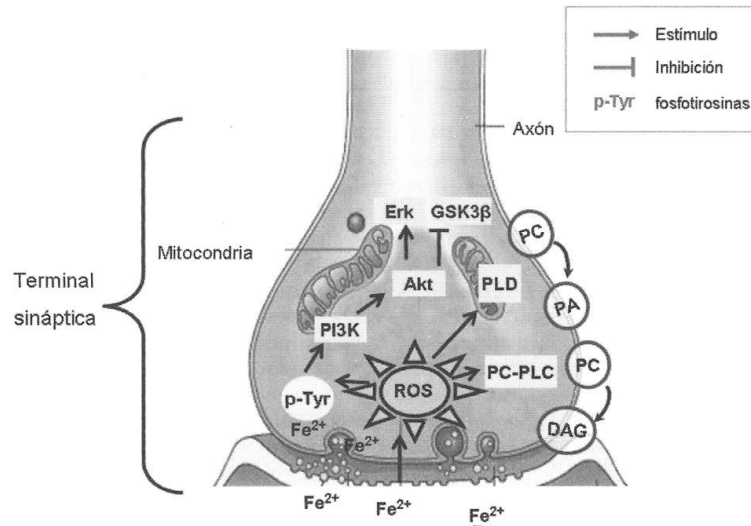


Fig. 1. Activación de vías de señalización por estrés oxidativo en la terminal sináptica. Esquema representativo de la activación, por injuria oxidativa inducida por Fe^{2+} , de vías de señalización que involucran segundos mensajeros lipídicos en la terminal sináptica de la corteza cerebral de la rata.

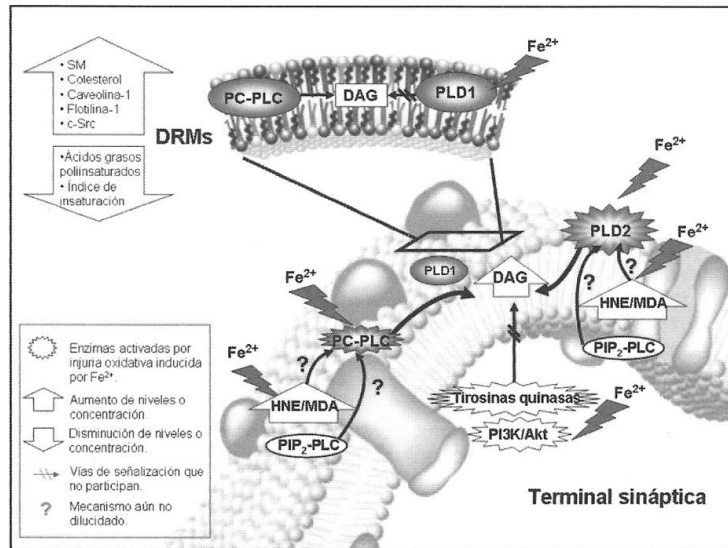


Fig. 2. Localización y activación diferencial por estrés oxidativo de las enzimas de hidrólisis de la PC. Esquema representativo de la localización diferencial de las enzimas de hidrólisis de la PC en la membrana sináptica y en microdominios de la misma resistentes a detergentes.

oxidativo. Asimismo los resultados sugieren que, en nuestras condiciones experimentales, la activación por injuria oxidativa en los sinaptosomas de la vía PLD/LPP involucraría la isoforma PLD2, la cual es excluida de la fracción DRM (Datos nuestros aún no publicados).

Conclusiones Finales

Nuestros resultados demuestran la susceptibilidad de las terminales sinápticas al estrés oxidativo disparado por un exceso de metales de transición. Asimismo, demostramos que durante el proceso de insulto oxidativo se activan diversas vías de señalización sináptica que involucran la generación de lípidos bioactivos (Figura 1). La activación de dichas vías de señalización es dependiente tanto del grado de injuria oxidativa como de la localización de las enzimas participantes en microdominios especializados de membrana (Figura 2). Estos hallazgos constituyen un potencial punto de partida para la búsqueda de nuevas herramientas terapéuticas en los procesos neurodegenerativos originados por injuria oxidativa.

Referencias

- [1] D. Berg, M.B. Youdim, *Top. Magn Reson. Imaging* **17**, 5 (2006).
- [2] D.A. Butterfield, S.M. Yatin, S. Varadarajan & T. Koppal, *Methods Enzymol.* **309**, 746 (1999).
- [3] Y. Christen, *Am. J. Clin. Nutr.* **71**, 621S (2000).
- [4] A. Saito, C.M. Maier, P. Narasimhan, T. Nishi, Y.S. Song, F. Yu, J. Liu, Y.S. Lee, C. Nito, H. Kamada, R.L. Dodd, L.B. Hsieh, B. Hassid, E.E. Kim, M. Gonzalez & P.H. Chan, *Mol. Neurobiol.* **31**, 105 (2005).
- [5] M.A. De La Paz, R.E. Anderson, *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* **33**, 2091 (1992).
- [6] C.M. Ethen, C. Reilly, X. Feng, T.W. Olsen & D.A. Ferrington, *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* **48**, 3469 (2007).
- [7] J.L. Dunaief, *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* **47**, 4660 (2006).
- [8] D. Berg, M. Gerlach, M.B. Youdim, K.L. Double, L. Zecca, P. Riedgerer & G. Becker, *J. Neurochem.* **79**, 225 (2001).
- [9] Y. Ke, Z.M. Qian, *Prog. Neurobiol.* **83**, 149 (2007).
- [10] J.N. Keller, R.J. Mark, A.J. Bruce, E. Blanc, J.D. Rothstein, K. Uchida, G. Waeg & M.P. Mattson, *Neuroscience* **80**, 685 (1997).
- [11] J.N. Keller, Z. Pang, J.W. Geddes, J.G. Begley, A. Germeyer, G. Waeg & M.P. Mattson, *J. Neurochem.* **69**, 273 (1997).
- [12] R.J. Mark, K. Hensley, D.A. Butterfield & M.P. Mattson, *J. Neurosci.* **15**, 6239 (1995).
- [13] C. Quintana, S. Bellefqih, J.Y. Laval, J.L. Guerin-Kern, T.D. Wu, J. Avila, I. Ferrer, R. Arranz & C. Patino, *J. Struct. Biol.* **153**, 42 (2006).
- [14] R.J. Castellani, K. Honda, X. Zhu, A.D. Cash, A. Nunomura, G. Perry & M.A. Smith, *Ageing Res. Rev.* **3**, 319 (2004).
- [15] G.J. Brewer, *J. Am. Coll. Nutr.* **28**, 238 (2009).
- [16] S. Mandel, G. Maor & M.B. Youdim, *J. Mol. Neurosci.* **24**, 401 (2004).
- [17] D.A. Butterfield, J. Kanski, *Mech. Ageing Dev.* **122**, 945 (2001).
- [18] A. Gaeta, R.C. Hider, *Br. J. Pharmacol.* **146**, 1041 (2005).
- [19] M.A. Lovell, J.D. Robertson, W.J. Teesdale, J.L. Campbell & W.R. Markesbery, *J. Neurol. Sci.* **158**, 47 (1998).
- [20] W.Y. Ong, A.A. Farooqui, *J. Alzheimers. Dis.* **8**, 183 (2005).
- [21] M.P. Mattson, J.N. Keller & J.G. Begley, *Exp. Neurol.* **153**, 35 (1998).
- [22] M.K. Meffert, J.M. Chang, B.J. Wiltgen, M.S. Fanselow & D. Baltimore, *Nat. Neurosci.* **6**, 1072 (2003).
- [23] Z.H. Guo, M.P. Mattson, *Cereb. Cortex* **10**, 50 (2000).
- [24] M.P. Mattson, *Methods Enzymol.* **309**, 733 (1999).
- [25] K.E. Cosker, B.J. Eickholt, *Biochem. Soc. Trans.* **35**, 207 (2007).
- [26] M. gado-Esteban, D. Martin-Zanca, L. ndres-Martin, A. Almeida & J.P. Bolanos, *J. Neurochem.* **102**, 194 (2007).
- [27] S.H. Koh, S.H. Kim, H. Kwon, J.G. Kim, J.H. Kim, K.H. Yang, J. Kim, S.U. Kim, H.J. Yu, B.R. Do, K.S. Kim & H.K. Jung, *Neurotoxicology* **25**, 793 (2004).
- [28] G.M. Leininger, C. Backus, M.D. Uhler, S.I. Lentz & E.L. Feldman, *FASEB J.* **18**, 1544 (2004).
- [29] A.I. Rojo, M.R. Sagarra & A. Cuadrado, *J. Neurochem.* **105**, 192 (2008).
- [30] Y. Wang, A. Cheng & M.P. Mattson, *Neuromolecular. Med.* **8**, 329 (2006).
- [31] A. Brunet, A. Bonni, M.J. Zigmund, M.Z. Lin, P. Juo, L.S. Hu, M.J. Anderson, K.C. Arden, J. Blenis & M.E. Greenberg, *Cell* **96**, 857 (1999).
- [32] M.H. Cardone, N. Roy, H.R. Stennicke, G.S. Salvesen, T.F. Franke, E. Stanbridge, S. Frisch & J.C. Reed, *Science* **282**, 1318 (1998).
- [33] J.R. Woodgett, P.S. Ohashi, *Nat. Immunol.* **6**, 751 (2005).
- [34] T. Yamamoto, F. Kambe, X. Cao, X. Lu, N. Ishiguro & H. Seo, *Bone* **40**, 354 (2007).
- [35] Y. Zhang, J. Zhang & G.P. Studzinski, *Cell Cycle* **5**, 447 (2006).
- [36] C. Barthelemy, C.E. Henderson & B. Pettmann, *BMC. Neurosci.* **5**, 48 (2004).
- [37] H. Cui, F. Cai & D.D. Belsham, *FASEB J.* **20**, 2654 (2006).
- [38] K. Hirai, T. Hayashi, P.H. Chan, J. Zeng, G.Y. Yang, V.J. Basus, T.L. James & L. Litt, *Brain Res. Mol. Brain Res.* **124**, 51 (2004).
- [39] K.M. Dhandapani, F.M. Wade, C. Wakade, V.B. Mahesh & D.W. Brann, *J. Neurochem.* **95**, 9 (2005).
- [40] M.M. Billah, J.C. Anthes, *Biochem. J.* **269**, 281 (1990).
- [41] Z. Cui, M. Houweling, *Biochim. Biophys. Acta* **1585**, 87 (2002).

- [42] J.H. Exton, *Biochim. Biophys. Acta* **1212**, 26 (1994).
- [43] R.M. Adibhatla, J.F. Hatcher, *Neurochem. Res.* **30**, 15 (2005).
- [44] D.A. Foster, L. Xu, *Mol. Cancer Res.* **1**, 789 (2003).
- [45] M.J. Wakelam, C.P. Briscoe, A. Stewart, T.R. Pettitt, M.J. Cross, A. Paul, J.M. Yule, S.D. Gardner & M. Hodgkin, *Biochem. Soc. Trans.* **21**, 874 (1993).
- [46] D.N. Brindley, *J. Cell Biochem.* **92**, 900 (2004).
- [47] S. Carrasco, I. Merida, *Trends Biochem. Sci.* **32**, 27 (2007).
- [48] S. Pyne, K.C. Kong & P.I. Darroch, *Semin. Cell Dev. Biol.* **15**, 491 (2004).
- [49] S. Pyne, J.S. Long, N.T. Ktistakis & N.J. Pyne, *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 1370 (2005).
- [50] J. Klein, *J. Neurochem.* **94**, 1473 (2005).
- [51] Q.J. Wang, *Trends Pharmacol. Sci.* **27**, 317 (2006).
- [52] W.C. Colley, T.C. Sung, R. Roll, J. Jenco, S.M. Hammond, Y. Altshuller, D. Bar-Sagi, A.J. Morris & M.A. Frohman, *Curr. Biol.* **7**, 191 (1997).
- [53] S.M. Hammond, J.M. Jenco, S. Nakashima, K. Cadwallader, Q. Gu, S. Cook, Y. Nozawa, G.D. Prestwich, M.A. Frohman & A.J. Morris, *J. Biol. Chem.* **272**, 3860 (1997).
- [54] P.M. Steed, K.L. Clark, W.C. Boyar & D.J. Lasala, *FASEB J.* **12**, 1309 (1998).
- [55] J.H. Exton, *FEBS Lett.* **531**, 58 (2002).
- [56] M. Liscovitch, M. Czarny, G. Fiucci & X. Tang, *Biochem. J.* **345 Pt 3**, 401 (2000).
- [57] S.J. Scales, R.H. Scheller, *Nature* **401**, 123 (1999).
- [58] M. Zeniou-Meyer, Y. Liu, A. Begle, M. Olanish, A. Hanauer, U. Becherer, J. Rettig, M.F. Bader & N. Vitale, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **105**, 8434 (2008).
- [59] Z. Freyberg, A. Siddhanta & D. Shields, *Trends Cell Biol.* **13**, 540 (2003).
- [60] J. Klein, V. Chalifa, M. Liscovitch & K. Loffelholz, *J. Neurochem.* **65**, 1445 (1995).
- [61] D. Zhao, M.A. Frohman & J.K. Blusztajn, *BMC. Neurosci.* **2**, 16 (2001).
- [62] K.M. Eyster, *Adv. Physiol. Educ.* **31**, 5 (2007).
- [63] K.Y. Hostetler, L.B. Hall, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **96**, 388 (1980).
- [64] Y. Matsuzawa, K.Y. Hostetler, *J. Biol. Chem.* **255**, 646 (1980).
- [65] E. Randell, H. Mulye, S. Mookerjee & A. Nagpurkar, *Biochim. Biophys. Acta* **1124**, 273 (1992).
- [66] R.G. Sheikhnejad, P.N. Srivastava, *J. Biol. Chem.* **261**, 7544 (1986).
- [67] E. Yavin, Y. Tanaka & S. Ando, *J. Neurosci. Res.* **24**, 241 (1989).
- [68] J. Zamorano, M.D. Rivas, A. Garcia-Trinidad, C.K. Qu & A.D. Keegan, *J. Immunol.* **171**, 4203 (2003).
- [69] J.L. Ho, B. Zhu, S. He, B. Du & R. Rothman, *J. Exp. Med.* **180**, 1457 (1994).
- [70] S. Cecchetti, F. Spadaro, L. Lugini, F. Podo & C. Ramoni, *Eur. J. Immunol.* **37**, 2912 (2007).
- [71] C. Ramoni, F. Spadaro, M. Menegon & F. Podo, *J. Immunol.* **167**, 2642 (2001).
- [72] F. Spadaro, S. Cecchetti, M. Sanchez, C.M. Ausiello, F. Podo & C. Ramoni, *Eur. J. Immunol.* **36**, 3277 (2006).
- [73] L. Fantuzzi, F. Spadaro, C. Purificato, S. Cecchetti, F. Podo, F. Belardelli, S. Gessani & C. Ramoni, *Blood* **111**, 3355 (2008).
- [74] H. Liu, H. Zhang & H.J. Forman, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **36**, 594 (2007).
- [75] R.M. Uranga, M.V. Mateos, N.M. Giusto & G.A. Salvador, *J. Neurosci. Res.* **85**, 2924 (2007).
- [76] H. Esterbauer, R.J. Schaur & H. Zollner, *Free Radic. Biol. Med.* **11**, 81 (1991).
- [77] R.M. Uranga, N.M. Giusto & G.A. Salvador, *Toxicol. Sci.* **111**, 331 (2009).
- [78] A. Barnea, G. Cho, *Endocrinology* **115**, 936 (1984).
- [79] Y. Luo, T. Sunderland & B. Wolozin, *J. Neurochem.* **67**, 978 (1996).
- [80] T. Jiang, Y. Qiu, *J. Biol. Chem.* **278**, 15789 (2003).
- [81] G. Calderini, A.C. Bonetti, A. Battistella, F.T. Crews & G. Toffano, *Neurochem. Res.* **8**, 483 (1983).
- [82] T.C. Foster, A. Kumar, *Neuroscientist.* **8**, 297 (2002).
- [83] R.A. Floyd, K. Hensley, *Neurobiol. Aging* **23**, 795 (2002).
- [84] A. Navarro, A. Boveris, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **287**, R1244 (2004).
- [85] M.V. Mateos, R.M. Uranga, G.A. Salvador & N.M. Giusto, *Lipids* **41**, 273 (2006).
- [86] M. Kobayashi, J.N. Kanfer, *J. Neurochem.* **48**, 1597 (1987).
- [87] M.V. Mateos, R.M. Uranga, G.A. Salvador & N.M. Giusto, *Neurochem. Int.* **53**, 199 (2008).
- [88] M.V. Mateos, G.A. Salvador & N.M. Giusto, *Biochim. Biophys. Acta* **1798**, 624 (2010).
- [89] Y. Nozawa, *Biochim. Biophys. Acta* **1585**, 77 (2002).
- [90] G.A. Salvador, M.G. Ilincheta de Boschero, S.J. Pasquare & N.M. Giusto, *J. Neurosci. Res.* **81**, 244 (2005).
- [91] J. Cuschieri, J. Billgren & R.V. Maier, *J. Leukoc. Biol.* **80**, 407 (2006).
- [92] H. Kobayashi, S. Honma, N. Nakahata & Y. Ohizumi, *J. Neurochem.* **74**, 2167 (2000).
- [93] M.A. Clark, R.G. Shorr & J.S. Bomalaski, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **140**, 114 (1986).
- [94] F. Podo, A. Ferretti, A. Knijn, P. Zhang, C. Ramoni, B. Barletta, C. Pini, S. Baccarini & S. Pulciani, *Anticancer Res.* **16**, 1399 (1996).
- [95] C. Ramoni, F. Spadaro, B. Barletta, M.L. Dupuis & F. Podo, *Exp. Cell Res.* **299**, 370 (2004).
- [96] J.B. Helms, C. Zurzolo, *Traffic.* **5**, 247 (2004).
- [97] L.J. Pike, *J. Lipid Res.* **47**, 1597 (2006).
- [98] K. Simons, D. Toomre, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 31 (2000).
- [99] Y. Li, P. Maher & D. Schubert, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 7748 (1998).
- [100] J. Zhao, B. Zhao, W. Wang, B. Huang, S. Zhang & J. Miao, *J. Cell Biochem.* **102**, 421 (2007).
- [101] M. Perluigi, G. Joshi, R. Sultana, V. Calabrese, M.C. De, R. Coccia & D.A. Butterfield, *Neuroscience* **138**, 1161 (2006).

- [102] R. Sultana, S. Newman, H. Mohmmad-Abdul, J.N. Keller & D.A. Butterfield, *Free Radic. Res.* **38**, 449 (2004).
- [103] J.N. Kanfer, I.N. Singh, J.W. Pettegrew, D.G. McCartney & G. Sorrentino, *J. Lipid Mediat. Cell Signal.* **14**, 361 (1996).
- [104] I.N. Singh, G. Sorrentino & J.N. Kanfer, *Neurochem. Res.* **23**, 1225 (1998).
- [105] D.A. Cox, M.L. Cohen, *Neurosci. Lett.* **229**, 37 (1997).
- [106] Y. Ito, S. Nakashima & Y. Nozawa, *J. Neurochem.* **69**, 729 (1997).
- [107] S.O. Oh, J.H. Hong, Y.R. Kim, H.S. Yoo, S.H. Lee, K. Lim, B.D. Hwang, J.H. Exton & S.K. Park, *J. Neurochem.* **75**, 2445 (2000).
- [108] J.M. Servitja, R. Masgrau, R. Pardo, E. Sarri & F. Picatoste, *J. Neurochem.* **75**, 788 (2000).
- [109] J. Kim, G. Min, Y.S. Bae & D.S. Min, *Exp. Mol. Med.* **36**, 103 (2004).
- [110] M.Y. Lee, S.Y. Kim, D.S. Min, Y.S. Choi, S.L. Shin, M.H. Chun, S.B. Lee, M.S. Kim & Y.H. Jo, *Glia* **30**, 311 (2000).
- [111] Y. Banno, K. Ohguchi, N. Matsumoto, M. Koda, M. Ueda, A. Hara, I. Dikic & Y. Nozawa, *J. Biol. Chem.* **280**, 16319 (2005).
- [112] P.S. Tappia, M.R. Dent & N.S. Dhalla, *Free Radic. Biol. Med.* **41**, 349 (2006).
- [113] C.M. Corl, Y.Z. Cao, Z.S. Cohen & L.M. Sordillo, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **302**, 610 (2003).
- [114] T.J. Cunningham, L. Yao, M. Oetinger, L. Cort, E.P. Blankenhorn & J.I. Greenstein, *J. Neuroinflammation.* **3**, 26 (2006).
- [115] A.R. Muralikrishna, J.F. Hatcher, *Free Radic. Biol. Med.* **40**, 376 (2006).
- [116] G.Y. Sun, J. Xu, M.D. Jensen & A. Simonyi, *J. Lipid Res.* **45**, 205 (2004).
- [117] G.Y. Sun, L.A. Horrocks & A.A. Farooqui, *J. Neurochem.* **103**, 1 (2007).
- [118] G.R. Kinsey, B.S. Cummings, C.S. Beckett, G. Saavedra, W. Zhang, J. McHowat & R.G. Schnellmann, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **327**, 287 (2005).
- [119] B.S. Cummings, A.K. Gelasco, G.R. Kinsey, J. McHowat & R.G. Schnellmann, *J. Am. Soc. Nephrol.* **15**, 1441 (2004).
- [120] A. Yamashita, K. Tanaka, R. Kamata, T. Kumazawa, N. Suzuki, H. Koga, K. Waku & T. Sugiura, *Biochim. Biophys. Acta* **1791**, 1011 (2009).
- [121] A.A. Caro, A.I. Cederbaum, *J. Biol. Chem.* **278**, 33866 (2003).
- [122] S. Samanta, M.S. Perkinson, M. Morgan & R.J. Williams, *J. Neurochem.* **70**, 2082 (1998).
- [123] J. Xu, S. Yu, A.Y. Sun & G.Y. Sun, *Free Radic. Biol. Med.* **34**, 1531 (2003).
- [124] K. Arai, Y. Ikegaya, Y. Nakatani, I. Kudo, N. Nishiyama & N. Matsuki, *Eur. J. Neurosci.* **13**, 2319 (2001).
- [125] I. Saluja, D. Song, M.H. O'Regan & J.W. Phillis, *Neurosci. Lett.* **233**, 97 (1997).
- [126] P.B. Shelat, M. Chalimoniuk, J.H. Wang, J.B. Strosznajder, J.C. Lee, A.Y. Sun, A. Simonyi & G.Y. Sun, *J. Neurochem.* **106**, 45 (2008).

Manuscrito recibido el 29 de marzo de 2010.

Aceptado el 30 de abril de 2010.