

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 417 062**

51 Int. Cl.:

**A61P 25/16** (2006.01)  
**A61P 25/28** (2006.01)  
**A61K 38/08** (2006.01)  
**C07K 14/47** (2006.01)  
**C07K 5/10** (2006.01)  
**C12N 15/113** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2004 E 04734525 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2013 EP 1626732**

54 Título: **Medios para prevenir y tratar la muerte celular y sus aplicaciones biológicas**

30 Prioridad:

**22.05.2003 FR 0306190**  
**16.12.2003 US 529697 P**  
**17.03.2004 US 553569 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**05.08.2013**

73 Titular/es:

**CHIESI FARMACEUTICI S.P.A. (100.0%)**  
**VIA PALERMO, 26/A**  
**43100 PARMA, IT**

72 Inventor/es:

**CHAUVIER, DAVID;**  
**BORGNE, ANNIE;**  
**JACOTOT, ETIENNE;**  
**LANGONNE, ALAIN;**  
**LECOEUR, HERVÉ y**  
**REBOUILLAT, DOMINIQUE**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 417 062 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Medios para prevenir y tratar la muerte celular y sus aplicaciones biológicas.

La invención se refiere a medios, procedimientos y productos para bloquear, prevenir o tratar la muerte celular, particularmente la muerte de las células neuronales.

- 5 La muerte de las células neuronales se produce durante la embriogénesis para eliminar el exceso de neuronas para garantizar conexiones pre y post sinápticas y permitir la formación de un cerebro adulto funcional.

Además de la muerte postmitótica relacionada con el envejecimiento normal, factores ambientales o mutacionales genéticos pueden inducir la muerte neuronal en el ser humano adulto durante lesiones agudas (por ejemplo, isquemia por hipoxia, ictus, lesión de médula espinal, traumatismo) o enfermedades neurodegenerativas crónicas.

- 10 La muerte celular asociada con estos trastornos puede producirse mediante tres mecanismos diferentes, que presentan características morfológicas y bioquímicas de necrosis, autofagia o apoptosis. A menudo las muertes neuronales tanto fisiológicas como patológicas están asociadas con una regulación defectuosa de la apoptosis y las rutas de señalización que conducen a este mecanismo suicida de células activo pueden dividirse en las rutas dependientes de proteasa específica de cisteinil aspartato (caspasa) frente a las independientes de caspasa en  
15 células de mamíferos.

- La apoptosis neuronal es un mecanismo suicida celular activo que puede dividirse en fases secuenciales, incluyendo iniciación, decisión, ejecución y degradación. Esta cascada de acontecimientos la dirige la activación de una maquinaria específica que implica tanto la activación de las proteasas específicas de aspartato dependientes de cisteína (caspasas) como las mitocondrias que pueden actuar como un orgánulo regulador (o amplificador) decisivo.  
20 De hecho, las alteraciones mitocondriales incluyen pérdida de gradiente electroquímico en la membrana interna mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) y la liberación de factores apoptogénicos tales como citocromo c, Smac/Diablo y el Factor Inductor de Apoptosis. Una vez liberados de la mitocondria, estos efectores desencadenan la desarticulación nuclear y citoplásmica independiente de caspasa y/o dependiente de caspasa. Por tanto, los factores mitocondriales combinados con caspasas contribuyen a la fase de degradación de la apoptosis, dando como resultado una  
25 contracción celular, condensación nuclear, emisión de cuerpos apoptóticos y aparición de señales "cómeme" tales como translocación de fosfatidilserinas en la lámina externa de la membrana plasmática. En ausencia de fagocitos, las células inmersas en apoptosis finalmente experimentan alteración de la membrana plasmática no específica denominada necrosis secundaria.

- 30 La construcción respectiva de las mitocondrias, caspasas y otros acontecimientos durante la apoptosis neuronal aún no está aclarada, particularmente con respecto a un acoplamiento de tipo inductor de muerte/celular determinado.

- Hasta hace poco, la apoptosis y necrosis de células neuronales se había investigado principalmente en dos tipos de estrategias: el primer grupo de técnicas (bioquímicas) evalúa acontecimientos tardíos de muerte neuronal generalmente por evaluación colorimétrica de la actividad mitocondrial succinato deshidrogenasa (ensayo MTT) o liberación extracelular de actividad lactato deshidrogenasa (ensayo LDH). Estas técnicas cuantitativas  
35 monoparamétricas rutinarias no proporcionan información en lo que respecta al mecanismo de la muerte celular y no pueden combinarse con la detección de otros procesos bioquímicos.

- Más recientemente, algunos protocolos de fraccionamiento celular adaptados a neuronas se publicaron para la evaluación bioquímica de translocación del citocromo c por inmunotransferencia y activación de caspasas utilizando sustratos fluorogénicos. Dichos procedimientos recientes proporcionan informaciones cuantitativas acerca de las poblaciones neuronales pero excluyen análisis multiparamétricos y en tiempo real. El segundo grupo de técnicas utilizan lecturas de microscopía de fluorescencia (FM) para detectar modificaciones de orgánulos o proteínas relacionadas con apoptosis. La mayoría de estos estudios de FM están centrados en alteraciones nucleares tardías incluyendo visualización de la morfología de la cromatina (tinción de Hoechst) y/o detección bioquímica de la fragmentación del ADN (ensayo TUNEL). En algunos estudios de FM recientes sobre neuronas, se publicó la inmunolocalización del citocromo c (en células fijas) pero a diferencia de otros campos de la biología celular, un número limitado de estudios sobre neuronas utilizó la detección *in situ* de alteraciones mitocondriales y activación de caspasa. Cuando se aplica a neuronas primarias cultivadas, los análisis basados en FM requieren mucho tiempo, son laboriosos y la cuantificación se ve dificultada por agregados de cuerpos celulares y solapamiento de redes neuríticas. Además, el fotoblanqueo de sondas fluorescentes sensibles podría conducir a interpretaciones erróneas drásticas y excluir el seguimiento en tiempo real de acontecimientos relacionados con la muerte temprana. Por tanto, las características de la biología celular de sucesos apoptóticos clave aún no se han documentado y ordenado completamente en neuronas primarias.  
50

El documento WO 02/34201 desvela el uso de un inhibidor de la apoptosis de pericitos retinales para prevenir y/o tratar la retinopatía diabética.

- 55 Los autores de la presente invención han desarrollado una estrategia complementaria y cuantitativa para analizar la dinámica de fenómenos de apoptosis útiles, particularmente, para neuronas corticales primarias o líneas celulares neuronales o líneas celulares no neuronales.

Dicha estrategia conduce a los autores de la presente invención a desarrollar un nuevo procedimiento para organizar y analizar los acontecimientos moleculares relacionados con la apoptosis. Para evaluar con este procedimiento la cronología y jerarquía de los acontecimientos relacionados con la apoptosis en las células neuronales, los autores de la invención han elaborado un modelo de muerte aguda experimental para determinar la comprobación reversible más próxima que interfiere con los procesos apoptóticos y han aplicado dicho procedimiento a este modelo. Ventajosamente, esta evaluación puede realizarse en células neuronales, líneas celulares neuronales así como células no neuronales y en líneas celulares no neuronales.

El objetivo de la invención es por tanto proporcionar un procedimiento analítico multiparamétrico y de plataforma de formación de imágenes para identificar la comprobación en la célula para impedir la muerte celular y para su uso para bloquear y prevenir la muerte celular.

Otro objetivo de la presente invención es que los inventores proporcionan procedimientos en tiempo real después de una o más marcas apoptóticas en neuronas o líneas celulares.

Otro objetivo de la invención es proporcionar nuevos compuestos que induzcan el silenciamiento génico de caspasa-2 (denominada también Nedd-2; Ich-1), o inhiban la actividad caspasa-2 proapoptótica (o interfieran con los procesos aguas abajo dependientes de caspasa-2).

Otro objetivo de la invención es proporcionar composiciones farmacéuticas y procedimientos de tratamiento de enfermedades y lesiones en los que esté implicada la caspasa-2.

El alcance de la invención está limitado por las reivindicaciones adjuntas.

En el presente documento se desvela un procedimiento para prevenir la muerte celular que comprende la determinación, dependiendo de un modo de inducción determinado, en un tipo celular determinado, de la jerarquía de los acontecimientos relacionados con la apoptosis y el bloqueo del control reversible más próximo para interferir con procesos apoptóticos.

Este procedimiento se realiza ventajosamente combinando la citometría de flujo cuantitativa rápida y la microscopía de fluorescencia cuantitativa/cualitativa en neuronas. También es ventajoso realizarlo en células no neuronales. Dicho procedimiento también puede usarse en líneas celulares neuronales.

El uso de estas dos tecnologías permite la co-detección de las fases de decisión, efectora, degradación temprana y tardía de apoptosis.

Como se ilustra en los ejemplos, la invención proporciona medios para desarrollar un control de citometría de flujo en tiempo real fiable de  $\Delta\Psi_m$  y membranas plasmáticas, granularidad morfológica nuclear y celular y cambios del tamaño celular en respuesta a daños neurotóxicos que incluyen tratamiento con MPTP.

Utilizando sondas fluorescentes no solapantes específicas, y/o anticuerpos específicos y/o agentes farmacológicos, la invención proporciona medios útiles que permiten estudiar la biología celular de la apoptosis y caracterizar nuevas moléculas protectoras.

Los autores de la presente invención utilizaron la privación de suero en cultivo neuronal como un modelo experimental para estudiar las rutas de la muerte neuronal e identificar puntos de control aguas arriba. Durante el desarrollo y patología neuronal, las neuronas que no encuentran dianas o metabolitos apropiados (oxígeno, glucosa, potasio, factores neurotróficos o de crecimiento, nutrientes) y fuentes de factores neurotróficos derivados de dianas experimentan muerte celular apoptótica (Deckwerth y col., 1996; Deshmuck y col., 1996 y 1998; Lipton, 1999; Plenisla y col., 2001; Chang y col., 2002).

Utilizando dicha plataforma analítica multiparamétrica y de formación de imágenes y estudiando la función selectiva de las caspasas (inhibición farmacológica; reducción de la expresión de genes de ARN de interferencia pequeño) en el contexto de privación de suero (SD) aguda en muerte celular neuronal inducida, los autores de la invención han encontrado que la caspasa 2 es un regulador aguas arriba de la MMP dependiente de Bax. Por consiguiente, la invención se refiere particularmente al procedimiento en el que el punto de control es caspasa 2. El término "caspasa" se usa en la descripción y en las reivindicaciones e incluye las diversas formas obtenidas mediante corte y empalme alternativo.

Como muestran los autores de la invención, la activación temprana con caspasa 2 se requiere para la translocación de Bax mitocondrial, modificación del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), activación dependiente de la liberación del citocromo c de las alteraciones nucleares de caspasa-9/caspasa-3, exposición a fosfatidilserina y permeabilización final de la membrana plasmática (PMP).

También se desvela que dicho punto de control es una caspasa.

También se desvela que dicho punto de control es una activación de caspasa no relacionada.

También se desvelan moléculas capaces de prevenir o bloquear la actividad caspasa 2 (y/o interacción caspasa-2/bax) para silenciar la expresión de caspasa-2 y composiciones farmacéuticas útiles para el tratamiento de enfermedades y lesiones en las que interviene la caspasa-2, particularmente para el tratamiento de lesiones de isquemia (por hipoxia).

5 También se desvelan inhibidores de caspasa-2 y un procedimiento para inhibir/silenciar la caspasa-2 en la muerte celular neuronal.

También se desvela que los inhibidores de caspasa-2 son moléculas de ARN bicatenario aisladas capaces de dirigir específicamente el ARNm de caspasa-2 para reducir o suprimir la expresión de caspasa-2.

10 También se desvela la reducción o supresión de la actividad de caspasa-2 en neuronas primarias o en líneas celulares neuronales especialmente de origen murino y humano.

También se desvela la reducción o supresión de la actividad de caspasa-2 mediante dichos inhibidores en células no neuronales, incluyendo células tumorales.

15 Las moléculas de ARN bicatenario utilizadas para silenciar la expresión de caspasa-2 son dúplex compuestos de cadenas complementarias de 15-25 nucleótidos, preferentemente 19-25 nucleótidos. Preferentemente, el extremo de las cadenas pequeñas interferentes está estabilizado contra la degradación.

Ventajosamente, el ARNip para el silenciamiento de la caspasa-2 comprende dúplex de SEC ID N°: 1 y SEC ID N°: 2 complementarias. Otros ARNip ventajosos comprenden dúplex de SEC ID N°: 6 y SEC ID N°: 7 complementarias.

20 También se desvela que los inhibidores de caspasa-2 que son ARNhp, es decir cualquier construcción ARNhp basada en las secuencias de ARNip como se ha definido anteriormente que conduce en la célula al silenciamiento de caspasa-2 en las células, particularmente en neuronas y líneas celulares.

También se desvelan construcciones de ARNhp que comprenden la inserción tanto de SEC ID N°: 1 como SEC ID N° 2 o tanto SEC ID N°: 6 como SEC ID N°: 7, o tanto SEC ID N°: 8 como SEC ID N°: 9 o tanto SEC ID N°: 10 y SEC ID N°: 11.

Dichos ARNip o ARNhp se obtienen mediante síntesis o se producen en la célula bicatenaria.

25 Como se ilustra en los ejemplos, la reducción de la expresión del gen basado en ARNip o ARNhp impide completamente la muerte neuronal cortical inducida por privación de suero.

La invención también se refiere a la síntesis de cada cadena de ARN, y la combinación de las cadenas para formar una molécula bicatenaria capaz de dirigir específicamente el ARNm de caspasa-2 en la célula.

30 Las moléculas de ARN sintetizadas se introducen en origen humano o animal o humano en condiciones para la expresión de caspasa-2 inhibidora. La etapa de introducción comprende el uso de vehículos adecuados o se realiza por inyección.

Como alternativa, se usan vectores que contienen la información genética para expresar dicho ARN. Dichos vectores también se encuentran dentro del alcance de la invención.

Los inhibidores de la invención bloquean la muerte celular de tipo apoptótico o necrótico o autofágico.

35 Los inventores también han desarrollado herramientas farmacológicas (inhibición directa de la actividad caspasa-2 mediante péptidos específicos, preferentemente pero no exclusivamente pentapéptidos) para atenuar *in vitro* la muerte celular mediada por caspasa-2. Dichas herramientas se desvelan en una solicitud pendiente de Estados Unidos provisional.

40 Dado que la escisión de Bax y la actividad de caspasa 2 se produce en la mitocondria aguas arriba en neuronas corticales inducidas para morir mediante privación de suero y que la inhibición de la actividad caspasa-2 conduce a la supervivencia a través de la inhibición de la escisión de Bax, esta etapa de regulación puede usarse por los inventores para desarrollar nuevas moléculas capaces de proteger a las células contra la muerte.

45 Como se ha mencionado anteriormente, los autores de la invención han demostrado que las rutas dependientes de caspasa-2 se requieren en modelos agudos de muerte neuronal *in vitro* y en ictus *in vivo*. Los autores de la invención también han demostrado que la inhibición específica de caspasa-2 es más eficaz para proteger neuronas *in vivo* en comparación con inhibición de caspasa de amplio espectro. Como se muestra en los ejemplos, la caspasa-2 es un punto de control principal aguas arriba para la inhibición de la muerte celular neuronal (especialmente apoptosis) en situaciones patológicas *in vivo*, incluyendo lesiones de isquemia por hipoxia (I-H).

50 Por tanto la invención también se refiere a la inhibición *in vitro* de la actividad caspasa-2 con la molécula que tiene la SEC ID N°: 5.

Esta es una molécula capaz de modificar la interacción entre Bax y caspasa-2 o impedir la escisión de Bax dependiente de caspasa-2.

También se desvelan péptidos que derivan de la secuencia Bax con una longitud de 3 a 40 aminoácidos incluyendo la secuencia IQD (por ejemplo: SEC ID 12-23). Las secuencias particularmente preferidas comprenden:

- 5 SEC ID N°: 12: KTGAFLQGFQDRAGRMAGETP
- SEC ID N°: 13: GAFLQGFQDRAGRMAGETP
- SEC ID N°: 14: FLLQGFQDRAGRMAGETP
- SEC ID N°: 15: LQGFQDRAGRMAGETP
- SEC ID N°: 16: GFQDRAGRMAGETP
- 10 SEC ID N°: 17: FIQDRAGRMAGETP
- SEC ID N°: 18: IQDRAGRMAGETP
- SEC ID N°: 19: IQDRAGRMAGE
- SEC ID N°: 20: IQDRAGRMA
- SEC ID N°: 21: IQDRAGR
- 15 SEC ID N°: 22: IQDRA
- SEC ID N°: 23: IQDR

20 También se desvela cualquier molécula capaz de modificar la interacción entre Bax y caspasa-2 o impedir la escisión de Bax dependiente de caspasa-2, combinada en el extremo N o extremo C con moléculas peptídicas o no peptídicas que producen moléculas quiméricas capaces de introducir células (después de un reconocimiento específico o no) para modificar la interacción entre la caspasa-2 y Bax.

También se desvelan moléculas combinadas en el extremo N o extremo C con moléculas peptídicas o no peptídicas productoras de moléculas quiméricas capaces de introducir células (después de reconocimiento específico o no) para prevenir o tratar la apoptosis o proporcionar efectos citoprotectores protectores de mitocondrias.

25 Otras moléculas peptídicas derivadas de moléculas capaces de modificar la interacción entre Bax y caspasa-2 o prevenir la escisión de Bax dependiente de caspasa-2 tiene una longitud de 3 a 10 aminoácidos incluyendo la secuencia IQD combinada en el extremo N o extremo C con marcadores (por ejemplo, fluorogénicos (AMC, AFC, PE...), colorimétricos (pNA...) o sustratos bioluminiscentes, radioisótopos...).

Este es otro objeto de la invención, proporcionar composiciones farmacéuticas que contengan inhibidores específicos de caspasa-2.

30 Las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un inhibidor de caspasa-2 como se ha definido anteriormente, en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La invención particularmente se refiere en particular a composiciones farmacéuticas que comprenden moléculas de ARNip o ARNhp tal como se ha definido anteriormente.

35 También se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad eficaz de la SEC ID N°: 5.

También se desvelan composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad eficaz de al menos una molécula capaz de modificar la interacción entre Bax y caspasa-2 o prevenir la escisión de Bax dependiente de caspasa-2, particularmente con respecto a los péptidos derivados de la secuencia Bax como se ha definido anteriormente, particularmente aquellos que tienen la secuencia SEC ID N°: 12 a SEC ID N°: 23 y las moléculas derivadas de las mismas.

40 Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención se pretenden ventajosamente para su administración mediante administración oral, local (intracerebroventricular, implante intracerebral de Gelfoam® impregnado con compuestos o composiciones farmacéuticas, implante intracerebral de instrumentación para administración mecánica, por ejemplo) o administración sistémica (por ejemplo: intraperitoneal, intravenosa...) para reducir la muerte celular.

45 La administración de los inhibidores que comprenden dúplex de ARN se realiza ventajosamente en línea con procedimientos clásicos para la introducción de un ácido nucleico en una célula diana.

La administración intraperitoneal de un inhibidor específico de caspasa-2 reduce fuertemente el tamaño del infarto en crías de rata sometidas a lesión cerebral de isquemia por hipoxia transitoria.

5 Dichas composiciones farmacéuticas son particularmente útiles para el tratamiento de la situación patológica que incluye lesiones de isquemia por hipoxia (I-H) (isquemia con o sin hipoxia/hipoglucemia) y situaciones de tipo ictus (insuficiencia cerebral, renal, cardíaca, por ejemplo).

También son de gran interés para el tratamiento de situaciones patológicas que incluyen isquemia por hipoxia cerebral (I-H) (lesiones de isquemia con o sin hipoxia/hipoglucemia) y situaciones de tipo ictus (insuficiencia cerebral, renal, cardíaca, por ejemplo).

10 Las composiciones farmacéuticas de la invención también son útiles para el tratamiento de muerte neuronal particularmente en lesiones I-H globales o focales (isquemia con o sin hipoxia/hipoglucemia) y situaciones de tipo ictus (insuficiencia cerebral, renal, cardíaco, por ejemplo).

También son particularmente ventajosas para el tratamiento de muerte neuronal particularmente en lesiones I-H en adultos o neonatal (isquemia con o sin hipoxia/hipoglucemia) y situaciones similares a ictus (insuficiencia cerebral, renal, cardíaca, por ejemplo).

15 También son útiles para el tratamiento de muerte neuronal particularmente en lesiones I-H en adultos o neonatales (isquemia con o sin hipoxia/hipoglucemia) y situaciones de tipo ictus (insuficiencia cerebral, renal, cardíaca, por ejemplo).

20 También pueden usarse para el tratamiento de muerte neuronal particularmente en lesiones I-H transitorias o permanentes (isquemia con o sin hipoxia/hipoglucemia) y en situaciones de tipo ictus (insuficiencia cerebral, renal, cardíaca, por ejemplo).

Dichas composiciones farmacéuticas también son útiles para el tratamiento de muerte neuronal particularmente lesiones I-H (isquemia con o sin hipoxia/hipoglucemia) y lesiones cerebrales en situaciones de tipo ictus con o sin situaciones por reperfusión (insuficiencia cerebral, renal, cardíaca, por ejemplo).

25 También pueden usarse para el tratamiento de muerte neuronal particularmente en Oclusión de la Arteria Cerebral Media (OACM).

Las composiciones farmacéuticas definidas anteriormente son de gran interés para el tratamiento de muerte neuronal particularmente cuando al menos uno o más de los siguientes sucesos patológicos se combinan: I-H (isquemia con o sin hipoxia/hipoglucemia) global o focal, transitoria o permanente, del adulto o neonatal a nivel cerebral, o a nivel de todo el organismo, con o sin reperfusión.

30 Otras aplicaciones de las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden su uso:

- para prevenir y/o tratar la apoptosis durante enfermedades degenerativas crónicas, por ejemplo, enfermedad neurodegenerativa, incluyendo enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, atrofia espinobulbar, enfermedad por priones o
- 35 - para prevenir y/o tratar la apoptosis durante lesiones de la médula espinal o para prevenir y/o tratar la apoptosis resultante de lesión cerebral traumática, o
- para proporcionar efecto neuroprotector, o
- para proporcionar efecto cerebroprotector, o
- para prevenir y/o tratar apoptosis mediada por linfocitos T citotóxicos y células citolíticas naturales asociada con enfermedades autoinmunes y rechazo de trasplantes, o
- 40 - para prevenir la muerte celular de células cardíacas incluyendo insuficiencia cardíaca, cardiomiopatía, infección viral o infección bacteriana del corazón, isquemia miocárdica, infarto de miocardio e isquemia miocárdica, injerto de derivación de arteria coronaria o
- para prevenir y/o tratar toxicidad farmacológica mitocondrial por ejemplo como resultado de quimioterapia o terapia de VIH,
- 45 - para prevenir la muerte celular durante infección viral o infección bacteriana, o
- para prevenir y/o tratar inflamación o enfermedades inflamatorias, enfermedad intestinal inflamatoria, septicemia y choque séptico, o
- para prevenir la muerte celular de estadios de folículo a ovocito, de estadios de ovocito a huevo maduro y espermatozoide (por ejemplo procedimientos de congelación y trasplante de tejido ovárico, fecundación artificial), o

- para conservar la fertilidad en mujeres y en hombres después de quimioterapia o
- para conservar la fertilidad en animales hembra y macho o prevenir y/o tratar la degeneración macular y el glaucoma, o prevenir y/o tratar la hepatitis aguda, hepatitis activa crónica, hepatitis B y hepatitis C o
- 5 - para prevenir la alopecia, y dicha alopecia debida a calvicie de patrón masculino, radiación, quimioterapia o estrés emocional o
- para tratar o mejorar lesiones dérmicas (debido a la exposición a alto nivel de radiación, calor, quemaduras, productos químicos, sol y enfermedades autoinmunes) o
- para prevenir la muerte celular de células de la médula ósea en síndromes mielodisplásicos (SMD), o
- para tratar pancreatitis o
- 10 - para tratar el síndrome respiratorio o
- para tratar osteoartritis, artritis reumatoide, psoriasis, glomerulonefritis, aterosclerosis y la enfermedad de injerto frente a hospedador o
- para tratar apoptosis de pericitos retinales, glaucoma de apoptosis de neuronas retinales, lesiones retinales resultantes de isquemia, retinopatía diabética, o
- 15 - para tratar patologías asociadas con un aumento de la apoptosis, o
- para prevenir la muerte celular en vegetales (por ejemplo: plantas, flores, talofitos (hongos, algas marinas)...).

De acuerdo con otro aspecto adicional, la invención se refiere a un procedimiento para bloquear o prevenir la muerte celular *in vitro* que comprende explorar moléculas terapéuticamente con respecto a la muerte celular, particularmente apoptosis.

- 20 Otras características y ventajas de la invención se proporcionan en los siguientes datos con referencia a las figuras, que representan:

Ref. Figura 1. Detección por microscopía de fluorescencia combinada y citometría de flujo de permeabilización de la membrana plasmática (PMP) durante la apoptosis de neuronas primarias privadas de suero.

- 25 (A) Microfotografías por contraste de fase y fluorescencia de neuronas corticales cultivadas sometidas o no (Co.) a 24 horas de privación de suero (SD). Las células se tiñeron con el ligando de ADN fluorescente permeable a células Hoechst 33342 (Ho.342, fluorescencia azul) y el intercalador de ADN fluorescente impermeable a células 7-amino-actinomicina D (7-AAD; fluorescencia roja). Se muestran neuronas corticales primarias que representan el fenotipo dominante (> 60% de células sometidas a SD). En neuronas SD, la fluorescencia púrpura (mezcla de rojo y azul) indica la co-presencia de 7-AAD y
- 30 Hoechst 33342 en núcleos condensados (fluorescencia púrpura en la combinación), correlacionándose por tanto la PMP con la apoptosis nuclear. (B) Efecto de tritón sobre PMP y estado de cromatina de neuronas cultivadas. Se tiñeron neuronas cultivadas con 7-AAD, Hoechst 33342 y el colorante fluorescente Verde no tóxico CellTracker™. Las microfotografías representativas de neuronas muestran bien la combinación de contraste de fase con Hoechst 33342 y 7-AAD (paneles superiores) o solo con el
- 35 colorante Verde CellTracker™ (paneles inferiores) en ausencia (Co.) o después de 5 minutos de tratamiento con tritón al 0,02%. (C) Ausencia de PMP después de tripsinización de neuronas. Neuronas cultivadas teñidas con 7-AAD, Hoechst 33342 y colorante Verde CellTracker™ se sometieron a un protocolo basado en tripsina de desprendimiento cuidadoso (como se describe en materiales y procedimientos). Se muestran microfotografías representativas de neuronas tripsinizadas analizadas en
- 40 (B) junto con cuantificación por FC de fluorescencia Verde CellTracker™ asociada con neuronas a las 0, 1, 3 y 4 horas después de la tripsinización. (D) Análisis por FM de PMP y picnosis nuclear de neuronas después de SD. Se muestran microfotografías representativas de neuronas cultivadas sometidas a SD de 24 horas combinado con un contraste de fase con Hoechst 33342 y 7-AAD. Se indica el porcentaje de neuronas positivas a PMP (núcleos de color púrpura). (E) Análisis por FC de PMP. Las muestras de
- 45 neuronas analizadas en (D) se someten a tripsinización posteriormente e inmediatamente se someten a cuantificación por FC de PMP. Se muestra un gráfico de puntos representativo (FSC/FL3). Se indica el porcentaje calculado FC de neuronas positivas a PMP. El inserto muestra una microfotografía por contraste de fase representativa de neuronas corticales sometidas a tripsina. (F) Cuantificación comparativa (n=30) de PMP usando FM (recuento óptico antes de tripsinización) y FC (recuento automático después de tripsinización). (G) Correlación lineal entre cuantificación por FM y basada en FC de PMP.
- 50

**Ref. Figura 2: Detección combinada de PMP, exposición a PS y modificaciones nucleares durante la apoptosis neuronal.**

(A) Microfotografías de fluorescencia de neuronas corticales cultivadas sometidas a 24 horas de SD. Las células se tiñeron con 7-AAD (fluorescencia roja) y anexina V (fluorescencia verde) conjugada con FITC. Las neuronas corticales primarias se dividieron en 3 subconjuntos principales apoptóticos: apoptótico temprano (anexina V<sup>+</sup>, 7-AAD<sup>-</sup>, subconjunto 1), apoptótico tardío (anexina V<sup>+</sup>, 7-AAD<sup>+</sup>, subconjunto 2) y apoptótico en fase terminal (anexina V<sup>-</sup>, 7-AAD<sup>+</sup>, subconjunto 3). (B) Detección FC de PMP y exposición a PS. Análisis representativo de gráfico de puntos de los subconjuntos 1, 2 y 3 de neuronas. Las neuronas vivas no presentan translocación PS (MFI anexina V = 81,4 +/- 17,9) y son impermeables a 7-AAD (neuronas doble negativas, subconjunto L). (C) Cinética de FC de la aparición de los subconjuntos apoptóticos a lo largo de SD (n=4; +/- desviación típica). (D) Determinación basada en FM del perímetro nuclear combinado con análisis basados en FC sobre el tamaño neuronal (FSC) entre subconjuntos apoptóticos. Neuronas corticales cultivadas sometidas a 24 horas de SD se tiñeron con Hoechst 33342, 7-AAD y anexina V conjugada con FITC. Durante las observaciones con FM se adquirieron múltiples campos y después las muestras se llevaron a análisis de FC de tamaño de células utilizando el parámetro de dispersión directa (PDD). La coevaluación del perímetro nuclear (n= 15; +/- desviación típica) y PDD (n=7; +/- desviación típica) se presentan en una base por subconjunto. (E). Análisis detallado de PDD, SSC y características nucleares de neuronas vivas (subconjunto L) y muertas (subconjuntos 1, 2, 3). Los asteriscos indican efectos altamente significativos (p < 0,0001) y § significa efectos significativos (p < 0,05) en comparación con el subconjunto previo.

**Ref. Figura 3: Detección y ordenamiento molecular de la caspasa-9 activada, caspasa-3, exposición a PS y PMP**

(A) Microfotografías de fluorescencia de neuronas corticales cultivadas sometidas a 24 horas de SD. Las células se tiñeron con FAM-DEVD-fmk (FLICA; fluorescencia verde), 7-AAD (fluorescencia roja) y Hoechst (fluorescencia azul). Se detectaron cuatro fenotipos distintos: neuronas vivas (Caspasa-3<sup>-</sup>, 7-AAD<sup>-</sup>, subconjunto L), apoptóticas tempranas (Caspasa-3<sup>+</sup>, 7-AAD<sup>-</sup>, subconjunto 1), apoptóticas tardías (Caspasa-3<sup>+</sup>, 7-AAD<sup>+</sup>, subconjunto 2) y apoptóticas terminales (Caspasa-3<sup>-</sup>, 7-AAD<sup>+</sup>, subconjunto 3). (B) co-detección por FC de PMP y actividad de tipo caspasa-3. Análisis representativos de gráficos de puntos por FC de subconjuntos de neuronas L (en azul), 1 (en verde), 2 (en amarillo) y 3 (en rojo). (C) Neuroprotección en presencia del inhibidor pan-caspasa Q-VD-OPH. Se prepararon microfotografías de fluorescencia de neuronas corticales cultivadas y se marcaron en "A". (D) Efectos de compuestos reguladores de apoptosis en la activación de caspasa-3 y PMP. Las neuronas se trataron con el inhibidor de serina-proteasa Pefabloc, el bloqueador de ANT BA o inhibidores de caspasa indicados (z-DEVD-fmk, z-VAD-fmk, Q-VD-OPH), y se sometieron a 24 horas de privación de suero. Las células se tiñeron con 7-AAD (fluorescencia roja) y se inmunotiñeron para caspasa-3 activada y después se sometieron a análisis de FC. Los resultados son valores medios ( $\pm$  desviación típica) de tres experimentos independientes. (E y F). Análisis de la cinética FM y FC de la actividad caspasa-3 y exposición a PS a lo largo de la privación de suero. Las células se tiñeron con sulfurodamina conjugada con FLICA (fluorescencia roja), anexina V conjugada con FITC (fluorescencia verde) y Hoechst (fluorescencia azul). Las microfotografías de fluorescencia presentadas en (E) corresponden a los subconjuntos "a" a "d" indicados en los gráficos de puntos (F). (G) Las microfotografías de fluorescencia de las neuronas corticales cultivadas sometidas a 24 horas de privación de suero en ausencia (SD) o en presencia (+LEHD) del inhibidor de caspasa-9 z-LEHD-fmk. Las células se tiñeron con Hoechst (fluorescencia azul) y se cotiñeron con FAM-LEHD-fmk (FLICA; fluorescencia verde) en paneles 1 y se cotiñeron con anexina V conjugada con FITC (fluorescencia verde) en los paneles 2. (H) jerarquía entre el punto de comprobación de tipo ANT, actividad de tipo caspasa-9 y PMP. Las neuronas se trataron con el bloqueador de ANT BA o z-LEHD-fmk y se sometieron a 24 horas de SD. Las células se tiñeron con 7-AAD (fluorescencia roja), se cotiñeron con FAM-LEHD-fmk y después se sometieron a análisis de FM. Los resultados son valores medios ( $\pm$  desviación típica) de tres experimentos independientes.

**Ref. Figura 4: detección combinada de  $\Delta\Psi_m$  y PMP en neuronas.**

(A) Microfotografías de fluorescencia de neuronas primarias cultivadas durante el periodo indicado en ausencia o en presencia de suero (control 24 h; Co). Las células se tiñeron con Hoechst 33342 (fluorescencia azul) y el colorante sensible a  $\Delta\Psi_m$  JC-1 (fluorescencia naranja de mitocondrias con una alta fluorescencia verde  $\Delta\Psi_m$  de mitocondrias con un bajo  $\Delta\Psi_m$ ). Se muestran neuronas que representan el fenotipo dominante (>50%). Dec, fase de decisión; Eff, fase efectora; Deg, fase de degradación.

(B) Análisis de gráfico de puntos de FC de  $\Delta\Psi_m$  y PMP. Neuronas SD se tiñeron con 7-AAD y JC-1, se sometieron a digestión con tripsina e inmediatamente se sometieron a análisis por FC. Los gráficos de puntos FL2 (JC-1) / FL3 (7-AAD) revelan dos subconjuntos de neuronas con un  $\Delta\Psi_m$ -bajo: Subconjunto II' impermeable a 7-AAD y II" positivo a 7-AAD. (C) Visualización FM de los subconjuntos. I, II', II" mediante la codetección de  $\Delta\Psi_m$  (JC-1) y permeabilidad de la membrana plasmática (7-AAD). (D) Control con respecto

al tiempo de FC de los subconjuntos II' y II'' en neuronas privadas de suero. (E) Neuroprotección por BA pero no z-DEVD-fmk evaluada por FC. Los histogramas indican el porcentaje de neuronas con  $\Delta\Psi_m$  bajo (subconjuntos II'+II'', histogramas en azul) o el porcentaje de neuronas positivas a 7-AAD (subconjunto II'', histogramas en negrita) después de 24 horas de SD en ausencia o en presencia de BA o z-DEVD-fmk. Los resultados son la media de 3 experimentos independientes (media +/- desviación típica).

**Ref. Figura 5: detección en tiempo real de la variación  $\Delta\Psi_m$  en neuronas corticales primarias,**

(A) Fotoblanqueo con JC-1 inducido por radiaciones repetitivas de FM. Microfotografías de fluorescencia de neuronas teñidas con KC-1 después de 1, 3, 5, 10 y 15 irradiaciones (1,2 s; 5 Vatios). El intervalo entre dos radiaciones fue de 1 minuto. Obsérvese la desaparición progresiva de la fluorescencia naranja. (B) Regresión logarítmica de la intensidad de fluorescencia naranja de JC-1 valorada en el campo radiado. (C) Protocolo para el control por FC en tiempo real de  $\Delta\Psi_m$  y PMP usando sondas JC-1 y 7-AAD. La microfotografía de fluorescencia insertada muestra una visualización representativa de neuronas primarias coteñidas con hoechst, JC-1 y 7-AAD después de tripsinización. Obsérvese que en estas condiciones experimentales no pueden detectarse PMP, ni pérdida de  $\Delta\Psi_m$  (neuritas y cuerpos celulares) ni condensación nuclear. (D) Aplicación para neuronas primarias. (D1) Microfotografías de fluorescencia de neuronas tratadas o no (Co.) con mCLCCP (100  $\mu$ M; 30 min). (D2) Control por FC en tiempo real de fluorescencias naranja JC-1 y verde JC-1. La línea blanca corresponde a la fluorescencia media de neuronas. (D3) Desarrollo de despolarización mitocondrial (naranja JC-1), PMP (7-AAD) y variaciones de tamaño (FSC)/granularidad (SSC) obtenidas en las mismas muestras (Control, línea punteada y línea plana tratada con mCLCCP).

**Ref. Figura 6: Análisis por FC en tiempo real de modificaciones  $\Delta\Psi_m$  e inducción con PMP mediante diferentes moléculas neurotóxicas.**

(A-1) FM de tiempo fijo del  $\Delta\Psi_m$  y del estado de la membrana plasmática. Las neuronas se trataron (o no; Co.) con SNP 0,6 mM o MPTP 1 mM o etanol (etOH) 20 mM durante 45 minutos. Las células se tiñeron con JC-1 (fluorescencia naranja de mitocondrias con un alto  $\Delta\Psi_m$ , fluorescencia verde de mitocondrias con un bajo  $\Delta\Psi_m$ ), Hoechst (fluorescencia azul) y 7-AAD (fluorescencia roja). (A-2) Análisis por FC en tiempo real de  $\Delta\Psi_m$  (fluorescencia naranja JC-1) durante 15 minutos de tratamiento solo con medio (Co.), SNP 0,6 mM, MPTP 1 mM o etOH 20 mM. Los acontecimientos de color naranja corresponden a neuronas con un alto  $\Delta\Psi_m$  y los sucesos de color verde corresponden a neuronas con un bajo  $\Delta\Psi_m$ . (A-3) Análisis por FC en tiempo real de PMP (fluorescencia 7-AAD). (B) Cuantificación mediante FC en tiempo real. (B-1) Análisis de la proporción FSC/SSC de neuronas tratadas con MPTP. Las líneas rojas corresponden al valor medio de la proporción FSC/SSC en neuronas con un alto  $\Delta\Psi_m$  y las líneas verdes de puntos corresponden al valor medio de la proporción FSC/SSC en neuronas con un bajo  $\Delta\Psi_m$  (como se define en A-2). La línea blanca plana corresponde al valor medio de la proporción FSC/SSC en toda una población de neuronas. (B-2) Análisis de intensidad de fluorescencia media (MFI) con JC-1 naranja en neuronas tratadas con MPTP. Las líneas rojas planas y las líneas verdes de puntos corresponden a una MFI con JC-1 naranja entre neuronas con un alto y un bajo  $\Delta\Psi_m$ , respectivamente. La línea blanca plana corresponde a MFI con JC-1 naranja en toda una población de neuronas. (B-3) Análisis de intensidad de fluorescencia media (MFI) con 7-AAD en neuronas tratadas con etOH.

**Ref. Figura 7. Jerarquía de acontecimientos relacionados con la apoptosis durante la muerte neuronal inducida por SD.**

Las principales fases de la apoptosis se indican junto con sus acontecimientos subcelulares correspondientes. Se presenta una visión artística del comportamiento neuronal durante la muerte celular. Las neuronas vivas se dibujan con núcleos de color azul (marcaje con Hoechst) y las mitocondrias de color rojo (marcaje con JC-1; elevado  $\Delta\Psi_m$ ). Durante la fase decisiva también aparecen mitocondrias de color verde (marcadas con JC-1;  $\Delta\Psi_m$  bajo). La fase efectora está asociada con contracción nuclear y activación difusa de caspasa-3 (citosol rosa difuso). La fase degradativa está asociada con desaceleración de las neuritas, exposición a PS (membrana plasmática verde) y caspasa-3 citosólica activada discreta. La fase degradativa final está asociada con permeabilización de la membrana plasmática final (PMP) lo que conduce a la incorporación nuclear de 7-AAD (núcleos contraídos rojos). La escisión de bax y la translocación aparecen aguas abajo de las mitocondrias pero aguas abajo de la actividad caspasa-2. Se indica el punto de impacto de inhibidores específicos.

**Ref. Figura 8. La inhibición de pan-caspasa promueve la supervivencia de neuronas corticales primarias inducidas a la muerte mediante privación de suero**

(A) Respuestas a lo largo del tiempo de características apoptóticas a través de cultivos de neuronas corticales privadas de suero (SD) durante 48 horas (DIV6). La cinética de la aparición de neuronas con bajo  $\Delta\Psi_m$  (n=30), apoptosis nuclear (NA) (n=30), permeabilidad de la membrana plasmática (PMP) (n=30) o exposición en la lámina externa de restos de fosfatidilserina (PS) (n=7) se determinan por microscopía de

fluorescencia y análisis de citometría de neuronas marcadas con J-1, Hoechst 33342, 7-actinomicina D (7-AAD) o Anexina V conjugada con FITC, respectivamente (como se ha descrito previamente en Lecoeur y col., 2004). Obsérvese la disminución progresiva de neuronas positivas a PS después de 24 horas, ya que indica la transición de un subconjunto de bajo  $\Delta\Psi_m/NA^+/7\text{-AAD}^+$ /anexina  $V^+$ -FITC con respecto a un subconjunto terminal  $\Delta\Psi_m$  bajo/ $NA^+/7\text{-AAD}^+$ /anexina  $V$ -FITC (Lecoeur y col., 2004).

(B) Análisis comparativo de diferentes inhibidores pan-caspasa para neuroprotección. Las neuronas se someten a SD simultáneamente con el inhibidor de caspasa de amplio espectro, Q-VD-OPH, Z-VAD-FMK (ZVAD) o BOC-D-FMK (BOC-D) (todos a 100  $\mu\text{M}$ ). Los histogramas indican el porcentaje de neuronas con un bajo  $\Delta\Psi_m$  (n=12), NA (n=12), exposición a PS (n=7) y PMP (n=12) restante cerca del nivel de control (Co.). (C) Q-VD-OPH preserva altamente tanto la morfología nuclear como la integridad de las neuritas después de 24 horas con SD. Campos representativos de control (Co.), neuronas tratadas con SD y Q-VD-OPH (100  $\mu\text{M}$ ): paneles superiores: microfotografías de contraste de fase; paneles inferiores, se combinan la fluorescencia de Hoechst nuclear azul y la de contraste de fases. Obsérvese la ausencia de desintegración de neuritas pronunciadas y condensación/fragmentación nuclear en presencia de inhibidor pan-caspasa. (D) Durante 24 h con SD al menos cuatro caspasas se activan. La activación de Caspasa-2 (n=14), Caspasa-8 (n=3), Caspasa-9 (n=8) se detectó usando FLICA, FAM-VDVAD-FMK, FAM-LETD-FMK y FAM-LEHD-FMK, respectivamente. La activación de caspasa-3 se detectó con anticuerpo policlonal anti caspasa-3 escindido conjugado con ficoeritrina (n=5) o FAM-DEVD-FMK (n=12), estando las dos estrategias bien correlacionadas. Obsérvese el bajo nivel de activación de caspasa-8 durante SD. Todas estas caspasas se inactivan por completo por Q-VD-OPH 100  $\mu\text{M}$ . (E) Inhibidores de caspasa de amplio espectro no impiden significativamente las neuronas corticales de NA y PMP inducidas por  $\beta$  amiloide (25-35) ( $\beta\text{A}$ ), 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), ácido 3-nitropropiónico (3-NPA), nitroprusiato sódico (SNP) o ionomicina (Iono.). Las neuronas corticales se trataron en ausencia o en presencia de Z-VAD-FMK (ZVAD) 100  $\mu\text{M}$  o Q-VD-OPH (QVDOPH) durante 24 horas con ionomicina (6  $\mu\text{M}$ ) o  $\beta\text{A}25\text{-}35$  (60  $\mu\text{M}$ ); 48 horas con MPTP (2 mM), 3-NPA (100  $\mu\text{M}$ ) o SNP (500  $\mu\text{M}$ ). Se contaron las neuronas que presentaban NA y PMP como en (A). Se realizó en ensayo de la t de Student no correlacionado: #,  $p = 0,01$ .

**Ref. Figura 9. Para la muerte celular apoptótica de las neuronas corticales inducida por privación de suero se requiere actividad premitocondrial de tipo caspasa-2**

(A) La actividad de tipo caspasa-2 es el acontecimiento más temprano detectado durante la muerte celular inducida por SD. Se añadieron niveles específicos de caspasa-3, caspasa-9, caspasa-8 y caspasa-2 al inicio de la SD, respectivamente a 100  $\mu\text{M}$ : Z-DEVD- FMK (DEVD) (n=8), Z-LEHD- FMK (LEHD) (n=6), Z-LETD- FMK (LETD) (n=4), Z-VDVAD- FMK (VD-VAD) (n=10). La disminución en  $\Delta\Psi_m$ , exposición a NA, PS y PMP se determinaron 24 horas después de tinciones con JC-1, Hoechst 33342, 7-AAD y Anexina V conjugada con FITC, respectivamente. VDVAD anula estos atributos de apoptosis al contrario que DEVD y LETD. Al prevenir la exposición a PS, NA y PMP, LEHD no altera la disminución de  $\Delta\Psi_m$ . El asterisco se refiere a un fenotipo nuclear particular en neuronas tratadas con LEHD como se representa en la figura 2B. Los resultados se expresan como % del efecto inhibidor. (B) Microfotografías de fluorescencia representativas para núcleos de neuronas tratados con inhibidores de caspasa específicos. A diferencia de DEVD y LETD, los núcleos teñidos con Hoechst 33342 de neuronas tratadas con VDVAD presentan morfología similar a la de los controles. Los núcleos de las neuronas tratadas con LEHD tienen un tamaño reducido correspondiente a una condensación de fase I (de acuerdo con la clasificación de Susin; Susin y col., 1999). (C) La activación similar a caspasa-2 precede la disminución de  $\Delta\Psi_m$  en neuronas SD. La cinética de la activación de caspasa-2 y alteraciones  $\Delta\Psi_m$  se evalúan por microscopía de fluorescencia después de co-tinción con FAM-VDVAD-FMK (verde) y el colorante sensible a  $\Delta\Psi_m$  CMXRos (rojo). La actividad similar a caspasa-2 (2 horas) se detecta antes de la disminución progresiva de  $\Delta\Psi_m$  (8,5 horas). Se usó mCICCP (100  $\mu\text{M}$ , 45 minutos) como control positivo para la despolarización completa de la membrana mitocondrial. (D) Evaluación de la jerarquía entre caspasa-2, caspasa-3, caspasa-9. Cada inhibidor de caspasa indicado (100  $\mu\text{M}$ ) y el inhibidor de serina proteasa Pefabloc (100  $\mu\text{M}$ ), se añadieron al inicio de SD y se detectaron actividades similares a caspasa 24 horas después usando FLICA específicos. Los histogramas representan el % de inhibición para la caspasa-2, caspasa-3, caspasa-9 (n=4).

**Ref. Figura 10. Determinación del mejor patrón para la neuroprotección inducida por QVDOPH- o VDVAD-**

La muerte celular neuronal corresponde a neuronas que presentan simultáneamente bajo  $\Delta\Psi_m$  (JC-1 verde), fenotipo NA (Hoechst 33342) y PMP (incorporación de fluorescencia roja con 7-AAD) después de SD-24 horas en presencia de inhibidores de caspasa en lo que se refiere a cultivos SD sin inhibidores. El panel de la izquierda muestra la respuesta a la dosis de cada inhibidor añadido al inicio de la SD y confirma que para una supervivencia óptima se requieren 100  $\mu\text{M}$ . Además, los efectos protectores (a t=24 horas) de VDVAD o QVDOPH a 100  $\mu\text{M}$  disminuye progresivamente cuando se añaden a las 2, 4, o 6 horas después del inicio de la SD (panel de la derecha). Las neuronas se cuentan por microscopía de fluorescencia (n=3).

**Ref. Figura 11. Prueba genética de la apoptosis mediada por caspasa-2 inducida por privación de suero: reducción de la expresión de caspasa-2 por estrategia de interferencia de ARN**

(A) Silenciamiento génico de caspasa-2 murina por ARN de interferencia pequeño. Neuronas de seis días *in vitro* (DIV6) se transfectaron con los ARNip durante 6 horas como se describe en el apartado experimental antes de incubación adicional en medio con N5. Paneles superiores: expresión del gen endógeno *caspasa-2* a las 24 horas posttransfección se determina mediante análisis RT-PCR. Obsérvese que el ARNip C2 wt disminuye la expresión de *caspasa-2* sin ningún efecto secundario sobre otros genes (*caspasa-9*, *GAPDH*); paneles inferiores: reducción de la expresión de pro-caspasa-2 en neuronas control por ARNip C2 wt evaluado por transferencia de western. El ARNip C2 m es el control negativo para el silenciamiento génico. Se usó *GAPDH* como un control de carga igual. (B) Control en células de reducción de la expresión por caspasa-2 por inmunotinción (10C6). La intensidad de fluorescencia disminuyó al 70% durante 24 horas posttransfección con el ARNip C2 wt y progresivamente se recuperó a las 72 horas. La extinción de fluorescencia fue continuada bajo FM (5 campos correspondientes a 150 células seleccionadas al azar por condición por experimento) usando la opción Probenmeter del programa informático Leica Q Fluoro. Obsérvese que la reducción de la expresión se produce en todas las neuronas. (C) Actividad caspasa-2 y parámetros de muerte celular están anulados después del ARN de interferencia en neuronas SD. Neuronas DIV6 transfectadas durante 6 horas con los ARNip, se re-cultivaron en medio enriquecido de suero durante 16 horas, antes de acondicionar durante 24 horas adicionales en medio aséptico. Microfotografías de fluorescencia representativas: condensación/fragmentación nuclear (Hoechst; azul), actividad caspasa-2 (FAM-VDVAD-FMK, verde; subconjunto 1) y PMP (7-AAD; rojo; subconjunto 3); los subconjuntos 2 se refieren a neuronas positivas tanto a caspasa-2 como a 7-AAD. A diferencia del ARNip C2m, el ARNip C2 wt impide la activación de caspasa-2 (n=5). (D) La actividad caspasa-2 es crítica para la muerte celular neuronal inducida por SD pero no para la inducida por ionomicina. El ARN de interferencia impide otros atributos de muerte celular por SD. Cuantificación de parámetros de muerte celular en ausencia o en presencia de inhibidores indicados (100  $\mu$ M) o los ARNip (n=5). Las neuronas se tratan como en (C) para el ARN de interferencia. La disminución de  $\Delta\Psi_m$ , exposición PS, NA, y PMP se determina por tinciones JC-1, Hoechst 33342, 7-AAD y Anexina V conjugado con FITC, respectivamente. La ruta de la muerte celular inducida por tratamiento durante 24 horas con 6  $\mu$ M de ionóforo  $Ca^{2+}$  es independiente de la caspasa-2: obsérvese la ausencia de protección por VDVAD o ARNip C2 wt (n=3). (E) Anaglifos que representan los efectos protectores de ARNip C2 wt en PMP (incorporación de 7-AAD), morfologías nucleares (Hoechst 33342; azul) y de neuritas después de SD en contraste con el tratamiento con ionomicina (6  $\mu$ M, 24 horas); la fluorescencia rosa se obtiene de la combinación de Hoechst y 7-AAD. La fluorescencia se combina con imágenes de contraste de fase.

**Ref. Figura 12. En neuronas privadas de suero durante 24 horas la caspasa-2 se necesita para la liberación del citocromo c postmitocondrial y translocación de Bax premitocondrial**

(A) VDVAD y el ARNip C2 wt reducen la liberación del citocromo c postmitocondrial. Panel izquierdo: microfotografías de fluorescencia correspondientes a los efectos de inhibidores de caspasa selectivos (100  $\mu$ M). Neuronas tratadas o no con inhibidores durante retirada de suero 24 horas se tiñeron con Hoechst 33392 (azul) y el anticuerpo monoclonal (6H2.B4) que reconoce el citocromo c (rojo). La SD desencadena la liberación del citocromo c citoplásmico (tinción difusa) de las mitocondrias (tinción en puntos). Panel derecho: recuentos correspondientes a FM para la liberación del citocromo c (n=4). Para el ensayo de los ARNip, neuronas de seis días *in vitro* (DIV6) se transfectaron durante 6 horas con los ARNip, después se cultivaron en medio completo N5 antes de 24 horas adicionales con SD. Obsérvese que Pefabloc (100  $\mu$ M), inhibidor de caspasa-9 LEHD y el inhibidor de caspasa-3 DEVD no alteran la liberación del citocromo c.

(B) El ARN de interferencia anula la activación de caspasa-2 e impide la activación dependiente de la liberación del citocromo c aguas abajo de la caspasa-9 y caspasa-3. Se tratan neuronas como en el apartado A, o con QVDOPH o VDVAD 100  $\mu$ M, y se tiñeron con FAM-VDVAD-FMK, FAM-DEVD-FMK y FAM-LEHD-FMK (n=4). Obsérvese que la ruta de la muerte celular inducida por ionomicina (6  $\mu$ M) durante 24 horas es independiente de la activación de caspasa-2 en neuronas corticales (otras actividades caspasa no se sometieron a ensayo). (C) Microfotografías representativas de la inactivación en célula de caspasa-3 mediante el ARNip C2 wt: Paneles superiores, se combinaron la fluorescencia Hoechst nuclear azul y la fluorescencia verde (citoplásmica) de caspasa-3; Paneles inferiores, se combinaron la fluorescencia nuclear con 7-AAD rojo resultante de PMP y fluorescencia verde de caspasa-3 citoplásmica. El ARNip C2 wt anuló completamente la activación de caspasa-3, NA y PMP. (D) VDVAD y el ARNip C2 wt reducen la translocación de Bax premitocondrial. Microfotografías de fluorescencia (panel izquierdo) y cuantificación correspondiente (panel derecho) de los efectos de inhibidores de caspasa selectivos (100  $\mu$ M) y los ARNip. Neuronas no tratadas y neuronas tratadas como en el apartado A con cualquiera de los inhibidores o con los ARNip, se tiñeron con Hoechst 33342 (azul) y el anticuerpo policlonal  $\Delta$ 21 que reconoce Bax (verde) a las 24 horas de privación de suero, antes de puntuarse bajo FM (10 campos correspondientes a 150-300 células seleccionadas al azar por condición por experimento) (n=4). La recolocación de Bax del citoplasma (tinción difusa) a las mitocondrias (tinción por puntos) se impide por VDVAD, QVDOPH y el ARNip C2 wt. Obsérvese que Pefabloc, LEHD y DEVD no alteran la recolocación en Bax.

**Ref. Figura 13. Posicionamiento de los efectos protectores de VDVAD frente a furosemida en la translocación de Bax y actividad caspasa-2**

(A) La actividad caspasa-2 es aguas arriba de la translocación de Bax. Las neuronas se incubaron al inicio de SD durante 24 horas con furosemida 2 mM (Furo.) o VDVAD 100  $\mu$ M. Las neuronas se marcaron con Hoechst 33342 (Azul) y se inmunotñieron para Bax con anticuerpo  $\Delta$ 21 (panel superior; verde) o se marcaron con FAM-VDVAD-FMK (panel inferior; verde). Las microfotografías de fluorescencia representativas muestran que la recolocación de Bax mitocondrial después de SD la impide parcialmente la furosemida sin alterar la actividad caspasa-2. Por otro lado, VDVAD bloquea tanto la activación de caspasa-2 como la recolocación de Bax. (B) Cuantificación por FM de neuronas que presentan recolocación de Bax o actividad caspasa-2 (n=4) después de tratamiento como en (A). Pefabloc es un control negativo. (C) Inhibición de la translocación de Bax por furosemida da como resultado una modificación de la disminución de  $\Delta\Psi_m$ , Na, PMP y liberación del citocromo c. Las neuronas tratadas al inicio de SD durante 24 horas con furosemida 2 mM o VDVAD 100  $\mu$ M se marcaron con JC-1, Hoechst 33342, 7-AAD y anticuerpo monoclonal que reconoce el citocromo c (6H2.B4). Las células se puntuaron por FM (n=3-8).

**Ref. Figura 14. Durante la SD la escisión de Bax  $\alpha$  depende de la caspasa-2 citoplasmática y es independiente de calpaína**

(A) El ARNm de *caspasa-2* se analizó mediante RT-PCR en neuronas SD durante 24 horas, lo que no revelaba que hubiera ninguna alteración a nivel del ARN. La expresión de *GAPDH* se usó como control de carga. (B) Caracterización de la escisión de Bax mediada por caspasa-2. Las neuronas se sometieron a SD durante 2, 5, 8, 15 y 24 horas y se analizaron las cinéticas de escisión de Bax mediante Inmunotransferencia de Western usando el anticuerpo policlonal de conejo suscitado contra Bax  $\alpha$  de ratón deleciónado para los 21 aminoácidos del extremo carboxilo terminal ( $\Delta$ 21). El Bax p22 nativo se escinde de manera temprana y progresivamente como p18 Bax. (C) La escisión de Bax en una forma de 18 kDa se produce en el extremo N durante la SD. Panel derecho: comparación de análisis de Transferencia de Western de las mismas muestras (neuronas de control y SD) utilizando el anticuerpo policlonal de conejo suscitado contra Bax  $\alpha$  de ratón deleciónado en los 21 aminoácidos del extremo carboxilo terminal ( $\Delta$ 21) y el anticuerpo policlonal de conejo suscitado contra un péptido que mapeaba el extremo amino de Bax  $\alpha$  (N20). Ambos anticuerpos reconocen Bax nativo mientras que Bax escindido solo se detecta con el  $\Delta$ 21. (D) El perfil de inhibidor proteasa de la escisión de Bax se caracteriza en presencia de VDVAD 100  $\mu$ M o ARNip C2wt (3,8  $\mu$ g) durante 24 horas de SD. VDVAD y el ARNip C2 wt impiden la escisión de Bax. La escisión de Bax depende de la presencia de caspasa-2 y de la actividad de caspasa-2. Se realizó Transferencia de Western usando el anticuerpo  $\Delta$ 21. (E) La privación de suero induce la translocación de Bax de Bax p18 escindido en las mitocondrias, lo que sugiere que Bax p18 es la forma activa que promueve alteraciones mitocondriales posteriores. La fracción mitocondrial y citosol de neuronas de SD se aislaron y la translocación de Bax se detectó mediante transferencia de Western usando el anticuerpo anti Bax  $\Delta$ 21. Se usó anticuerpo anti-HSP60 de ratón para comprobar la fracción mitocondrial. Bax p22 está presente en el citosol de neuronas SD durante 24 horas. Sin embargo, Bax se escinde parcialmente a las 24 horas SD en una forma p18 que se deslocaliza del citosol a la mitocondria. El ARNip C2 wt o VDVAD impide la integración de Bax p18 en la membrana mitocondrial. (F) La escisión de Bax mediada por caspasa-2 es específica de estímulo en neuronas corticales. Se trataron neuronas durante 8, 15 o 24 horas con estaurosporina (STS, 10  $\mu$ M) o ionomicina en presencia o en ausencia de VDVAD (100  $\mu$ M) antes del análisis de inmunotransferencia usando el anticuerpo  $\Delta$ 21. La STS e ionomicina inducen la escisión de Bax independiente de caspasa-2 en neuronas corticales. (G) La escisión de Bax no está mediada por calpaínas. La capacidad de las calpaínas específicas (ALLN 25  $\mu$ M para calpaína I; ALLM 25  $\mu$ M para calpaína II) y de amplio espectro (E64d 25-50  $\mu$ M) para bloquear la escisión de Bax inducida por SD durante 24 horas se examinó como en B. Estos inhibidores no pueden impedir la escisión de Bax a diferencia de 100  $\mu$ M de QVDOPH: se realizó Transferencia de Western utilizando el anticuerpo  $\Delta$ 21. (H) Estabilización de Bax p18 por inhibición de la actividad del proteasoma. Se cultivaron neuronas en medio asérico durante 24 horas en ausencia o en presencia de inhibidores de proteasoma: lactacistina 1-10  $\mu$ M (Lact.) y Epoxomicina 10  $\mu$ M (Epo.). Se realizó Transferencia de Western utilizando el anticuerpo  $\Delta$ 21. (I-J) El estado de caspasa-2 en neuronas SD 24 horas: análisis mediante RT-PCR (I) y Transferencia de Western (J) utilizando el anticuerpo anti caspasa-2 de ratón monoclonal de rata (11B4). Se añadió VDVAD (100  $\mu$ M) al inicio de la SD. El contenido de la proteína procaspasa-2 disminuye durante la SD sin modificar el nivel de ARNm de *Caspasa-2*. Se usó *GAPDH* como un control de carga igual. La proteína procaspasa-2 no se regula positiva o negativamente pero la procaspasa-2 en su lugar se procesa como una forma p14 en una manera dependiente de VDVADasa. (K) Localización caspasa-2 atípica durante SD: la caspasa-2 permanece difusa en el citoplasma de neuronas corticales primarias de los ratones durante SD. Las neuronas al sexto día *in vitro* (DIV6) se cultivaron en medio asérico durante 8, 16 y 24 horas antes de la tinción con el anticuerpo anti caspasa-2 de ratón monoclonal de rata (10C6; rojo). Los núcleos se contratiñieron con 1  $\mu$ M Hoechst 33342 (azul). (L) La distribución citoplasmática de caspasa-2 durante lesión es dependiente de estímulo. Se trataron neuronas mediante concentraciones citotóxicas de ionomicina ionóforo  $\text{Ca}^{2+}$  (6  $\mu$ M), el inhibidor de quinasas estaurosporina (STS, 10  $\mu$ M), el inhibidor de topoisomerasa I camptotecina (CPT, 10  $\mu$ M) o se

cultivaron en medio asérico durante 24 horas, antes de teñirse como en (J). A diferencia de SD, la recolocación nuclear completa de la caspasa-2 se produce durante el tratamiento con ionomicina y STS. La recolocación nuclear es parcial para CPT.

**Figura 15: La inhibición específica de caspasa-2 mediante Qco-VDVAD-dfp proporciona una mejor neuroprotección que la inhibición pan-caspasa por Q-VD-OPH contra lesión cerebral isquémica neonatal.**

(A) La escisión de VDVAD-AMC *in vitro* por caspasa-2 recombinante. La escisión de VDVAD-AMC 50  $\mu\text{M}$  por caspasa-2 humana recombinante (125 U) se midió después de 30 minutos a 37 °C antes de incubarse con inhibidores pan-caspasa selectivos (2  $\mu\text{M}$ ) ( $n \geq 2$ ). La actividad de la escisión de caspasa-2 se bloquea por el compuesto prototipo, Qco-VDVAD-dfp, tan eficazmente como por los inhibidores de caspasa-2 específicos (Ac-VDVAD-Cho, Z-VDVAD-FMK) y Q-VD-OPH. Mientras que la inhibición de la escisión por Z-VAD-FMK es menos importante, BOC-D-FMK es completamente inactivo contra la caspasa-2. El inhibidor similar a caspasa-3 (Z-DEVD-FMK) no interfiere altamente con la actividad caspasa-2. El inhibidor de calpaínas, E64d, se usa como control negativo. (B) Qco-VDVAD-dfp promueve la supervivencia de cultivos neuronales corticales con SD. Qco-VDVAD-dfp se administró a neuronas de seis días *in vitro* (DIV6) al inicio de SD durante 24 horas. La actividad caspasa-2, pérdida de  $\Delta\Psi_m$ , NA y PMP se determinaron por tinción FLICA, JC-1, Hoechst 33342 y 7-AAD, respectivamente ( $n = 2$ ). (C-E) La inhibición de caspasa-2 proporciona neuroprotección contra lesión cerebral isquémica *in vivo* neonatal: efecto de Q-VD-OPH y Qco-VDVAD-dfp sobre el volumen de infarto medido 48 horas después de isquemia. El fármaco se administró 5 minutos antes de la aparición isquémica y consistió en una sola inyección intraperitoneal del inhibidor (100  $\mu\text{g}/10\text{ g}$  en DMSO al 10 %,  $n=16$  y 12 respectivamente). También se estudiaron ratas isquémicas de control ( $n=15$ ). (C) Secciones coronarias representativas a nivel del hipocampo dorsal (placa 21) y comisura anterior (placa 12) se obtuvieron a partir de control isquémico y animales tratados con Qco-VDVAD-dfp y se tiñeron con violeta de cresilo. Obsérvese el infarto notablemente reducido en las ratas tratadas (animales con un volumen de infarto del 2%). La flecha indica la presencia y ausencia de un infarto en el mismo animal isquémico o tratado con Q-VDVAD, respectivamente. La barra representa 130  $\mu\text{m}$ . (D) Volúmenes de infarto medio en los grupos diferentes. Los datos son media  $\pm$  ETM. Q-VD-OPH y Q-VD-VAD-OPH indujeron respectivamente 44 y 74 % de reducción (+++ =  $p < 0,001$ , ensayo Kruskal-Wallis). (E) Los tratamientos con Qco-VDVAD-dfp y Q-VD-OPH proporcionan dos grupos con animales que muestran tanto un nivel de protección alto / total o bajo. Se representan los datos de volumen de infarto sencillos. Las barras horizontales gruesas y finas representan la mediana y la media del grupo, respectivamente. Obsérvese que 4 y 8 animales no mostraron infarto después de tratamiento con Q-VD-OPH y Qco-VDVAD-dfp, respectivamente.

**Figura 16. Escisión de VDVAD-AMC *in vitro* mediante la caspasa-2 humana recombinante**

La escisión de VDVAD-AMC 50  $\mu\text{M}$  por caspasa-2 humana recombinante (125 U) se midió después de 30 minutos a 37 °C antes de incubación con inhibidores selectivos o pan-caspasa (2  $\mu\text{M}$ ) ( $n \geq 2$ ). La actividad de escisión caspasa-2 se bloquea por el compuesto prototipo. Qco-VDVAD-dfp tan eficazmente como por los inhibidores de caspasa-2 específicos (Ac-VDVAD-Cho, Z-VDVAD-FMK) y el inhibidor pan-caspasa Q-VD-OPH. Aunque la inhibición de la escisión por Z-VAD-FMK es menos importante, BOC-D-FMK es completamente inactivo contra caspasa-2. Otros inhibidores específicos de caspasa-3 (Z-DEVD-FMK), caspasa-9 (Z-LEHD-FMK) y caspasa-8 (Z-LETD-FMK) no interfieren demasiado con la actividad caspasa-2. E64d, ALLN, ALLM que inhiben calpaína se usan como control negativo.

**Ref. Figura 17. Modelo hipotético de la ruta dependiente de caspasa-2 pre-mitocondrial**

Se describe una nueva ruta intrínseca en la activación pre-mitocondrial de caspasa-2 necesaria para promover la apoptosis en neuronas corticales. La eliminación de suero puede desencadenar la ruta apoptótica, en la que la activación de caspasa-2 puede mediar el control aguas arriba de Bax, un miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2. Bax se transloca y se integra en la membrana mitocondrial externa para inducir una disminución de  $\Delta\Psi_m$  y promover la liberación del citocromo c de una manera dependiente de caspasa-2. Por lo tanto la inactivación de caspasa-2 también anula acontecimientos aguas abajo, al igual que la activación dependiente de la liberación del citocromo c de caspasa-9 y caspasa-3, alteraciones morfológicas nucleares, exposición a fosfatidilserina y permeabilización terminal de la membrana plasmática. La localización citoplásmica exclusiva de caspasa-2 activa a lo largo de privación de suero larga pone de manifiesto un mecanismo de activación peculiar.

**Ref. Figura 18. La caspasa-2 está implicada durante la muerte celular inducida por lesión del ADN y precede a la pérdida de  $\Delta\Psi_m$  y PMP.**

Respuesta a la dosis de VP16 en ausencia o presencia de inhibidores de caspasa: A y B muestran el efecto protector de la inhibición de tipo caspasa-2 por el inhibidor de caspasa-2 específico (VDVAD = Z-VDVAD-FMK). El efecto del inhibidor pan-caspasa (OPH=Q-VD-OPH) también se investigó. (A)  $n=3$ , tinción JC-1/7AAD; (B)  $n=1$ , DioC6/PI.

**Ref. Figura 19. La activación de caspasa-2 precede a la pérdida de  $\Delta\Psi_m$  y posterior activación de caspasa (o caspasas).**

(A) El panel izquierdo muestra atributos apoptóticos característicos para la pérdida de  $\Delta\Psi_m$  (JC-2) y alteraciones nucleares (Hoechst) en células Jurkat tratadas con VP16 (10 mM, 7 horas). El panel de la derecha muestra el efecto del inhibidor pan-caspasa Q-VD-OPH o inhibidores de tipo caspasa-2 específicos (VDVAD=Z-VDVAD-FMK), de tipo caspasa-3 (DEVD=Z-DEVD-FMK), de tipo caspasa-9 (LE-HD=Z-LEHD-FMK), caspasa-8 (LETD=Z-LETD-FMK), respectivamente sobre la pérdida de  $\Delta\Psi_m$  (JC-1), activación de caspasa-2 y caspasa-3 (FLICA), PMP y alteraciones nucleares. Todos los inhibidores se ensayaron a 50  $\mu$ M. (B) Cuantificación por citometría de flujo del efecto de estos inhibidores sobre la pérdida de  $\Delta\Psi_m$  (JC-1) y PMP (7AAD) (8 horas). Cicloheximida; BA= ácido bongkrékico; DIDS= sal disódica de ácido 4,4'-Diisotiocianostilbem-2,2'-disulfónico; ActD= actinomicina D. (n=2-4)

**Ref. Figura 20. Reducción de la expresión del gen caspasa-2 mediante un ARNip específico**

(A) Los paneles izquierdo y derecho muestran que el ARNhip C2 wt puede disminuir el grupo de proteínas pro-caspasa-2 en células HeLa y Jurkat, respectivamente (análisis de Transferencia de Western; clon 11B4 para la detección de caspasa-2). (B) El rendimiento de transfección se comprobó en la célula por detección de fluorescencia (citometría de flujo, FL-1) en ARNip-FITC: casi el 100% tiene ARNip incorporado (24 horas).

**Ref. Figura 21. Reducción de la expresión del gen de caspasa-2 mediante un ARNip específico da como resultado la supervivencia de células Jurkat tratadas con VP16.**

(A) Efecto protector del ARNip (humano) en células Jurkat tratadas con VP16 (7-8 horas-10  $\mu$ M) (n=3). Los perfiles de citometría de flujo muestran que las células Z-VDVAD-FMK y ARNip C2 wt rescatadas tienen una morfología conservada (dispersión Directa) y que estas células son viables (exclusión 7AAD). Lipo = solo lipofectamine 2000.

**Ref. Figura 22. Secuencia y estructura del inserto hp derivado de la secuencia de ARNip C2 murina.**

(A). Se diseñaron los oligonucleótidos directo e inverso para hibridarse entre sí. Las secuencias en minúscula representan las secuencias sentido y antisentido del ARNip dirigido contra el ARNm C2 murino. Se añadieron salientes BamH I y Xba I respectivamente en los extremos 5' y 3' para mejorar la clonación en el vector pGE-1.

(B). La estructura del ARNhp hibridado ilustra las diferentes regiones funcionales del inserto de ARNhp.

**Ref. Figura 23. Nivel de expresión de caspasa-2 en células 3T3 después de transfección de construcciones de ARNhp-6 y ARNhp-9.** Análisis de **Transferencia de Western** de extractos totales 3T3 (15  $\mu$ g por carril) 24 o 48 horas después de transfección con pGE-1 vacío como control (carril pGE-1) o con vector pGE-1 que contiene el inserto de ARNhp (clones ARNhp-6 y ARNhp-9, carril ARNhp6 y ARNhp9). Se realizó un control solo con lipofectamine (carril lipo). Los carriles NT representan las células no tratadas.

**Ref. Figura 24. Secuencia y estructura del inserto hp derivado de la secuencia de ARNip C2 humana.**

(A). Se diseñaron los oligonucleótidos directo e inverso para hibridarse entre sí. Las secuencias en minúsculas representan la secuencia sentido y antisentido de ARNip dirigido contra el ARNm C2 humano. Se añadieron los salientes BamH I y Xba I respectivamente en los extremos 5' y 3' para mejorar la clonación en el vector pGE-1. (B). La estructura del ARNhp hibridado ilustra las diferentes regiones funcionales del inserto de ARNhp.

Abreviaturas: 7-AAD, 7-Amino Actinomicina D; fluoruro de 4-(2-Aminoetil)benzenosulfonilo, AEBSF, Pefabloc; ANT, translocador del nucleótido de adenina; BA, ácido bongkrékico; mCICCP, carbonilcianuro m-clorofenilhidrazona;  $\Delta\Psi_m$ , potencial transmembrana mitocondrial; FACS Separación Celular Activada por Fluorescencia; FLICA, Inhibidor de Caspasa Marcado con Fluorocromo; FSC, dispersión directa; FC, citometría de flujo; FM, microscopía de fluorescencia; JC-1, yoduro de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbencimidazolilcarbocianina; MFI, intensidad media de fluorescencia; PMT, tubo fotomultiplicador; SD privación de suero; SSC, dispersión lateral; MPTP, 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina; PS, fosfatidilserina; PTP, poro de transición de permeabilidad; Quinolin-Val-Asp(OMe)-CH2-O-Ph, Q-VD-OPH; SNP nitroprusiato sódico; z-DEVD-fmk, N-benciloxicarbonil-Asp-Glu(OMe)-His-Asp(OMe)-fluorometilcetona; z-VAD-fmk, N-benciloxicarbonil-Val-Ala-Asp(OMe)-fluorometilcetona.

**Ref. Ejemplo 1: Procedimientos para identificar el punto de comprobación; análisis multiparamétrico y dinámico de la apoptosis neuronal por citofluorimetría fija y en tiempo real**

Hasta hace poco, la apoptosis y necrosis de células neuronales se han investigado principalmente mediante dos tipos de estrategias: el primer grupo de técnicas (bioquímicas) evalúa acontecimientos tardíos de muerte neuronal generalmente por evaluación colorimétrica de actividad succinato deshidrogenasa mitocondrial (ensayo MTT) o

liberación extracelular de actividad lactato deshidrogenasa (ensayo LDH) (Johnson, 1995). Estas técnicas cuantitativas monoparamétricas rutinarias no proporcionan informaciones en lo que respecta al mecanismo de la muerte celular y no pueden combinarse con la detección de otros procesos bioquímicos. Más recientemente, se han publicado algunos protocolos de fraccionamiento celular adaptado a neuronas para la evaluación bioquímica de la translocación del citocromo c por inmunotransferencia y activación de caspasas usando sustratos fluorogénicos (Ethell y Green, 2002). Dichos procedimientos recientes proporcionan informaciones semicuantitativas sobre las poblaciones de neuronas pero excluyen análisis multiparamétricos y en tiempo real. El segundo grupo de técnicas utilizan lecturas de microscopía de fluorescencia (FM) para detectar modificaciones en orgánulos o proteínas relacionadas con la apoptosis. La mayoría de estos estudios FM se centran en alteraciones nucleares tardías incluyendo visualización de la morfología de la cromatina (tinción de Hoechst) y/o detección bioquímica de la fragmentación del ADN (ensayo TUNEL). En algunos estudios recientes de FM sobre neuronas, se ha publicado la inmunolocalización del citocromo c (en células fijas), pero a diferencia de otros campos de la biología celular, se usan un número limitado de estudios sobre neuronas en la detección *in situ* de alteraciones mitocondriales y activación de caspasas. Cuando se aplican a neuronas primarias cultivadas, los análisis basados en FM llevan mucho tiempo, son laboriosos y las cuantificaciones se ven obstaculizadas por agregados de cuerpos celulares y solapamiento de redes de neuritas. Además, el fotoblanqueo de sondas fluorescentes sensibles podría conducir a interpretaciones erróneas drásticas y excluyen seguimiento en tiempo real de acontecimientos relacionados con la muerte temprana. Por tanto, a nuestro entender, las características de biología celular de acontecimientos apoptóticos clave no se han documentado por completo ni ordenado en neuronas primarias.

La citometría de flujo (FC) ofrece un amplio intervalo de aplicaciones y se ha convertido en una herramienta principal de la biología celular y apoptosis. Aunque se aplica ampliamente a células sanguíneas primarias y líneas celulares cancerosas, sorprendentemente esta tecnología continúa sin utilizarse en neurociencia y generalmente se ha limitado a demostrar la pérdida tardía de contenido de ADN en células fijas (Yan y col., 1999; Fall y Bennet, 1999). La ausencia de aplicaciones de citometría de flujo apropiadas probablemente resulta de suposiciones de que la separación necesaria de neuronas de sus sustratos podría alterar la integridad de la membrana plasmática, destruir neuritas y/o desencadenar anoikis, impidiendo de esta manera un análisis fiable de apoptosis. Para superar estas limitaciones específicas (de neuronas), se usó un procedimiento de tripsinización simple para la separación no invasiva de neuronas primarias que mantiene la integridad de las neuronas y conserva una alta proporción de sus neuritas. Después, se desarrolló un procedimiento que combina la FC cuantitativa con análisis por FM detallados lo que permite la co-detección de las fases decisiva, efectora, temprana y tardía de degradación de la apoptosis. Usando sondas (vitales) de fluorescencia seleccionadas, esta doble lectura permite detectar – antes (por FM) y después (por FC) de tripsinización – el estado del potencial transmembrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), la activación de caspasa *in situ*, la exposición en la superficie de restos de fosfatidilserina y la pérdida de integridad de las membranas plasmáticas.

Usando neuronas corticales primarias de ratón inducidas para morir por privación de suero como un modelo sistémico, se demostró que la FC no solo concuerda con la FM sino que también es una tecnología rápida, sensible y cuantitativa para establecer el orden cronológico de los acontecimientos apoptóticos neuronales. Además, el área del análisis por FC se amplía a un control innovador en tiempo real de modificaciones de  $\Delta\Psi_m$  neuronal temprana y permeabilización de la membrana plasmática (PMP) en un periodo de minutos después de la adición de compuestos mitocondrio-activos. Tanto la FC en tiempo fijo como en tiempo real permite superar las limitaciones de la FM y ayudará a documentar y desarrollar la biología celular de la apoptosis neuronal.

#### - Análisis citofluorométrico de neuronas primarias vivas y muertas.

Pueden mantenerse con vida neuronas corticales primarias aisladas de ratones embrionarios de 14 días más de 10 días cuando se cultivan en células revestidas de polietilimina en un medio específico que contiene una mezcla de glucosa, suero equino y suero de ternero fetal (Kawamoto y Barrett, 1986).

En estas condiciones experimentales, la evaluación por microscopía de fluorescencia (FM) tanto de la condensación de la cromatina (Hoechst 33342; fluorescencia azul) como de integridad de la membrana plasmática usando el intercalador de ADN fluorescente impermeable a célula 7-amino-actinomicina D (7-AAD; fluorescencia roja) indica que la privación de suero conduce a una permeabilización de la membrana plasmática (PMP) de neuronas cultivadas (Fig. 1A). Esta PMP es un acontecimiento post-apoptótico dado que ocurre solamente en neuronas contraídas con cromatina condensada y neuritas desmanteladas (Fig. 1A). Por otro lado, cuando se induce PMP primaria (es decir necrosis) mediante una baja concentración de Tritón, no se detectan contracción celular ni condensación de cromatina (contraste de fase y fluorescencia Hoechst), pero 7-AAD penetra rápidamente en las neuronas y marca los núcleos (Fig. 1B). Para cuantificar sin ambigüedad la contracción neuronal y PMP en cualquier momento seleccionado durante la muerte celular, se establecieron condiciones de tripsinización que permiten conservar la integridad de las neuronas según se esperaba tanto por la ausencia de tinción con 7-AAD como por retención neuronal estable del colorante fluorescente CellTracker™ Verde no tóxico (Fig.1B, C). Por tanto, las neuronas pueden marcarse en primer lugar en su sustrato y observarse por FM, en segundo lugar tripsinizarse de manera segura y en tercer lugar someterse inmediatamente a análisis de citometría de flujo (FC) (Fig. 1D-G). Aparte de neuronas intactas negativas a 7-AAD (tripsinizadas) (88,4% +/- 7,6) en muestras de control, 47,1% (+/- 18,1) de neuronas privadas de suero durante 24 horas presentan PMP (7-AAD+), que se correlaciona con observaciones microscópicas y recuento antes de la tripsinización (Fig. 1E-G).

#### - Detección de las fases degradativa y efectora en neuronas corticales primarias apoptóticas.

La co-detección basada en FM de PMP (tinción 7-AAD) y exposición a fosfatidilserina (SD) relacionada con la apoptosis (anexina V conjugada con FITC; fluorescencia verde) indica que en las neuronas privadas de suero aparecen tres poblaciones de células; un subconjunto con tinción 7-AAD y anexina V conjugada con FITC (subconjunto 2; Fig. 2A) y dos subconjuntos con tinción 7-AAD (subconjunto 3) o tinción con anexina V conjugado con FITC (subconjunto 1). También se detectan los mismos subconjuntos después de la tripsinización por FC y el seguimiento cinético muestra que el subconjunto 1 precede al subconjunto 2 que precede al subconjunto 3 (Fig. 2B, C) conduciendo por tanto a la conclusión de que la exposición a PS se produce antes de la PMP. El primer acontecimiento nuclear detectable es una reducción nuclear progresiva significativa (perímetro) que precede a las modificaciones del tamaño de las neuronas (Fig. 2D, E). Este análisis en tiempo fijo de FC de neuronas puede ampliarse a la activación de caspasas (Fig. 3). De hecho, una co-detección *in situ* de la actividad similar a caspasa-3 utilizando un inhibidor marcado con fluorescencia verde de Caspasa (FLICA, FAM-DEVD-FMK) y PMP (tinción 7-AAD) proporciona resultados similares con FM (antes de la tripsinización) y FC (después de la tripsinización) demostrando que puede detectarse una actividad de tipo caspasa-3 antes de la PMP (Fig. 3A, B). Se obtienen similares resultados cuando la detección basada en FLICA de la actividad caspasa-3 se reemplaza por detección basada en anticuerpos *in situ* de la caspasa-3 activada (no mostrada). Cuando se añaden a neuronas al inicio de la privación de suero, tanto el inhibidor de caspasa de amplio espectro nuevo, Quinolin-Val-Asp (OMe)-CH<sub>2</sub>-O-Ph (Q-VD-OPH) (Melnikov y col., 2002) como el inhibidor del translocador de nucleótido adenina mitocondrial (ANT), el ácido bongkrékico (BA), impide fuertemente la activación de caspasa, la PMP y apoptosis nuclear (Figs. 3C, D). La cuantificación FC indica que a diferencia de lo que ocurre con el inhibidor pan-serina-proteasa 4-(2-aminoetil)-bencenosulfonil fluoruro (AEBSEF, Pefabloc), Q-VD-ORH inhibe 95,3 +/- 5,6% de actividad similar a caspasa-3 y 93,9 +/- 3,8% de PMP (7-AAD) inducido por privación de suero (Fig. 3D). Una cuestión no trivial es determinar, en un modelo de muerte celular determinado, la jerarquía entre la activación de caspasa y la exposición a PS. La co-detección FM *in situ* (antes de tripsinización) y FC (después de tripsinización) de actividad de tipo caspasa-3 usando FLICA conjugado con sulforrodamina (fluorescencia roja) y exposición a PS usando anexina V conjugada con FITC (fluorescencia verde) concuerdan demostrando que, después de la privación de suero, la actividad caspasa-3 precede la exposición a PS en neuronas primarias (Fig. 3E, F). Debe observarse que el análisis simultáneo del estado de la cromatina (Hoechst; fluorescencia azul) por FM indica que la actividad caspasa-3 temprana está temporalmente asociada con una primera etapa de condensación nuclear (fase I de acuerdo con la clasificación de Susin; Susin y col., 1999), aunque (Fig. 3E, 4E) la fragmentación del núcleo terminal en cuerpos apoptóticos individuales (morfología de Fase II, Susin y col., 1999) se produce después del inicio de la exposición a PS. Desconcertantemente, tanto el inhibidor pan caspasa de referencia z-VAD-fmk como el inhibidor de tipo caspasa-3 más restringido z-DEVD-fmk inhibe fuertemente la activación de caspasa-3, pero no la fase degradativa (es decir exposición a PS, condensación nuclear y PMP) de la apoptosis neuronal (Fig. 3D), indicando así que la actividad relacionada con la caspasa-3 no es esencial para la muerte neuronal en estas condiciones experimentales. Por otro lado, la codetección *in situ* del estado de la cromatina (Hoechst) y actividad similar a caspasa-9 usando un Inhibidor Marcado con Fluorescencia Verde de Caspasa (FLICA, FAM-LEHD-FMK) en presencia o en ausencia del inhibidor de caspasa-9 z-LEHD-fmk revela que la anulación de la actividad similar a caspasa-9 conduce a un fenotipo intermedio de apoptosis nuclear en la que la mayoría de los núcleos están detenidos en la primera etapa de condensación nuclear (fase I; Fig. 3G). Además, tanto el análisis FM como FC concuerdan para demostrar que la inhibición de caspasa-9 anula la exposición a PS y PMP (Fig. 3G, H). Por tanto, como el BA impide la activación similar a caspasa-9 (Fig. 3H), la estrategia de doble lectura sugiere fuertemente que el punto de ejecución de la caspasa-9 en este modelo experimental es aguas abajo de las mitocondrias y aguas arriba de la exposición a PS y la apoptosis nuclear de fase II.

#### 45 - Detección de la fase mitocondrial/decisiva de la apoptosis neuronal.

La tinción de neuronas primarias cultivadas con el colorante sensible a  $\Delta\Psi_m$  JC-1 seguido de análisis por FM revela una pérdida progresiva de  $\Delta\Psi_m$ . Por tanto, antes de la privación de suero, las neuronas procedentes de las mitocondrias poseen un alto  $\Delta\Psi_m$  (fluorescencia JC-1 naranja; Fig. 4A), mientras que las mitocondrias de neuronas privadas de suero durante 8-24 horas tienen un  $\Delta\Psi_m$  bajo (fluorescencia JC-1 verde; Fig. 4A). La pérdida de  $\Delta\Psi_m$  continuó heterogéneamente sin ninguna jerarquía geográfica aparente, proporcionando un fenotipo transitorio intermedio en el que puede detectarse heterogeneidad en la misma neurona (Fig. 4A; Dec). Esto sugiere que al menos en este sistema experimental no existe pérdida de  $\Delta\Psi_m$  coordinada simultánea, sino en su lugar una transmisión progresiva de la señal de colapso de mitocondria a mitocondria. La alteración completa de  $\Delta\Psi_m$  se observa antes de cualquier signo de apoptosis nuclear según se esperaba por tinción Hoechst (Fig. 4A; fluorescencia azul). Como se esperaba, la cocuantificación basada en FM y FC de la pérdida de  $\Delta\Psi_m$  (JC-1) y PMP (tinción con 7-AAD) concuerdan para demostrar que la pérdida de  $\Delta\Psi_m$  se inhibe por BA y precede a PMP en neuronas privadas de suero (Fig. 4B-E). Experimentos cinéticos basados en la codetección de  $\Delta\Psi_m$  (usando el colorante sensible a  $\Delta\Psi_m$  CMX-Ros) y actividad similar a caspasa-3 (FLICA, FAM-DEVD-FMK), sugiere que la pérdida de  $\Delta\Psi_m$  precede la activación de caspasa-3 (no mostrada). Por consiguiente, la inhibición de la activación de caspasa-3 por z-DEVD-fmk no tiene efecto sobre la pérdida de  $\Delta\Psi_m$  inducida por SD (Fig. 4E).

### - Detección en tiempo real de $\Delta\Psi_m$

La implicación temprana de las mitocondrias en la apoptosis neuronal requiere la monitorización de respuestas de  $\Delta\Psi_m$  rápidas a exposición de fármacos. La detección de tiempo real de  $\Delta\Psi_m$  por FM puede desvirtuar los análisis ya que las adquisiciones repetitivas provocan un fotoblanqueo drástico de la sonda (detectado como una disminución de la fluorescencia naranja JC-1), lo que podría atribuirse erróneamente a una pérdida de  $\Delta\Psi_m$  relacionada con la apoptosis (Fig. 5A, B). Para superar este inconveniente instrumental, se desarrolló una estrategia de FC en tiempo real en la que, a diferencia del protocolo FC en tiempo fijo, las neuronas se tripsinizan primero y después se marcan para detectar  $\Delta\Psi_m$  (JC-1) y PMP (7-AAD) a lo largo del tiempo (Fig. 5C). En estas condiciones, las observaciones FM revelan que las neuronas tripsinizadas no presentan PMP y mantienen un alto  $\Delta\Psi_m$  hasta 3 horas (Fig. 5C). Debe observarse que no se detectan señales de anoikis durante las 5 primeras horas de post-tripsinización. El registro de FC durante 20 minutos confirma que neuronas tripsinizadas aún tienen un  $\Delta\Psi_m$  elevado estable y son impermeables a 7-AAD, es decir mantienen una membrana plasmática intacta (Fig. 5D2-3). La adición del desacoplador de cadena respiratoria, carbonilo cianuro m-clorofenilhidrazona (mCICCP) a neuronas no tripsinizadas induce la alteración de  $\Delta\Psi_m$  (Fig. 5D-1). La monitorización de FC en tiempo real revela que una pérdida de  $\Delta\Psi_m$  de la población neuronal es máxima después de 2 minutos de tratamiento con mCICCP (Fig. 5D-2,3). La codetección FM de PMP (7-AAD) y  $\Delta\Psi_m$  (JC-1) de cultivos de neuronas no tripsinizadas tratadas con la toxina mitocondrial 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) indica que después de 45 minutos la mayoría de las neuronas tienen un bajo  $\Delta\Psi_m$  sin ningún síntoma de PMP (Fig. 6A-1). Por otro lado, las neuronas corticales tratadas o no con el SNP inductor de óxido nítrico mantienen un  $\Delta\Psi_m$  elevado (Fig. 6). Como se esperaba el etanol induce un rápido PMP según se esperaba por incorporación masiva de 7-AAD en neuronas cultivadas (Fig. 6A-1). Cuando se aplica FC en tiempo real a una evaluación simultánea de PMP,  $\Delta\Psi_m$ , tamaño celular y granulosidad de neuronas corticales, esta técnica indica que, después de 15 minutos, el 49,6% (+/- 8,2; n=4) de las neuronas tratadas con MPTP tienen un bajo  $\Delta\Psi_m$  mientras que el 16,2% (+/- 1,2) de neuronas no tratadas y 15,0% (+/- 6,2) de neuronas tratadas con SNP tienen un  $\Delta\Psi_m$  bajo. FC en tiempo real revela que, a diferencia de MPTP y SNP, el tratamiento con etanol induce necrosis primaria. De hecho, el etanol desencadena una PMP muy rápida (98% después de 5 minutos) que precede a una pérdida de  $\Delta\Psi_m$  (75% después de 5 minutos) (Fig. 6). Resulta interesante que la pérdida de  $\Delta\Psi_m$  inducida por MPTP es heterogénea dado que las neuronas que se someten a una disminución rápida de  $\Delta\Psi_m$  presentan un incremento de granularidad significativo mientras que las neuronas que se someten a una reducción ligera de  $\Delta\Psi_m$  no presentan modificaciones morfológicas (Fig. 6).

Considerados en su conjunto estos resultados muestran que el análisis por FC en tiempo real es una estrategia simple para seguir cuantitativamente los acontecimientos PMP a corto plazo y modificaciones de  $\Delta\Psi_m$  en una base por neurona.

Usando neuronas corticales primarias de ratón privadas de suero como un modelo del sistema se observa después que: 1) las muestras neuronales pueden multimarcarse con sondas relacionadas con apoptosis y analizarse sucesivamente mediante FM, separarse de manera segura de su soporte y estudiarse cuantitativamente mediante FC sin fijación, 2) informaciones cinéticas y farmacológicas obtenidas con esta metodología de doble lectura permite describir y ordenar sin ambigüedad las fases principales (decisiva, ejecutora y degradativa) de la apoptosis neuronal, 3) las neuronas también pueden separarse primero de su soporte, después marcarse con sondas vitales y analizarse mediante FC en tiempo real durante 3 horas, ofreciendo así la posibilidad de evaluar acontecimientos a corto plazo de muerte neuronal incluyendo la discriminación entre necrosis primaria (es decir cuando la PMP precede a la pérdida de  $\Delta\Psi_m$ ) y respuestas celulares relacionadas con la apoptosis con respecto a un estímulo determinado.

La FC ofrece algunas ventajas específicas (Tabla 1). En primer lugar, cualquiera que sea el nivel inicial de agregación de neuronas en cultivo, la FC permite conseguir rápidamente una cuantificación representativa de apoptosis y acontecimientos relacionados en un elevado número de neuronas (40.000 por muestra en este estudio). En segundo lugar, la FC puede detectar sondas intracelulares con bajos niveles de fluorescencia que podrían ponerse fuertemente de manifiesto mediante FM. Esta ventaja puede atribuirse a una mejor capacidad de los tubos fotomultiplicadores del citómetro (FC) para discernir células débilmente fluorescentes, en comparación con cámaras con dispositivos acoplados de carga (CCD) (FM). En tercer lugar la FC también supera problemas inducidos clásicamente durante observaciones FM incluyendo fotoblanqueo de sondas (como es el caso para la detección de  $\Delta\Psi_m$  mediante JC-1), la lesión celular inducida por iluminación de epifluorescencia alargada y/o efectos fototérmicos. Por ejemplo, el fotoblanqueo con JC-1 es mínimo con FC debido a una radiación neuronal débil (15 mili vatios, longitud de onda monocromática) en comparación con FM (5 vatios, longitudes de onda policromáticas) y el pase celular extremadamente corto (y único) a través del haz de láser. En cuarto lugar, la FC en tiempo real autoriza análisis cuantitativos de membrana plasmática a corto plazo y modificaciones de membrana interna mitocondrial a los escasos minutos después de la adición de cualquier fármaco neuroactivo. En quinto lugar, pueden ampliarse análisis multiparamétricos mediante el uso de citómetros más poderosos que pueden investigar hasta en 14 parámetros individuales.

También se demuestra que las neuronas SD experimentan procesos apoptóticos que obedecen a las siguientes reglas (Figura 7). En primer lugar, las neuronas SD manifiestan signos de disipación de  $\Delta\Psi_m$  a través de un proceso dependiente relacionado con ANT. En segundo lugar, la disipación de  $\Delta\Psi_m$  se produce aguas abajo de la activación

de caspasas 3 y 9. En tercer lugar, la exposición a PS y condensación nuclear completa (fase II) está subordinada a la actividad de tipo caspasa-9 pero no depende de la actividad de tipo caspasa-3. Paradójicamente, neuronas SD tratadas 24 horas con Z-VAD.fmk no presentan actividad de tipo caspasa-3 pero experimentan exposición a PS, apoptosis nuclear de fase II y PMP final, mientras que todos estos acontecimientos se bloquean completamente mediante la tercera generación de inhibidor pan-caspasa Q-VD-OPH. Por tanto, los resultados anteriores revelan una ruta caspasa dependiente de mitocondria inusual que se activa en neuronas corticales primarias durante la apoptosis inducida por la eliminación de suero.

Esta tecnología citofluorométrica también se usa para investigar la dinámica de apoptosis de neuronas en respuesta a otros estímulos, incluyendo ceramida, péptidos  $\beta$  amiloides, ácido 3-nitropropiónico, glutamato y proteínas virales. El análisis también se amplió para detectar la activación de otras caspasas implicadas en la apoptosis neuronal. Estos análisis citofluorométricos también pueden permitir una mejor caracterización de tipos aún poco conocidos de muerte, tal como la forma no apoptótica de muerte programada de neuronas primarias corticales, estriatales y del hipocampo tratadas mediante la sustancia P, y hacen posible diferenciar entre muertes de tipo necrosis y apoptosis en modelos en los que coexisten ambas tales como lesión isquémica.

Por tanto, las tecnologías desarrolladas de acuerdo con la invención son potentes para investigar la biología celular de la apoptosis neuronal y proporcionan una herramienta cuantitativa multiparamétrica para explorar y caracterizar los compuestos neurotóxicos y neuroprotectores.

### Procedimientos experimentales

#### Aislamiento y cultivo de neuronas corticales

Se aislaron neuronas corticales primarias de neocórtex de ratones Swiss embrionarios de 14 días (Janvier, Le Genest-St-Isle, Francia). Las neuronas se sembraron en placas a una densidad de  $7 \times 10^5$  células vivas por  $\text{cm}^2$  en 500  $\mu\text{l}$  de Medio Basal de Eagle (EBM, Eurobio, Les Ulis, Francia) complementado con suero equino al 5% (HS, Eurobio) y suero fetal de ternero al 2,5% (FCS, Eurobio) en placas de 24 pocillos (Sarstedt, Orsay, Francia) o cubreobjetos con cámaras Lab-Tek (Nalge Nunc International, Naperville, IL, Estados Unidos) revestidos con polietilénimina (PEI, 1 mg/ml, Sigma, St Quentin Fallavier, Francia). Después de 2 días, el medio de cultivo se reemplazó por medio N5 (Kawamoto y Barrett, 1986) que contenía glucosa 180 mg/l, HS al 5% y FCS al 1% y 3  $\mu\text{M}$  de citosina  $\beta$ -D-arabinofuranósido (Ara C, Sigma) y 1  $\mu\text{M}$  de 5-metil-10, 11-dihidro-5H-dibenzociclohepten-5,10-imin maleato (MK-801, Research Biochemicals International) (Knusel y col., 1990) y se cambió diariamente. La apoptosis se indujo en cultivos de 5 días por la retirada de suero (Macleod y col., 2001). Se evaluó la pureza del cultivo (> 95%) con un anticuerpo monoclonal anti Proteína 2 Asociada a Microtúbulos (MAP-2, Sigma) y un anticuerpo policlonal anti-Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP, Dako).

#### Tripsinización de neuronas corticales

Se realizó la separación enzimática de las neuronas después de un cuidadoso lavado en medio N5 asérico e incubación con 250  $\mu\text{l}$  de Tripsina-EDTA (Gibco BRL, RU) a 37 °C durante 15 minutos. La separación celular se realizó con 5 lavados de agua cuidadosos utilizando puntas de 1000  $\mu\text{l}$  (Gilson). Los restantes agregados neuronales se disociaron mediante una punta de 200  $\mu\text{l}$  con 10 lavados abundantes cuidadosos con 500  $\mu\text{l}$  de medio N5. Para la validación del procedimiento de tripsinización, las neuronas adherentes se tiñeron con CellTracker Green™ 100  $\mu\text{M}$  (Molecular Probes, Eugene, OR) durante 15 minutos a 37 °C, se lavaron en medio N5 y se sometieron a tripsinización. El análisis de las neuronas se realizó por citometría de flujo (canal FL-1) y microscopía (BP 480/40 para excitación y BP 527/30 para emisión). Como control positivo se usó tratamiento con Triton X-100 (Sigma) (0,02%) para la alteración de la membrana plasmática.

#### Instrumentación

Se realizó Separación Celular Activada por Fluorescencia utilizando un citómetro FACSCalibur tricolor equipado con un láser de argón de 488 nm enfriado con aire 15 mW (Becton Dickinson, San Jose, CA). Para cada muestra, se registraron los datos de 40.000 neuronas y se analizaron con el programa informático CellQuest Pro™ (Becton Dickinson). El caudal de la muestra se estableció en 12  $\mu\text{l}$  +/- 3  $\mu\text{l}/\text{min}$  para análisis en tiempo real y a 60  $\mu\text{l}$  +/- 3  $\mu\text{l}/\text{min}$  para experimentos de tiempo fijo. Se realizó microscopía de fluorescencia (FM) con un microscopio de fluorescencia invertido DM IRB (Leica, Rueil-Malmaison, Francia) equipado con una lámpara de arco corto de mercurio de 100 W y un objetivo X 40 N PLAN L o un objetivo X 100 N PLAN de inmersión en agua (Leica, Wetzlar, Alemania). Se tomaron fotografías a una resolución de 1300 x 1030 píxeles con una cámara de color CCD (Leica DC 300F, Leica, Francia) y se controló mediante el programa informático Leica QFluoro (Leica Microsystem AG, Suiza). Los datos se conservaron para el análisis fuera de línea con el programa informático IM1000 (Leica Microsystem AG) realizado utilizando el programa informático Leica QFluoro.

#### Detección de la fase degradativa de la apoptosis mediante la incorporación de 7-amino actinomicina D

La pérdida de la integridad de la membrana plasmática se detectó a través de un aumento de la permeabilidad a 7-amino actinomicina D (7-AAD, Sigma) (Schmid y col., 1992; Carpenter y col., 1997; Lecoeur y col., 2002). Se

añadieron 20 µg/ml de 7-AAD a neuronas cultivadas durante 15 minutos a 37 °C. Se realizó análisis FM a través de una excitación de 100 ms utilizando un filtro BP 515-560 y se detectó la fluorescencia de 7-AAD a través de un filtro de largo alcance LP 590. Las células se tripsinizaron e inmediatamente se analizaron en el citómetro de flujo (canal FI-3,  $\lambda > 650$  nm, PMT = 333). Los cuerpos/restos apoptóticos se descartaron del análisis como se describe para el crecimiento de células en suspensión (Lecoeur y col., 1997).

#### **Detección de las fases degradativas temprana y tardía usando FITC-anexina V y 7-AAD**

La exposición a fosfatidilserina (PS) de la capa externa de la membrana plasmática se detectó mediante la fijación de anexina V conjugada con FITC (KIT de detección de la Apoptosis, R&D System). Se añadieron 20 µg/ml de 7-AAD y 1X anexina V en 200 µl de tampón enriquecido con  $Ca^{2+}$  (KIT de detección de Apoptosis) durante 20 minutos a TA. Para los experimentos FM, la anexina V-FITC se excitó a través del filtro BP 480/40 y la luz emitida se recogió utilizando el filtro BP 527/30. La detección por FC de la fluorescencia de anexina V-FITC se realizó en el canal F1-1 (530 +/- 15 nm), y se analizó en un modo de amplificación lineal, (tensión PMT = 867, ganancia de amplificación = 9,00). Se impidió el solapamiento espectral ajustando la red de compensación de la siguiente manera: FL2 – 22,9% FL1 y FL2 – 41,7% FL3.

#### **Detección combinada de las fases efectora y degradativa utilizando FLICA, anexina V y 7-AAD**

La actividad caspasa-3 y caspasa-9 se detectó utilizando FAM-DEVD-FMK y FAM-LEHD-FMK, ambos Inhibidores de Caspasa Marcados con Fluorocromo (FLICA) (Kits de Actividad de Caspasa con fluoresceína CaspaTag™, Intergen, NY) (Lecoeur y col., 2002; Smolewski y col., 2002). Las neuronas se incubaron con 1/150 de la solución madre DMSO del FLICA durante 1 hora a 37 °C. Se añadieron 7-AAD y Hoechst durante los últimos 15 minutos. Después las neuronas se lavaron tres veces en tampón de lavado (Kit CaspaTag™). Para la formación de imágenes por FM, los FLICA se excitaron a través del filtro BP 480/40 y la luz emitida se recogió a través del filtro BP 527/30. Para el análisis por FC, la fluorescencia FLICA se recogió a través del canal F1-1 (tensión PMT = 501, red de compensación: FL1 – 7,8% FL2, FL2 – 40,8% FL1 y FL2 – 45,4% FL3). La caspasa-3 escindida se puso de manifiesto en la célula por inmunodetección usando anticuerpos policlonales conjugados con Ficoeritrina (PE) (Beckton Dickinson). Las neuronas se tiñeron con 7-AAD, se tripsinizaron y se fijaron en PBS que contenía PFA al 1% y 20 µg/ml de Actinomicina D (AD) durante 20 minutos. Después, las neuronas se resuspendieron en PBS 100 µM, BSA al 1%, AD 20 µg/ml, saponina de corteza de *Quillaja* al 0,05% (Sigma) y 20 µl de los anticuerpos anti-caspasa-3 durante 30 minutos a TA (Lecoeur y col., 2001). Después de lavados en PBS, se analizó la fluorescencia relacionada con PE en el citómetro (canal FI-2). Z-val-Ala-Asp(OMe)-FMK (Z-VAD-FMK), Quinolina-Val-Asp(OMe)-CH2-O-Ph (Q-VD-OPH), Z-DEVD-FMK (Z-Leu-Glu(OMe)-His-Asp(OMe)-fmk, ICN) y Z-LEHD-FMK (Z-Asp(OMe)-Glu(OMe)-Val-Asp(OMe)-FMK, todos adquiridos en ICN (Orsay, Francia), y el fluoruro de 4-(2-Aminoetil)-bencenosulfonilo (AEBSF, Pefabloc SC, Roche, Meylan, Francia) se añadió a 100 µM al inicio de la privación de suero. La sulforrodamina-DEVD-FMK (Kit de Actividad Rojo CaspaTag™) permitió detectar la caspasa-3 activada y la Anexina V-FITC. Las neuronas se incubaron con 1/900 de la solución de reserva DMSO del FLICA, y 1X anexina V-FITC en 200 µl de tampón de anexina durante 30 minutos a 37 °C. Después las neuronas se lavaron tres veces en un tampón compuesto por tampón de lavado al 50% y tampón de anexina al 50%. La actividad caspasa-3 se detectó en el canal F1-2 (585 +/- 21 nm). Para FM, FLICA se excitó a través del filtro BP515-560 y su fluorescencia se recogió a través del filtro de emisión de largo alcance LP590.

#### **Detección del tiempo fijo de la fase de decisión de la apoptosis usando JC-1 y 7-AAD.**

El potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) se evaluó por la incorporación de yoduro de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbencimidazolilcarbocianina (JC-1, Molecular Probes, Eugene, OR). Las neuronas se cotiñeron con JC-1 y 7-AAD 1 µM durante 15 minutos a 37 °C. Se detectaron monómeros JC-1 por FC en el canal FI-1 (tensión PMT = 644). Los agregados J se detectaron a través del canal F1-2 (tensión PMT = 451) (Reers y col., 1991). La tensión PMT para la detección de 7-AAD fue de 326. Red de compensación: FL1 – 0,0% FL2, FL2 – 22,9% FL1, FL2 – 41,7% FL3 y FL3 -0,7% FL2. Para el análisis por FM, se registraron simultáneamente las fluorescencias verde y naranja después de una excitación de 1,2 s (filtros de excitación BP 450-490 / emisión de largo alcance LP 515). El fotoblanqueo se impidió atenuando la radiación con 5% de la luz de incidencia inicial mediante un filtro de densidad neutra N20. El Ácido Bongkrékico (BIOMOL,) se ensayó a 25 µM.

#### **Detección en tiempo real del potencial transmembrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) y morfología neuronal**

Se realizaron experimentos en tiempo real en neuronas cultivadas durante 5 días justo después de la tripsinización. Las neuronas se resuspendieron en medio N5, se ajustaron a  $0,7 \times 10^6$  células/ml y se cargaron con JC-1 800 nM durante 15 minutos a 37 °C. Después, las muestras se diluyeron a 1/8 en medio N5 y se añadieron 20 µg/ml de 7-AAD. La morfología basal y  $\Delta\Psi_m$  y la permeabilidad de la membrana se registraron durante 5 minutos y se añadieron los fármacos; cianuro de Carbonilo m-clorofenilhidrazona 100 µM (mCICCP, Sigma), 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina 1 µM (MPTP, Sigma) y Nitroprusiato Sódico 0,6 µM (SNP, Sigma). El MPTP es una toxina del complejo I mitocondrial y un inductor de la apoptosis utilizado *in vivo* para reproducir Parkinsonismo en ratones y primates (Speciale, 2002). Se registraron variaciones de cada parámetro durante los siguientes 15 minutos. Se trazaron las curvas usando el programa informático Microsoft Excel.

### Tinción de núcleos por Hoechst 33342 y mediciones del perímetro nuclear

Las neuronas se incubaron durante 15 minutos con Hoechst 33342 1  $\mu$ M (Ho 342, Sigma) y se analizaron mediante FM (exposición de 5 milisegundos (filtro de excitación BP 340-380/ filtro de largo alcance LP 425). El perímetro de los núcleos se midió creando regiones individuales de interés procesando máscaras usando el programa informático Leica Q Fluoro expresado en unidades arbitrarias.

### Análisis estadístico

Se realizó estadística usando el programa informático Microsoft Excel. Se calcularon correlaciones por análisis de regresión lineal. Para cada análisis, se indica la  $R^2$ . Se realizó ensayo de la t de Student no correlacionado para comparar porcentajes de células en las diferentes fases de la apoptosis. Como significativo se consideró un valor de  $p < 0,05$ .

### Ejemplo 2: inhibición/silenciamiento de caspasa-2 en muerte celular *in vitro* e *in vivo* neuronal

La inhibición de pancaspasa promueve la supervivencia de neuronas corticales primarias inducidas a morir por privación de suero.

Durante el desarrollo de patología neuronal, las neuronas que no encuentran apropiado soporte trófico y fuentes de factores tróficos derivados de dianas se someten a muerte celular apoptótica. La privación de suero (SD) de neuronas corticales primarias, un modelo *in vitro* de lesión neuronal aguda, conduce a la muerte celular apoptótica. Estudiando la jerarquía y ordenamiento temporal de las características apoptóticas durante la SD, se ha descrito una ruta de tipo intrínseca en la cual la modificación del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) se produce aguas abajo de la apoptosis nuclear (NA) (condensación/fragmentación en cuerpos apoptóticos), de la exposición a fosfatidilserina (PS) en la lámina externa de la membrana plasmática, y permeabilización terminal de la membrana plasmática (PMP). Estos resultados demuestran las respuestas frente al tiempo de dichas características apoptóticas durante 50 horas SD (Figura 8A). Por claridad, la cinética de la aparición de las neuronas con  $\Delta\Psi_m$  bajo, NA, ectoexposición a PS o PMP reflejan todos los subconjuntos intermedios con alteraciones progresivas. En estas condiciones experimentales, la mayoría de las neuronas se involucra al mismo tiempo en cada proceso.

Debido a la función crítica de las caspasas en diferentes paradigmas de la apoptosis, los requisitos de las caspasas se han evaluado durante SD en neuronas corticales. Cuando se añaden al inicio de la privación de suero, neuronas SD se recuperan principalmente por tratamiento continuo con Quinolin-Val-Asp(OMe)-CH<sub>2</sub>-O-Ph (Q-VD-OPH), una nueva generación de inhibidores de caspasa de amplio espectro, dando como resultado una alta conservación de  $\Delta\Psi_m$  y morfología nuclear, membrana plasmática intacta así como la ausencia de exposición a PS (Figura 8B). Por otro lado, ni Z-VAD-FMK ni BOC-D-FMK (BOC-D) pueden retrasar o anular la muerte celular asociada con SD (Figura 1B). Debe observarse que la morfología nuclear y tanto la integridad de las neuritas como la red neurítica parece estar bastante conservada en neuronas recuperadas a las 24 horas por Q-VD-OPH (Figura 8C). No obstante, su soma es ligeramente más pequeño. Utilizando sustratos fluorescentes específicos, las actividades de tipo caspasa-2, caspasa-3, caspasa-8 y caspasa-9 en célula se detectaron a las 24 h-SD (Figura 8D). El bajo nivel de la activación de tipo caspasa-8 durante SD sugiere que la ruta extrínseca no es preponderante en este modelo. Todas estas actividades de las caspasas están completamente inactivadas por cotratamiento con Q-VD-OPH (Figura 8D). Se realizaron investigaciones para determinar si la supervivencia podía mejorarse por Q-VD-OPH durante exposiciones mediante otros estímulos neurodegenerativos dependientes de caspasa no relacionados: ionomicina ionóforo Ca<sup>2+</sup> (excitotoxicidad), el nitroprusiato de sodio (SNP) donante de NO, el péptido  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ A) (25-35) y toxinas mitocondriales tales como 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) o el ácido 3-nitropropiónico (3-NPA). Estos fármacos inducen la apoptosis (se controlaron NA y PMP), pero el tratamiento simultáneo con Z-VAD-FMK o Q-VD-OPH no proporciona protección, excepto para el  $\beta$ -amiloide, que es de acuerdo con informes previos (Figura 8E). Estos hallazgos refuerzan la implicación específica de las caspasas durante la SD en neuronas corticales.

Para garantizar la importancia de la activación de la caspasa primaria en el modelo del sistema ensayado, se realizó una inhibición farmacológica de diversas rutas de señalización y metabólicas utilizando las siguientes familias de compuestos (Tabla I): agentes que se dirigen a poros de transición de permeabilidad (PTP) y mitocondrias, modulador de la captación de calcio mitocondrial, quelante de calcio citoplásmico, inhibidores de proteasas (calpaínas, serina proteasas, proteasoma o catepsinas lisosomales), inhibidores del ciclo celular, inhibidores de quinasas y fosfatasa implicadas en las rutas de transducción de señal, agentes que interfieren con la endocitosis y procesos de autofagia, antioxidantes, inhibidores de la exportación nuclear de proteínas. Casi todos los compuestos ensayados no impiden la muerte celular evocada por SD. Del mismo modo, agentes peiotrópicos cicloheximida y actinomicina D, que inhiben la traducción y la traslación, promueven la supervivencia de las neuronas corticales sometidas a SD (Tabla I).

### Se requiere actividad caspasa-2 pre-mitocondrial para la muerte celular apoptótica de neuronas corticales inducida por privación de suero

El hecho de que un acontecimiento temprano, tal como la pérdida de  $\Delta\Psi_m$ , se impida por Q-VD-OPH plantea las cuestiones de la importancia de la caspasa (o caspasas) (pre-mitocondrial) en el presente modelo y la especificidad

de Q-VD-OPH. Para identificar la actividad caspasa más proximal responsable de la muerte celular en el modelo SD, se utilizó un panel de inhibidores de caspasa más selectivos y se analizó su impacto sobre diversos parámetros de muerte celular (Figura 9A): Z-DEVD-FMK, Z-LEHD-FMK, Z-VDVAD-FMK y Z-LETD-FMK que inhibe respectivamente actividades de tipo caspasa-3, -9, -2 y -8. Parece que únicamente Z-VDVAD-FMK, un eficaz inhibidor de la actividad de tipo caspasa-2 (Figura 9 D) puede anular la pérdida de  $\Delta\Psi_m$  así como de otras características de la apoptosis (NA, PMP, y exposición a PS), y proteger a las neuronas contra la muerte (Figuras 9A y 9B). Para caracterizar mejor el perfil inhibitorio de Q-VD-OPH y Z-VDVAD-FMK, se determinó un patrón mejor para la neuroprotección. La apoptosis se inhibió por Q-VD-OPH y Z-VDVAD-FMK de una manera dependiente de la concentración, reforzando que la cascada caspasa se active durante SD en neuronas corticales (Figura 10). Considerando la alta densidad del cultivo ( $7 \times 10^5$  por  $\text{cm}^2$ ), se proporcionó el mayor efecto protector mediante 100  $\mu\text{M}$  de cada inhibidor, que es la concentración utilizada en este estudio. La adición de estos inhibidores (100  $\mu\text{M}$ ) al inicio de SD es el mejor patrón para la neuroprotección inducida por Q-VD-OPH- o Z-VDVAD-FMK, dado que los tratamientos con los inhibidores retrasados durante 2-6 horas de retirada postsuero son menos eficaces (Material Complementario; Figura 10). Además, la activación similar a caspasa-2 se detecta a las 2 horas de SD y precede tanto primeras señales de disminución de  $\Delta\Psi_m$  (8 horas) y alteraciones nucleares adicionales (Figura 9C). En su conjunto, estos descubrimientos muestran que una actividad de tipo caspasa-2 pre-mitocondrial es la actividad caspasa más proximal necesaria para la apoptosis inducida por SD en neuronas corticales. La actividad de tipo caspasa-2 se anula por Z-VDVAD-FMK pero no por Z-DEVD-FMK, Z-LEHD-FMK o Z-LETD-FMK (Figura 9D). A diferencia las actividades similares a caspasa-3 y caspasa-9 se inhiben por Z-VDVAD-FMK demostrando así que la activación de tipo caspasa-2 es aguas arriba tanto de las actividades de tipo caspasa-3 como de caspasa-9 (Figura 9D). Aunque la anulación respectiva de las actividades de tipo caspasa-3 y caspasa-8 (Figura 9D), Z-DEVD-FMK y Z-LETD-FMK no protegen a las neuronas de SD (Figuras 9A y 9B), indicando así que la actividad relacionada con la caspasa-3 y que el reclutamiento de la caspasa-8 no son esenciales para la degeneración neuronal. Adicionalmente, el inhibidor de caspasa-8 tampoco bloquea la activación de las caspasas-2, -3 o -9 (Figura 9D). El inhibidor de caspasa-9 Z-LEHD-FMK no altera la disminución de  $\Delta\Psi_m$  mientras que retrasa e impide la formación de cuerpos apoptóticos pero no la exposición a PS condensación (NA) de fase I ni la PMP (Figuras 9A y 9B).

Estos datos demuestran que la caspasa-2 actúa aguas arriba de MMP y que la caspasa-9 actúa aguas abajo de MMP durante la SD.

Para confirmar esta evaluación, se había investigado una comprobación genética para la apoptosis mediadas por la actividad de caspasa-2 inducida por SD. El análisis de secuencia de la caspasa-2 murina condujo al diseño del ARN de interferencia pequeño específico (ARNip C2 wt) dirigido contra caspasa-2 murina, que induce la disminución de la expresión de la caspasa-2, evaluado mediante RT-PCR y transferencia de Western (Figura 11A). Como control, se diseñó un ARNip irrelevante con 4 mutaciones (ARNip C2 m).

El dúplex del ARNip C2 wt es:

SEC ID N°: 1 5'-caccuccuagagaaggacdTdT- 3'

SEC ID N°: 2 5'-uguccuucucuaggaggugdTdT- 3'

El dúplex del ARNip C2 m es:

SEC ID N°: 3 5'-caucuacucgagacggacdTdT-3'

SEC ID N°: 4 5'-uguccgucucgaguagdTdT-3'

La detección basada en anticuerpo *in situ* confirma un alto silenciamiento génico de la caspasa-2 murina dado que el ARNip C2 wt disminuye la expresión de caspasa-2 en todas las neuronas (Figura 11B). La extinción es el máximo a las 24 horas postransfección con recuperación progresiva de la expresión de caspasa-2 a las 72 horas (Figura 11B). En particular, la disminución de la expresión de caspasa-2 por ARNip C2 wt da como resultado una supervivencia de neuronas corticales después de SD, evaluado en célula por inactivación de caspasa-2 (Figuras 11C y 11D) así como una conservación de  $\Delta\Psi_m$ , NA, simetría PS, integridad de la membrana plasmática y red neurítica (Figuras 11C-E). En fuerte contraste, el ARNip C2m de control no impide la expresión génica/de proteína (Figura 11A) ni la aparición de estas características apoptóticas (Figuras 3C y 3D). Además el impacto de la inhibición o extinción de la caspasa-2 sobre la supervivencia celular es específico de SD dado que las neuronas tratadas con ionomicina no están protegidas contra la muerte celular (figuras 11D y 11E). Por tanto, el tratamiento con este ionóforo  $\text{Ca}^{2+}$  es un control independiente de caspasa-2 útil para demostrar la especificidad del ARNip C2 wt dado que la caspasa-2 no está activada (véase más adelante) y Z-VDVAD-FMK o ARNip C2 wt no proporcionan efecto protector (Figuras 11D y 11E).

Estos resultados demuestran que la activación de caspasa-2 es un punto de control pre-mitocondrial crucial en este modelo.

#### **La caspasa-2 controla tanto la liberación del citocromo c como la translocación de Bax en las mitocondrias**

Se realizaron investigaciones para determinar si el suceso dependiente de MMP, tal como liberación del citocromo c, se impide o no por la inhibición o disminución de la expresión de caspasa-2. SD desencadena la liberación del

citocromo c citoplasmático de las mitocondrias que se bloquea eficazmente por Q-VD-OPH, Z-VDVAD-FMK y ARNip C2 wt (Figura 12A). Del mismo modo, Q-VD-OPH, Z-VDVAD-FMK y ARNip C2 wt anulan la activación de caspasa-2 e impiden la activación de las caspasa-9 y caspasa-3 dependiente de la liberación de citocromo c aguas abajo (Figuras 12B y 12C). La muerte celular inducida por la ionomicina es independiente de la activación de caspasa-2 en neuronas corticales (Figura 12B), lo que está de acuerdo con la ausencia de efecto protector sobre otras características de la apoptosis por Z-VDVAD-FMK y ARNip C2 wt (Figuras 12D y 12E). Debe observarse que la inhibición de más caspasas distales tales como caspasa-9 (por Z-LEHD-FMK) y caspasa-3 (por Z-DEVD-FMK) no pudo impedir la liberación del citocromo c (Figura 12A) mientras que Z-LEHD-FMK puede retrasar las características apoptóticas posteriores, como se observa por una mayor frecuencia de bloqueo en una fase preliminar de la condensación nuclear (fase I) (Figura 12A). Junto con el hecho de que Z-LEHD-FMK no influye en la disminución de  $\Delta\Psi_m$  mientras que impide la activación de caspasa-9 y características terminales de la apoptosis, es decir, exposición a PS, NA y PMP (Figuras 9A, 9B y 9D), estos resultados refuerzan la formación del apoptosoma clásico que implica el citocromo c, la caspasa-9 y la posterior activación de caspasa-3.

La función de Bax relativamente con respecto a caspasa-2 se estudió después, dado que esta proteína pro-apoptótica de la familia Bcl-2, se requiere durante el desarrollo neuronal y puede ser también crítica para promover la liberación del citocromo c mitocondrial y la muerte celular en neuronas después del factor trófico. Se realizó detección de Bax basada en anticuerpos *in situ* en neuronas SD y se muestra la translocación de Bax del citosol (patrón difuso) al interior de los compartimentos de tipo mitocondria (marcados con puntos) (Figuras 12D), demostrando que Bax también puede participar en el inicio de la muerte celular. Cabe destacar que colocando la activación de caspasa-2 frente a la translocación de Bax es crucial para entender si (i) la translocación de Bax es dependiente de caspasa-2; (ii) si la actividad caspasa-2 es dependiente de Bax; (iii) si ambas están independientemente implicadas en el control pre-mitocondrial de muerte celular inducida por SD.

Se observó que Bax permanece difusa en el citosol de neuronas SD tratadas con Z-VDVAD-FMK, sugiriendo de esta manera que la caspasa-2 puede controlar la translocación de Bax para promover la muerte celular (Figura 13A). Por el contrario, Z-LEHD-FMK que actúa sobre la caspasa-9, la caspasa más próxima activada aguas abajo de las mitocondrias, no impide la recolocación de Bax mitocondrial. Por consiguiente, el tratamiento con Z-VDVAD-FMK, Q-VD-OPH o disminución de la expresión de caspasa-2 por ARNip C2 wt influye en la translocación de Bax en las mitocondrias (Figura 12D), confirmando que la caspasa-2 puede ejercer un control aguas arriba de Bax para promover la muerte celular. Para caracterizar mejor la supuesta relación entre Bax y Caspasa-2, neuronas corticales primarias inducidas a morir por SD se trataron con el inhibidor del canal de cloro furosemida. De hecho la translocación de Bax parece requerir cambios de pH y conformacionales sensibles a la fuerza iónica y se ha observado que la furosemida reduce la translocación de Bax en las células tratadas con estaurosporina, Factor  $\alpha$  de necrosis tumoral o etopósido. Interferiendo con la translocación de Bax (Figuras 13A y 13B), la furosemida (que puede actuar a nivel o aguas arriba de Bax) reduce las características de la apoptosis, (es decir, pérdida de  $\Delta\Psi_m$ , liberación del citocromo c, NA, PMP) en neuronas SD (Figuras 13C). Además, observaciones cinéticas precisas revelan que la recolocación de Bax parcial en las mitocondrias se producirá a las 5 horas SD (casi simultáneo con la activación de caspasa-2; Figura 9C), antes de la pérdida de  $\Delta\Psi_m$  a las 8 horas y la liberación del citocromo c en las mitocondrias a las 15 horas (datos no mostrados), lo que sugiere que Bax media en MMP en el paradigma SD. Cabe destacar que aunque la furosemida bloquea la translocación de Bax, impide parcialmente la recolocación de Bax mitocondrial después de SD pero no altera la actividad caspasa-2 (Figura 13B). Cabe destacar que la furosemida proporciona solo una protección parcial en comparación con Z-VDVAD-FMK o ARNip C2 wt, lo cual puede ser atribuible a la limitación de dosis (más de 3 mM es tóxica en neuronas corticales) y el hecho de que la furosemida no es un agente de interferencia directo contra Bax.

La actividad caspasa-2 es no nuclear y permanece difusa en el soma y en las neuritas de las neuronas SD así como en aquellas tratadas con furosemida, lo que sugiere ninguna actividad de caspasa-2 específica de orgánulos. Esta observación es crucial dado que Z-VDVAD-FMK o ARNip C2 wt alteran tanto la translocación de Bax como la actividad caspasa-2 (Figura 13B). En su conjunto, estos datos sugieren una redistribución dependiente de caspasa-2 aguas arriba de Bax desde el citosol a la mitocondria, que a su vez inicia una secuencia lineal de acontecimientos en los que se produce la pérdida de  $\Delta\Psi_m$ , la activación dependiente de la liberación del citocromo c aguas abajo de la caspasa-9 y caspasa-3, NA, exposición a PS y PMP final. Sin embargo, una supuesta acción independiente de Bax directa o indirecta de la caspasa-2 sobre la membrana mitocondrial en neuronas no puede excluirse, como se sugiere en sistemas acelulares.

#### **La escisión de Bax inducida por SD es dependiente de la caspasa-2 citoplásmica pero es independiente de calpaína**

Para establecer exactamente la conexión entre Bax y caspasa-2, se comprobó la expresión de caspasa-2 y Bax en neuronas SD a nivel del ARNm y proteína y la investigación se centró para precisar la localización celular de la caspasa-2 activa durante SD.

En lo que respecta a Bax, no se detectó regulación por aumento/disminución de ARNm (Figura 14A) ni aumento del contenido de la proteína Bax p22 después de 24 horas-SD (Figura 14B). En particular, además de la p22 Bax de longitud completa natural, durante 24 h-SD, el aspecto progresivo de una segunda banda correspondiente a una proteína de 18 kDa se observó cuando se detectó por Transferencia de Western utilizando el anticuerpo policlonal

( $\Delta 21$ ) suscitado contra Bax  $\alpha$  de ratón completo delecionado para el extremo carboxi de 21 aminoácidos (véase la evolución en la Figura 14B). Se realizó una inmunotransferencia comparativa de las bandas relacionadas con Bax p22 y p18 con el anticuerpo  $\Delta 21$  y el anticuerpo policlonal N20 suscitado contra un péptido que se mapea en el extremo amino de Bax  $\alpha$  (Figuras 14B y 14C). N20 no permite la detección de la banda p18 (Figura 14C), lo que sugiere que p22 Bax se escinde en su resto N terminal en una forma de 18 kDa. Debe observarse que esta escisión temprana (Figura 14B) se produce con una cinética similar a la de la actividad caspasa-2 (Figura 9C). Notablemente, la inhibición caspasa-2 o su extinción genética basada en ARNip anula completamente la escisión de Bax mientras que el ARNip C2 m no tiene efecto (Figura 14D), lo que demuestra que la activación de caspasa-2 se requiere para la escisión de Bax después de SD.

Después se realizó fraccionamiento celular para identificar si la muerte celular inducida por Bax durante SD está principalmente relacionada con la activación de caspasa-2 y para comprobar si Bax se integra en la membrana mitocondrial para promover la reducción de  $\Delta\Psi_m$  y la liberación del citocromo c en neuronas corticales. El contenido de Bax se analizó mediante transferencia de Western tanto en fracciones de membrana pesada citosólica soluble y enriquecida con mitocondrias obtenida a partir de neuronas corticales sometidas a 24 h-SD con o sin Z-VDVAD-FMK o ARNip C2 wt. La p22 Bax natural se encontró en las fracciones solubles y enriquecidas con mitocondrias a las 24 h-SD mientras que la p18 Bax se detectó exclusivamente en la fracción enriquecida con mitocondrias (Figura 14E). La Bax natural también se insertó a un menor grado en la membrana mitocondrial (externa) (Figura 14E). Dichos datos muestran que ambas formas de Bax pueden participar en la muerte celular evocada por SD. Después se realizaron investigaciones para determinar si la escisión de Bax dependiente de caspasa-2 puede producirse en neuronas corticales en respuesta a otros estímulos. De manera eficaz, la escisión de Bax también se produjo durante el tratamiento con estaurosporina o ionomicina, pero en estas situaciones p18 Bax se generó de una manera independiente de caspasa-2 (Figura 14F), lo que confirma que otras proteasas pueden ser responsables de la escisión de Bax en estos modelos (Wood y col., 1998; Choi y col., 2001). Por consiguiente, la muerte celular inducida por estaurosporina o ionomicina (Figura 3D) no se impide por Q-VD-OPH o Z-VDVAD-FMK.

El perfil inhibitor de proteasa de la escisión de Bax se cuestionó más precisamente dado que Bax puede escindirse directamente por otras cisteína proteasas, calpaínas o a través de una activación de calpaína dependiente de caspasa (Choi y col., 2001). Para comprobar si las calpaínas son responsables de la escisión de Bax durante SD en neuronas se investigó el efecto de los inhibidores de las calpaínas (ALLN, ALLM y E64D) sobre la escisión de Bax mediante transferencia de Western. A diferencia de Q-VD-OPH, la inhibición de la actividad de las calpaínas no impide la escisión de Bax demostrando que la escisión de Bax no está directa o indirectamente mediada por calpaínas durante SD (Figura 14G). Cabe destacar que p18 Bax parece estar estabilizada por la inhibición de la actividad proteasómica por la lactacistina y epoxomicina (Figura 14H), reforzando el efecto indicado apoptótico anteriormente de p18 Bax.

Todos estos datos coinciden con un modelo en el que la activación de caspasa-2 da como resultado la escisión de Bax en una forma activa.

Dichos resultados demuestran que Bax necesita la caspasa-2 para desarrollarse. Estas investigaciones se realizaron para determinar el estado bioquímico y la distribución celular de la caspasa-2 a través de SD. Parece que no hay regulación positiva del ARNm de caspasa-2 después de SD (Figura 14I). Por otro lado el contenido de la proteína pro-caspasa-2 disminuye en neuronas SD en comparación con neuronas no tratadas y esta disminución parece ser el resultado de una autoescisión de la caspasa-2 dado que el tratamiento con Z-VDVAD-FMK lo impide (Figura 14J). De hecho la forma p14 procesada de la caspasa-2 se inmunodetecta en neuronas SD, pero no en neuronas SD tratadas con Z-VDVAD-FMK (Figura 14J). También puede detectarse un producto de escisión intermedio de 33 kDa. Un análisis cinético de la localización de caspasa-2 durante SD demuestra que la caspasa-2 es estrictamente citoplásmica, incluso en una fase tardía, descartando de esta manera una función nuclear de la caspasa-2 en la muerte celular por SD (Figura 14K). Por otro lado, diversos fármacos apoptogénicos tales como el ionóforo  $Ca^{2+}$  ionomicina, el inhibidor de quinasa estaurosporina, el inhibidor de topoisomerasa I camptotecina, desencadenan la localización nuclear parcial o completa de la caspasa-2 (Figura 14L).

Por tanto, la distribución citoplásmica de la caspasa-2 en las neuronas es dependiente de estímulo lo que demuestra una función peculiar de la caspasa-2 en el citoplasma de neuronas SD.

#### 50 **La inhibición específica de caspasa-2 proporciona una fuerte neuroprotección durante la lesión cerebral isquémica neonatal**

Los anteriores resultados demuestran que la activación aguas arriba y temprana de la caspasa-2 es un punto de control crucial en dicho modelo *in vitro*. Se realizaron experimentos para determinar si dicha ruta puede dirigirse eficientemente *in vivo* durante el estrés neuronal agudo. Para realizarlo, se realizó síntesis adaptada de un nuevo prototipo inhibidor de caspasa-2 permeable a células, denominado Qco-VDVAD-dfp, basándose en el pentapéptido VDVAD combinado con el grupo quinolina amino terminal y el grupo O-fenoxi carboxi terminal, lo que puede potenciar la permeabilidad celular y el potencial inhibidor.

SEC ID N°: 5, Qco-VDVAD-dfp: Quinolinilcarbonol-L-Valinil-L-Aspartil (metil éster)-L-Valinil-L-Alaninil-L-Aspartil (metil éster) 2,6-difluorofenil éster.

La especificidad de Qco-VDVAD-dfp se ensayó frente a caspasa-2 recombinante (Figura 15A). La escisión de VDVAD-AMC *in vitro* por caspasa-2 se bloquea por Qco-VDVAD-dfp, de una manera tan eficaz como Q-VD-OPH e inhibidores específicos reversibles (Ac-VDVAD-Cho) o irreversibles (Z-VDVAD-FMK) de caspasa-2. Aunque la inhibición de la escisión por Z-VAD-FMK es menos importante, BOC-D-FMK es completamente inactivo contra caspasa-2, demostrando de esta manera fuerzas más bajas de inhibidores pan-caspasa habituales contra caspasa-2. La caspasa-2 no se inactiva fuertemente por Z-DEVD-FMK, el inhibidor del tipo caspasa-3 ni por Z-LEHD-FMK, Z-LETD-FMK, inhibidores de tipo caspasa-3/9/8 respectivamente (Figura 15A). Los inhibidores E64d, ALLN, ALLM de otras cisteína proteasas, calpaínas, no pueden alterar la actividad de escisión (Figura 16). Cuando se ensaya en el paradigma SD (pero sin muerte inducida por ionomicina), QCO-VDVAD-DFP promueve la supervivencia de neuronas corticales (Figura 15B) al igual que Q-VD-OPH, Z-VDVAD-FMK o el ARNip C2 wt (Figuras 8B, 9A y 11D y 11B), proporcionando de esta manera un inhibidor de caspasa-2 específico para experimentos *in vivo*. Por otro lado BOC-D-FMK y Z-VAD-FMK son ineficaces contra la muerte celular neuronal inducida por SD (Figura 8A). Se decidió ensayar Qco-VDVAD-dfp en un modelo agudo de lesión hipóxica/isquémica en el desarrollo cerebral, en el que, en su lugar, la muerte celular se producía por apoptosis. En este modelo de isquemia focal unilateral transitorio, crías de ratas se sometieron a oclusión arterial cerebral intermedia izquierda permanente en asociación con oclusión transitoria de la arteria carótida común izquierda con reperfusión. El efecto neuroprotector de los inhibidores de pan-caspasa (Q-VD-OPH) y específicos de caspasa-2 (Qco-VDVAD-dfp) se examinó después cuando se administró en este modelo isquémico perinatal. Una dosis de Q-VD-OPH o Qco-VDVAD-dfp (100  $\mu$ g/animal) o vehículo se administró i.p. después de la aparición isquémica. Después los cerebros se analizaron 48 horas después, momento en el cual el infarto se estabilizó sin edema significativo (no más del 1,5%). La isquemia indujo un volumen de infarto de  $55,0 \pm 3,4$  mm<sup>3</sup>, lo que representa un  $22,1 \pm 1,4\%$  de daño en el hemisferio ipsilateral lesionado. Los volúmenes de infarto aparecieron normalmente distribuidos (entre 15 y 26%) (Figuras 15C y 15D). Un sola dosis de Q-VD-OPH proporcionada antes de la isquemia, redujo significativamente el volumen de infarto en 44% ( $12,4 \pm 2,6\%$ ,  $p < 0,05$  en comparación con el grupo control en el ensayo de Newman-Keul), distribuyéndose los volúmenes entre 0 y 31 (Figuras 15D y 15E). Qco-VDVAD-dfp, a la misma dosis, indujo una reducción altamente significativa del 74% en el volumen de infarto ( $5,7 \pm 2,3\%$ ,  $p < 0,01$  en comparación con los grupos de control y Q-VD-OPH en el ensayo de Newman-Keul) (Figuras 15C y 15D). En los 12 animales estudiados, 8 presentaron un infarto más pequeño muy marcado (media de 0,5%) visible al nivel de la oclusión MCA (niveles correspondientes a las placas 12 y 13), pero no al dorsal) e hipocampo (placa 21) en comparación con los animales control isquémicos (Figura 15C y 15E). Los otros cuatro presentaron un infarto con una media de  $16,5 \pm 1,32\%$ , un valor inferior que el obtenido en los animales de control isquémicos. Para finalizar, estos datos demuestran que el bloqueo específico del iniciador caspasa-2 promueve una fuerte neuroprotección, que es más eficaz que la inhibición pan-caspasa contra la lesión cerebral isquémica.

### Discusión

#### **Se requiere actividad caspasa-2 pre-mitocondrial para la apoptosis neuronal**

El presente estudio describe un nuevo subtipo de ruta intrínseco en el que la apoptosis inducida por SD de neuronas corticales primarias es dependiente de la activación aguas arriba del iniciador caspasa-2 que procede a través del control de la insuficiencia mitocondrial inducida por Bax y posterior destrucción de neuronas dependientes de caspasa (Figura 17).

Este modelo está apoyado por las siguientes líneas de evidencia:

(i) Jerarquía y órdenes temporales de la apoptosis muestran un modo de tipo intrínseco en el que el Bax citosólico se transloca e integra en la membrana mitocondrial externa para inducir la disminución de  $\Delta\Psi_m$ , promover la liberación del citocromo c y acontecimientos aguas abajo, la activación dependiente de la liberación del citocromo c de caspasa-9/caspasa-3, condensación/fragmentación nuclear, exposición a PS y PMP terminal.

Los resultados obtenidos de acuerdo con la invención pueden apoyar la formación del apoptosoma clásico con el citocromo c y caspasa-9. Sin embargo, la caspasa-9 también puede estar implicada en la activación de otras caspasas ejecutoras aguas abajo que permanecen por identificar dado que la inhibición de la caspasa-3 no impide las características terminales de la apoptosis.

(ii) Z-VDVAD-FMK promueve una mayor supervivencia de neuronas inducidas a morir por SD que lo hacen los inhibidores selectivos de caspasa-3, -8, -9.

(iii) La activación temprana de caspasa-2 se detecta antes de MMP e independientemente de otras caspasas. La activación de caspasa-2 pre-mitocondrial se requiere para la muerte celular inducida por SD dado que la disminución de la expresión de caspasa-2 por el ARNip específico o inhibición farmacológica de la actividad caspasa-2 (Z-VDVAD-FMK, Q-VD-OPH) anula todas las características apoptóticas.

(iv) Debe realizarse inhibición de la actividad de caspasa-2 al inicio de la SD para proporcionar citoprotección, reforzar el papel temprano y crucial desempeñado por la caspasa-2.

(v) Dado que la apoptosis inducida por SD también depende de Bax, la activación de caspasa-2 puede mediar aguas arriba el control de Bax permitiendo la escisión de Bax natural en el fragmento p18, independientemente de las calpains. Sin embargo tanto Bax natural como escindido se transloca y se integra en la membrana mitocondrial externa para inducir la disminución de  $\Delta\Psi_m$  y promover la liberación del citocromo c y acontecimientos aguas abajo de una manera dependiente de caspasa-2.

(vi) La caspasa-2 avanza a una forma p14 como resultado de autoescisión y permanece estrictamente difusa en el citoplasma durante SD, descartando de este modo la función nuclear o específica de orgánulos de la caspasa-2. La localización citoplasmática exclusiva de la caspasa-2 a lo largo de SD larga apunta a pruebas de un mecanismo particular de activación durante la SD.

## 10 Muerte celular neuronal dependiente de caspasa frente a independiente de caspasa

De los tres inhibidores de caspasa de amplio espectro ensayados, tan solo Q-VD-OPH, proporciona inhibición caspasa significativa y supervivencia en neuronas SD corticales. Esta tercera generación de inhibidores pan-caspasa presenta propiedades anti-apoptóticas mejoradas, no limitadas a neuronas, debido probablemente a la mejor permeabilidad celular (grupo quinolina amino terminal), especificidad y eficacia del grupo O-fenoxi carboxi terminal (sobre fluorometil/clorometil cetona clásica). Por tanto, Q-VD-OPH parece ser de mayor uso para neurobiología en comparación con viejos inhibidores de generación, Z-VAD-FMK y BOC-D-FMK. La inhibición multicaspasa en modelos de cultivo neuronales proporciona generalmente protección transitoria o parcial sin conservar todas las características apoptóticas. La razón de esto probablemente se debe a las rutas independientes de caspasa mitocondrial parciales o activación de rutas mitocondriales (independiente de caspasa aguas arriba) en las que la inhibición de la caspasa (o caspasas) implicada aguas abajo del punto de control mitocondrial no impide la liberación del citocromo c, pero en su lugar amplía el compromiso de muerte. Por ejemplo, neuronas simpáticas protegidas con BOC-D-FMK privadas de factor de crecimiento nervioso (NGF) mostraron una conservación morfológica sin restablecimiento de síntesis de proteínas y de propiedades de membrana plasmática electrofisiológicas. A la inversa, parece que si la inactivación o la disminución de la expresión de caspasa-2 específica se produce a nivel pre-mitocondrial y por tanto impide la liberación del citocromo c y acontecimientos dependientes aguas abajo, las neuronas SD presentan casi una morfología conservada (soma y red neurítica).

En oposición a la activación de caspasa, se ha descrito la función de MMP en la regulación de la muerte celular en trastornos neurodegenerativos agudos y crónicos. No obstante, como se observa en la Tabla I, ninguna de las interferencias directas con las mitocondrias o PTP proporciona supervivencia significativa en neuronas-SD. La ausencia de protección significativa por dichos compuestos indica que la mitocondria es poco probable que sea el punto de control más aguas arriba en el paradigma SD. Los datos obtenidos de acuerdo con la invención respaldan que en algunos modelos de muerte neuronal aguda, la caspasa-2 actúa aguas arriba de la mitocondria y los ejecutores caspasa-3 y -9 actúan aguas abajo en la mitocondria.

Adicionalmente, la inhibición farmacológica de otras rutas principales metabólicas y de señalización no impiden la muerte celular suscitada por SD (véase Tabla I). No puede excluirse que el efecto de los compuestos completos se evite y que una combinación elaborada proporcione citoprotección. Finalmente, como se esperaba, tan solo la actinomicina D y la cicloheximidina promueven la supervivencia de las neuronas corticales sometidas a SD, lo que sugiere que pueden estar implicados acontecimientos post-transcripcionales/traduccionales en este modelo de muerte. De hecho, la transcripción y traducción *de novo* de macromoléculas es indispensable para la muerte celular en diversos modelos apoptóticos neuronales: la cicloheximidina impide tanto la pérdida de  $\Delta\Psi_m$  como la liberación del citocromo c en neuronas simpáticas privadas de NGF y actinomicina D bloqueó la muerte celular de células PC12 diferenciadas y sin tratar privadas de NGF/suero.

## Activación caspasa-2 pre-mitocondrial en neuronas corticales-SD

La invención respalda un modelo para el requisito inicial de caspasa-2 pre-mitocondrial que promueve la alta supervivencia neuronal cuando está inactivada (Z-VDVAD-FMK) o silenciada (ARNip C2wt) (Figura 8).

Notablemente, los ratones caspasa-2  $-/-$  son viables y presentan fenotipos neuronales no anómalos excepto por la reducción del número de neuronas motoras faciales (producida por una apoptosis acelerada en etapas neonatales y no por una disminución en la formación de neuronas). Sorprendentemente, mientras que las neuronas simpáticas se someten a apoptosis después de retirada de NGF y están protegidas por caspasa-2 antisentido, las neuronas simpáticas deficientes en caspasa-2 se someten a apoptosis más eficazmente que las neuronas de tipo natural. Además, las neuronas del hipocampo de estos ratones eran resistentes a  $\mu$ -amiloide.

La inducción de la reducción transitoria de la expresión de caspasa-2 en neuronas corticales por ARN de interferencia impide mecanismos compensatorios, lo que permite demostrar claramente la implicación de la caspasa-2 en la muerte neuronal.

Aunque la localización subcelular de la caspasa-2 puede dar una idea del mecanismo de su activación, su distribución subcelular exacta es aún controvertida (complejo de Golgi, mitocondria, núcleo y citoplasma), probablemente debido a diferencias en el tipo celular, estímulo de muerte, sobreexpresión de la proteína de fusión

GFP y antisuero usado para detectar la caspasa-2. Sorprendentemente, la caspasa-2 se detecta constitutivamente en neuronas corticales así como en un grupo difuso y citoplásmico, incluso durante largo SD, por tanto excluyendo una función nuclear o específica de orgánulos de la caspasa-2 en la muerte celular SD en neuronas corticales. Tanto la ausencia de redistribución de la caspasa-2 en el núcleo durante la SD como el hecho de que la distribución citoplasmática de la caspasa 2 en neuronas corticales es dependiente de estímulos, sugiere un mecanismo peculiar de activación de caspasa-2 en el citoplasma de neuronas-SD. Resulta interesante que la muerte celular inducida por ataque también se redujo por Z-VDVAD-FMK, un modelo en el que la caspasa-2 se detectó tanto en el citoplasma como en el núcleo de neuronas del hipocampo. La tinción de caspasa-2 también fue principalmente citoplásmica con uno a dos focos en muchos núcleos en células PC12 y este modelo no cambió sustancialmente en células privadas de NGF. Junto con el paradigma SD, estos datos están a favor de la función desempeñada por la caspasa-2 para inducir la apoptosis desde el citosol, que desafía el consenso actual para la activación de la muerte celular mediada por caspasa-2 desde el nivel nuclear.

Usando un colorante sensible a  $\Delta\Psi_m$ , se demostró que la actividad de caspasa-2 en la célula precede la alteración de  $\Delta\Psi_m$  y la liberación del citocromo c en neuronas-SD, lo cual es compatible con una función desempeñada por miembros Bcl-2 proapoptóticos. Dichos datos son coherentes con resultados previos que muestran que es necesario Bax durante el desarrollo neuronal y también puede ser crítico para promover la liberación del citocromo c mitocondrial y la muerte celular en neuronas después de una privación del factor trófico.

### Caspasa-2 como una diana durante la isquemia *in vivo*

Teniendo en cuenta la dificultad de suministrar el ARNip en el cerebro, el primer péptido basado en O-fenoxi- y quinolina que podía inhibir específicamente la caspasa-2 se diseñó para demostrar el concepto de intervención terapéutica *in vivo* a nivel caspasa-2.

Recientemente introducido (Melnikov y col., 2002; Caserta y col., 2003; Lecoeur y col., 2004), Q-VD-OPH fue el único inhibidor basado en O-fenoxi y quinolina disponible, pero no era selectivo. La ausencia de neuroprotección por Z-VAD-FMK en el paradigma-SD, combinado con el hecho de que bloquea *in vitro* la actividad de escisión de caspasa-2, pone de manifiesto el aumento de permeabilidad celular proporcionada por el grupo quinolina amino terminal. El molde Qco-VDVAD-dfp usado por los inventores bloqueó bien la actividad caspasa-2 *in vitro* y en la célula, promoviendo así la supervivencia de neuronas-SD.

SD, hipoxia o privación en glucosa son componentes de isquemia cerebral o miocárdica *in vivo*. Existen pruebas en modelos neonatales de isquemia por hipoxia (H-I) de apoptosis masiva en el núcleo y penumbra en lugar de necrosis. La isquemia cerebral neonatal conduce a una muerte celular retrasada con lesiones en el ADN y mecanismos apoptóticos de muerte celular. La isquemia focal transitoria con reperusión en crías de rata P7 conduce a fragmentación de ADN, características morfológicas de apoptosis y activación de la ruta mitocondrial.

Los inventores han demostrado que la administración de 5 mg/kg i.p. de Qco-VDVAD-dfp, altamente eficaz e inhibidor de caspasa-2 permeable a célula reduce masivamente el tamaño del infarto (74%) en crías de ratas sometidas a dicho daño H-I transitorio neonatal experimental. La extrema eficacia de Qco-VDVAD-dfp contrasta fuertemente con resultados previos obtenidos en este modelo, demostrando que el inhibidor pan-caspasa, BOC-D-FMK, no induce dicha reducción significativa en el volumen de infarto. Dado que este modelo H-I parece ser dependiente de caspasa-2, estos hallazgos pueden ser coherentes con las observaciones de los inventores sobre la ineficacia relativa de BOC-D-FMK en neuronas-SD y contra actividad VDVADasa *in vitro* de la caspasa-2 recombinante. Además este compuesto no era neuroprotector a pesar de un trabajo previo que demostraba una protección significativa después de hipoxia-isquemia en el modelo Rice-Vannucci. De hecho, BOC-D-FMK presentó más bien empeoramiento en el 60% de los animales en el modelo de Renolleau. Las pruebas sugieren que la activación de caspasa fisiológica y no letal contribuye a una guía axonal y un remodelado sináptico dado que (i) algunas proteínas (subunidades de receptores GluR1-4 AMPA, Cam quinasas, proteína de interacción PKC, MAP y tirosina quinasas) implicadas en la plasticidad sináptica son también sustratos para las caspasas y (ii) ratones tratados con Z-VAD-FMK presentan deterioro de memoria. La inhibición pan-caspasa en organismos vivos puede cambiar de apoptosis a necrosis, tumorigénesis o alteración de homeostasis celular, lo que podría dar como resultado un empeoramiento por lesión, cáncer o enfermedades autoinmunes. Por lo tanto la alteración de la activación de caspasa fisiológica, toxicidad y efectos secundarios debidos a administración prolongada de inhibidores de pan-caspasa también podría limitar su uso en el tratamiento de neurodegeneración crónica, reforzando de este modo las necesidades de inhibición selectiva preferencial de caspasa (iniciadora) tanto para enfermedades agudas como crónicas. Si la reducción parcial en lesiones H-I puede proporcionarse por la inhibición pan-caspasa, bien si se debe a inhibición de caspasas pro-apoptóticas o pro-inflamatorias o ambas no está claro. Resulta interesante que dado que este modelo de ictus neonatal con reperusión es particularmente relevante desde el punto de vista clínico de encefalopatía hipóxica-isquémica humana neonatal al nacer, la inhibición de caspasa-2 por pequeños inhibidores peptídicos puede ofrecer alguna alternativa terapéutica para la conservación de neuronas en ictus neonatal sin efectos secundarios que pueden producirse durante la inhibición pan-caspasa. Además, dado que la inhibición específica de procesamiento mediado por caspasa-1 proinflamatorio de IL-1 $\beta$  y Poli(ADP-ribosa) sintasa (PARS) disminuyó también moderadamente la muerte celular después de lesión isquémica, esto puede demostrar una lógica de combinar los inhibidores de caspasa-1 o PARS con la inhibición de caspasa-2.

A la vista de los resultados obtenidos por los inventores, la interferencia selectiva con caspasa-2 pre-mitocondrial parece ser una herramienta importante para atenuar la muerte celular neuronal. Estos resultados permiten reconciliar la ruta intrínseca con la activación de caspasa-2 huérfana al menos en paradigmas de muerte celular neuronal y esbozar una nueva conexión entre caspasa iniciadora y la ruta mitocondrial intrínseca. La apoptosis neuronal aguda puede ser dependiente de activación aguas arriba de caspasa-2 iniciadora que procede a través del control de la disfunción mitocondrial inducida por Bax y posterior destrucción neuronal dependiente de caspasa. Se demostró que la caspasa-2 es también una diana importante con un buen pronóstico neuroprotector en ictus neonatal, dado que la inactivación *in vivo* de caspasa-2 da como resultado una reducción masiva del volumen de infarto durante la isquemia local transitoria.

## 10 Procedimientos experimentales

### Aislamiento y cultivo de neuronas corticales primarias

Se cultivaron neuronas corticales primarias a partir de embriones de ratones E14 SWISS (Janvier). Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y los embriones se extirparon por cesárea. Los córtex cerebrales se extrajeron y los tejidos se trituraron mecánicamente 15 veces en medio L15 (Gibco BRL) utilizando puntas de 1000  $\mu$ l (Eppendorf), después, los restos se eliminaron y la suspensión celular se centrifugó a 850 rpm durante 10 minutos. Las neuronas se sembraron en placas durante 2 días a una alta densidad ( $7 \times 10^5$  células vivas por  $\text{cm}^2$ ) en Medio Basal de Eagle (Eurobio) complementado con glutamina al 1%, suero equino al 5% (HS, Eurobio) y suero de ternero fetal al 2,5% (FCS, Eurobio) sobre placas de 6 o 24 pocillos (Sarstedt) o cubreobjetos con cámaras Lab-Tek<sup>®</sup> de 4 pocillos (Nalge Nunc International), previamente cubiertos con polietilenoimina 1 mg/ml (Sigma). A DIV3 (3 días *in vitro*), el medio se cambió diariamente y las neuronas se mantuvieron en medio completo N5 que contenía glucosa 180 mg/l, HS al 5% y FCS al 1% y citosina  $\beta$ -D-arabinofuranósido 3  $\mu$ M (Sigma) y 5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzociclohepten-5,10-imina maleato 1  $\mu$ M (MK-801, Sigma). La pureza del cultivo (> 95%) se controló con un anticuerpo monoclonal anti-Proteína 2 Asociada a Microtúbulo (MAP-2, Sigma) y un anticuerpo policlonal anti-Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP, Dako). Las neuronas se usaron entre DIV6-DIV9 (a los 6 días *in vitro*-9 días *in vitro*).

### Inducción de la apoptosis y ensayo de neuroprotección por agentes farmacológicos

La muerte celular se indujo a DIV6 por privación de suero (SD). Brevemente, se realizó la eliminación de suero de la siguiente manera: neuronas cultivadas en medio completo N5 se lavaron rápidamente 3 veces en N5 desprovisto de HS y FCS y se incubaron durante 24 horas en medio N5 sin suero, en ausencia o presencia de agentes farmacológicos. Como alternativa, también se indujo la muerte celular por tratamiento durante 24-48 horas con ionomicina, estaurosporina, camptotecina, 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), ácido 3-nitropropiónico (3NPA), nitroprusiato sódico (SNP) (todos adquiridos de Sigma) o péptido  $\beta$ -amiloide (25-35) (Bachem). Se añadieron reactivos para ensayos de neuroprotección al inicio de SD o tratamiento farmacológico (en medio completo N5). Se usaron a concentraciones que no inducían el efecto citotóxico por sí mismas. La ciclosporina A, la sal disódica del ácido 4,4'-diisotiocianastilben-2,2'-disulfónico (DIDS), rojo rutenio, decilubiquinona, acetoximetil éster del ácido 1, 2-bis(2-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético (BAPTA-AM), 3-metiladenina, bafilomicina A1, rapamicina, leptomicina B, N-benciloxicarbonil-Phe-Phe-fluorometilcetona (Z-FF-FMK), pepstatina, ácido okadaico, microcistín LR, H-7, aspirina, wortmanina, genisteína, lactacistina, epoxomicina, Trolox<sup>®</sup>, N-acetilcisteína, glutatión, actinomicina D, cicloheximida se adquirieron de Sigma; N-benciloxicarbonil-Val-Ala-Asp(Ome)-fluorometilcetona (Z-VAD-FMK), BOC-Asp(Ome)-fluorometilcetona (BOC-D-FMK), Quinolin-Val-Asp(Ome)-CH<sub>2</sub>-O-Ph (Q-VD-OPH), N-benciloxicarbonil-Phe-Ala-fluorometilcetona (Z-FA-FMK), N-benciloxicarbonil-Asp-Glu(Ome)-His-Asp(Ome)-fluorometilcetona (Z-DEVD-FMK), N-benciloxicarbonil-Leu-Glu(Ome)-His-Asp(Ome)-fluorometilcetona (Z-LEHD-FMK), N-benciloxicarbonil-Leu-Glu(Ome)-Thr-Asp(Ome)-fluorometilcetona (Z-LETD-FMK), N-benciloxicarbonil-Val-Asp(Ome)-Val-Ala-Asp(Ome)-fluorometilcetona (Z-VDVAD-FMK) eran de ICN; la síntesis habitual de Quinolin-Val-Asp(Ome)-Val-Ala-Asp(Ome)-CH<sub>2</sub>-O-Ph (Q-VDVAD-OPH) se realizó por ICN; 4-(2-aminoetil)-bencenosulfonil fluoruro (AEBSF o Pefabloc SC) era de Roche; N-acetil-Leu-Leu-Norleu-al (inhibidor I de Calpaína o ALLN), N-acetil-Leu-Leu-Met-al (inhibidor II de Calpaína o ALLM), trans-epoxisuccinil-L-leucilamido-(4-guanidina) butano (E64d), MDL-28170, SB 202190, PD 98059, SP 600125 eran de Merck/VWR.

### Instrumentación para el análisis dinámico de apoptosis en neuronas corticales primarias

Se realizó microscopia de fluorescencia (FM) multisonda en neuronas previamente teñidas usando un microscopio de fluorescencia invertido DM IRB (Leica) equipado con una lámpara de arco corto de mercurio de 100 W y un objetivo X 40 N PLAN L o un objetivo X 100 N PLAN de inmersión de agua. Normalmente, se realizaron estudios cuantitativos mediante FM en aproximadamente 200-600 células/campo puntuando 5-10 campos seleccionados al azar por experimento y citometría de flujo (FC) para rendimientos de muestras más elevados. Para este último, se realizó un análisis multiparamétrico de la apoptosis y acontecimientos relacionados después de la tripsinización de neuronas teñidas como se ha descrito anteriormente (Lecoeur y col., 2004). La FC se realizó usando un citómetro tricolor FACSCalibur equipado con un láser de argón de 488 nm enfriado con aire de 15 mW (Becton Dickinson).

**Análisis multisonda de  $\Delta\Psi_m$ , activación de caspasa, exposición a PS, PMP y NA.**

Se realizaron mediciones por FC y FM, como se ha descrito anteriormente (Lecoeur y col., 2004). El potencial transmembrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) se evaluó mediante la incorporación del colorante sensible a  $\Delta\Psi_m$  yoduro de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbencimidazolilcarbocianina (JC-1, Molecular Probes). (Smiley y col., 1991). Las neuronas se cargaron con JC-1 1  $\mu\text{M}$  durante 30 minutos a 37 °C. Para la FM, se adquirieron fluorescencias verde (monómeros, bajo  $\Delta\Psi_m$ ) y naranja (agregados J, alto  $\Delta\Psi_m$ ) simultáneamente (excitación BP 450-490 / filtro de emisión de largo alcance LP 515). Se detectaron monómeros JC-1 en el canal F1-1 por FC. Se detectaron agregados J a través del canal F1-2 (Lecoeur y col., 2004). Como alternativa, también se evaluó  $\Delta\Psi_m$  con Rojo MitoTracker<sup>®</sup> 60 nM (CMXRos; Molecular Probes) y se detectó por FM (filtro de excitación BP 515-560 / filtro de emisión LP 590). El control positivo para el colapso de  $\Delta\Psi_m$  se realizó con carbonilcianuro *m*-clorofenilhidrazona (mCICCP, 100  $\mu\text{M}$ , 45 minutos). Se detectaron caspasa-2, -3, -8 y -9 activadas usando péptidos específicos conjugados con FAM (denominados Inhibidor Marcado con Fluorocromo de Caspasa, FLICA: Kits de Actividad Caspasa con fluoresceína CaspaTag<sup>™</sup>, Q-Biogen, Illkirch, Francia; Kit de Detección de Caspasa ApoFluor<sup>™</sup>, ICN, Orsay, Francia): FAM-VDVAD-FMK, FAM-DEVD-FMK, FAM-LETD-FMK y FAM-LEHD-FMK, respectivamente. Las neuronas se incubaron con los FLICA (1:150, CaspaTag<sup>™</sup> o 1:500, ApoFluor<sup>™</sup>) durante 1 hora a 37 °C, y después se lavaron tres veces en tampón de lavado. Para FM, péptidos conjugados con FAM, se excitaron a través del filtro BP 480/40 y la luz emitida se recogió a través del filtro BP 527/30. Se realizó análisis por FC en el canal F1-1 (Lecoeur y col., 2004). La exposición a fosfatidilserina (PS) de la lámina externa de la membrana plasmática se detectó a través de la fijación de anexina V conjugada con FITC (Immunotech). La permeabilidad de la membrana plasmática (PMP) se detectó a través de la unión aumentada de 7-amino actinomicina D (7-AAD, Sigma) al ADN nuclear. Se realizaron tinciones y análisis por FM y FC como se ha indicado anteriormente (Lecoeur y col., 2004). Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33342 1  $\mu\text{M}$  (30 minutos) y se analizaron por FM (filtro de excitación BP 340-380/filtro de largo alcance LP 425). La apoptosis nuclear (NA) se evaluó como se ha definido anteriormente en neuronas (Lecoeur y col., 2004).

**25 Inmunodetección del citocromo c, Bax, caspasa-2 y caspasa-3**

Las neuronas cultivadas en portaobjetos de cámara Lab-Tek<sup>®</sup> se fijaron en paraformaldehído al 4%/ácido pícrico al 0,19% durante 20 minutos, se permeabilizaron con Triton-X100 al 0,01% en PBS durante 5 minutos, después se bloquearon con FCS al 10% en PBS durante 30-45 minutos. Todas las inmunotinciones se realizaron a TA. Los anticuerpos se diluyeron en albúmina de suero bovino al 1% (Sigma) en PBS. Después, las neuronas se tiñeron usando el IgG1 monoclonal de ratón anti-citocromo c (1 hora, 1:200; clon 6H2. B4, BD Pharmingen) y un fragmento F (ab')<sub>2</sub> conjugado con Alexa Fluor<sup>®</sup> 594 de anti-IgG de ratón de cabra (1 hora, 1:200; Molecular Probes), como anticuerpo secundario. De modo similar, se investigó la translocación de Bax usando un anticuerpo policlonal de conejo suscitado contra Bax  $\alpha$  de ratón deleciónado para los 21 aminoácidos carboxiterminales (1h, 1:100;  $\Delta$ 21, Santa Cruz Biotechnology) y se detectó con un anticuerpo anti-IgG de conejo de cabra conjugado con FITC (1h, 1:100; Molecular Probes). Se realizó el recuento de las células que presentaban un citocromo c citoplásmico difuso o una marca puntuada de Bax en FM en aproximadamente 10 campos correspondientes a 150-300 células seleccionadas al azar por estado por experimento. La caspasa-2 se detectó en la célula usando el anticuerpo monoclonal anti caspasa-2 de ratón de rata (10C6, Alexis Biochemicals, San Diego, CA, Estados Unidos; 1:100, 1 h) y un fragmento F(ab')<sub>2</sub> Alexa Fluoro<sup>®</sup> 594 de anti IgG de rata de cabra (1 h, 1:100, Molecular Probes) como anticuerpo secundario. La caspasa-3 activada se puso de manifiesto en la célula por FC (Lecoeur y col., 2004). Para continuar, las neuronas se tripsinizaron, se fijaron en PBS que contenía PFA al 1% y actinomicina D 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Sigma) durante 20 min. Después, las neuronas se resuspendieron en 100  $\mu\text{l}$  de PBS/BSA al 1%/saponina de corteza de Quilaja al 0,05% (Sigma) que contenía 7-AAD 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y 20  $\mu\text{l}$  del anticuerpo policlonal anti-caspasa-3 de conejo conjugado con Ficoeritrina (BD Pharmingen) durante 30 minutos.

**45 ARN de interferencia**

El ARNip bicatenario correspondía a la secuencia del gen *Caspasa-2* de ratón (AACACCTCCTAG AGAAGGACA; nucleótidos 185-203; ARNip C2 wt). Se diseñó el ARNip inactivo con cuatro mutaciones en la misma secuencia (AACATCTACTCG AGACGGACA; ARNip C2 m). La secuencia del ARNip C2 wt se sometió a BLAST para garantizar su especificidad. Los dúplex de ARNip hibridados (purificados por RP-HPLC) se adquirieron en Proligo. Los cultivos neuronales a DIV6 en placas de 24 pocillos (7 x 10<sup>6</sup>/pocillo) o cubreobjetos de 4 cámaras Lab-Tek<sup>®</sup> (1,33 x 10<sup>6</sup>/pocillo) se transfectaron durante 6 h con los ARNip (3,8  $\mu\text{g}$ ) usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Después las neuronas se lavaron y devolvieron a medio N5 completo durante 16 horas adicionales, antes de someterse, o no, a tratamiento durante 24 horas con SD o ionomicina.

**Análisis RT-PCR**

55 La extracción de ARN se realizó directamente en placas de 24 pocillos (1,33 x 10<sup>6</sup> neuronas) o 6 pocillos (7 x 10<sup>6</sup> neuronas) con el Kit de mini RNeasy (Qiagen) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La transcripción inversa se realizó usando transcriptasa inversa RNasa H<sup>-</sup> Superscript<sup>™</sup> II (Invitrogen). Los cebadores de PCR se adquirieron de Proligo: cebador directo *Bax* 5'-AGAGGCAGCGGCAGTGAT-3', cebador inverso *Bax* 5'-AGACACAGTCCAA GGCAGTGG-3'; cebador directo *caspasa-2* 5'-GAGCAATGTGCACTTCACTGG-3', cebador

inverso *caspa-2* 5'-CCACACCATGTGAGAGGAGTG-3'; cebador directo *caspa-9* 5'-AGCTGGAGCCGTCACAGCC-3', cebador inverso *caspa-9* 5'-CTCCGCCAGAACCAATGTCC-3'; cebador directo *GAPDH* 5'-GGTCGGAGTCAACGG ATTTGGTGC-3', cebador inverso *GAPDH* 5'-CCTCCGACGCCT-GCTTACCAC-3'. Las condiciones de amplificación fueron 94 °C durante 1 min, seguido por: 30 ciclos para *Bax* a 94 °C durante 30 s, 58 °C durante 30 s, 72 °C durante 1 min después 72 °C durante 15 min; 35 ciclos para *caspa-2* y *caspa-9* o 25 ciclos para *GAPDH* a 94 °C durante 30 s, 54 °C durante 30 s, 72 °C durante 1 min, después 72 °C durante 15 min. Después de la PCR, 20 µl se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1,5% y las bandas se observaron por transparencia UV con tinción bromuro de etidio antes de realizar una fotografía. Se usó *GAPDH* como un control de amplificación interno.

## 10 Preparación del citosol y fraccionamiento subcelular

Las neuronas (7 x 10<sup>6</sup> en placas de 6 pocillos) se recogieron a 4 °C en 50 µl de tampón CSF (manitol 220 mM, sacarosa 68 mM, piruvato 5 mM, EGTA 0,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, NaCl 2 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,5 mM, ditiotretol 1 mM, citocalasina B 20 µM y Hepes 10 mM, pH 7,5) complementado con cóctel de inhibidores de proteasa completa (Roche), después se fraccionaron con cinco ciclos de congelación-descongelación en nitrógeno líquido. Las muestras se centrifugaron a 900 g durante 5 min a 4 °C para extraer los núcleos y las células no fraccionadas, seguido por centrifugación a 10.000 g durante 30 min a 4 °C para obtener la membrana pesada enriquecida en mitocondrias. Después las muestras se centrifugaron a 100.000 g durante 10 minutos a 4 °C para sedimentar los microsomas. El material se resuspendió en Tris-HCl 25 mM pH 7,4, NaCl 25 mM, EDTA 5 mM, Triton X-100 al 1% antes de la determinación de la concentración de proteína por el procedimiento de ensayo Bradford. Se usaron 10 µg de cada fracción para el análisis de transferencia de Western.

## Extracción de proteínas y análisis de Transferencia de Western

Las neuronas se lisaron a TA en Tris-HCl 25 mM pH 7,4, NaCl 25 mM, EDTA 5, Triton X-100 al 1% complementado con cóctel de inhibidores de proteasa completo (Roche). La concentración de proteína se determina usando el kit de ensayo de proteínas Bio-Rad. Las proteínas (30 µg para *caspa-2*; 10 µg para *Bax*) se separaron en geles de poliacrilamida al 12,5% y se transfirieron a membranas de PVDF (Amersham). La inmunotinción se reveló usando ECL (Amersham Pharmacia Biotech). El anticuerpo anti-*caspa-2* de ratón monoclonal (11B4, Alexis Biochemicals) se usó a una dilución 1:100; el anticuerpo policlonal (Δ21, Santa Cruz Biotechnology) suscitado contra *Bax* α de ratón deleciónado para los 21 aminoácidos carboxi terminales se usó a una dilución de 1:200; el anticuerpo policlonal (N20, Santa Cruz Biotechnology) suscitado contra el extremo amino de *Bax* α (que reconoce los restos 11 a 30) se usó a una dilución de 1:1000. Se usó actina (42 kDa; Sigma; 1:5000) como un control de carga equivalente. Se usó la inmunotransferencia de la proteína 60 de choque térmico (HSP60) con un anti-HSP monoclonal de ratón (Sigma; 1:400) para comprobar la pureza de la fracción de la membrana pesada enriquecida en mitocondrias.

## Escisión *in vitro* de VDVAD-AMC por *caspa-2* recombinante

La actividad de la *caspa-2* recombinante humana (Sistema de Ensayo BIOMOL QuantiZyme™) se evaluó en 100 µl de tampón de ensayo (HEPES 50 mM, pH 7,4, NaCl 100 mM, CHAPS al 0,1%, DTT 10 mM, EDTA 1mM, glicerol al 10%). La escisión de VDVAD-AMC 50 µM por *caspa-2* recombinante (125 U) se midió después de 30 minutos a 37 °C en un lector de microplaca de fluorescencia controlando la emisión de fluorescencia a 510 nm después de la excitación a 405 nm. Para la inhibición de la actividad VDVADasa, se preincubaron inhibidores (2 µM) 30 minutos a 37 °C en presencia de *caspa-2* antes de posterior incubación con VDVAD-AMC 5 µM (30 min, 37 °C). Solo con VDVAD-AMC no se observó fondo de fluorescencia apreciable.

## Isquemia perinatal

Se obtuvieron ratas Wistar recién nacidas (la madre más 9 crías por lecho) de Janvier (Le Genest-St-Isle, Francia) en la que las crías tenían 3-4 días de vida. Las crías se enjaularon con sus madres en un ciclo de luz/oscuridad de 12:12 h con agua y alimento a discreción. Los experimentos con los animales se realizaron de acuerdo con las directrices Francesa y de la Comunidad Europea para el cuidado y uso de animales experimentales. Se realizó isquemia en las ratas de 7 días de vida (17-21 g), como se ha descrito anteriormente (Renolleau y col., 1998). Las crías de ratas se anestesiaron con inyección intraperitoneal de hidrato de cloral (350 mg/kg). Las ratas anestesiadas se pusieron de espaldas y se realizó una incisión media en el cuello para exponer la arteria carótida común izquierda. Después las ratas se colocaron en el lado derecho y se realizó una incisión oblicua en la piel entre la oreja y el ojo. Después de la escisión del músculo temporal, se extirpó el hueso craneal desde la sutura frontal a un nivel por debajo del arco cigomático. Después, la arteria cerebral media izquierda, expuesta justo después de su aparición sobre la fisura renal, se coaguló al nivel inferior de la vena cerebral. Después de este procedimiento, se colocó una grapa para ocluir la arteria carótida común izquierda. Después las ratas se introdujeron en una incubadora para impedir la hipotermia. Después de 50 minutos, la grapa se retiró. Se verificó la restauración del flujo sanguíneo carótido usando un microscopio. Después se cerraron las incisiones en la piel craneal y del cuello. Durante el procedimiento quirúrgico, la temperatura corporal se mantuvo a 37-38 °C. Las crías se trasladaron a incubadora (32 °C) hasta su recuperación después de sus madres.

Se administraron inhibidores de caspasa por vía intraperitoneal a una dosis de 50  $\mu\text{g}$  por 10 g de peso (en 100  $\mu\text{l}$ ) 5 minutos antes de la aparición de la isquemia (n= 15 para Q-VD-OPH, n= 14 para Qco-VDVAD-dfp). Los animales de control recibieron un volumen equivalente de solución salina al 0,9% que contenía DMSO al 10% (n=15), el vehículo necesario para solubilizar los inhibidores caspasa (grupo tratado con vehículo). La tasa de mortalidad durante la isquemia o antes de la destrucción no fueron diferentes entre los grupos tratados con Q-VD-OPH-, Qco-VDVAD-dfp y vehículo (< 4%). Se sacrificó a las ratas 48 horas después de la reperfusión y se extirparon los cerebros. La lesión por infarto (zona pálida) la puntuó visualmente un observador que no conocía el tratamiento de los animales. Los cerebros sin una zona pálida isquémica transparente se observaron con una lupa. Los que no presentaban oclusión MCA clara se descartaron (2 animales en el grupo tratado con Q-VD-VAD). Después, los cerebros se fijaron 2 días en formaldehído tamponado al 4%. Se cortaron secciones de cerebro coronales de cincuenta micrómetros en un criostato y se recogieron en portaobjetos revestidos con gelatina. Se seleccionaron dieciséis cortes del cuerpo estriado anterior al hipocampo posterior (correspondiente a las placas 9 a 27 en el atlas cerebral de rata de Paxinos), extraído a intervalos de 0,5 mm igualmente distanciados. Las áreas de lesión se midieron en cortes teñidos con violeta de cresilo usando un analizador de formación de imágenes (programa informático NIH image), y las distancias entre las secciones coronarias respectivas se usaron para calcular el volumen de infarto.

Se realizó análisis estadístico de la siguiente manera. Suponiendo un riesgo beta de 0,2 y un riesgo alfa de 0,05, se calculó que 15-16 animales en cada grupo eran necesarios para detectar una reducción del volumen de infarto al 50% entre los dos grupos. Los datos se extrajeron del estudio anterior (Ducroq y col., 2000). Dado que los tres grupos de animales se compararon en los experimentos, esos valores son solo informativos. Una lista predeterminada con bloques de seis animales se usó para distribuir al azar a los animales entre los tres grupos. Un investigador que desconocía el estado del tratamiento realizó todas las mediciones. La diferencia entre las medias se evaluó mediante un ensayo de comparación múltiple no paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido por el ensayo de Newman-Keul de valores no paramétricos. Se consideró que las diferencias eran significativas a nivel del 5% ( $P < 0,05$ ).

#### 25 Ref. Ejemplo IV: Diseño de un ARNip específico para el silenciamiento de caspasa-2 humana

Se diseñó un ARNip (ARNhipC2 wt) específico para la reducción de la expresión del gen de caspasa-2 para aplicaciones posteriores con respecto a lesiones y enfermedades en seres humanos (isquémicas y otras). Estos dúplex de ARNip estaban formados por las siguientes secuencias complementarias:

SEC ID N°: 6 5'-caucuucuggagaaggacadTdT-3'

30 SEC ID N°: 7 5'-uguccuuccagaagaugdTdT-3'

Se desarrolló una estrategia experimental para ensayar dicho ARNip basándose en el modelo de Robertson (Robertson y col., 2002), que demostró que la inhibición de caspasa-2 por Z-VDVAD-FMK disminuyó parcialmente la liberación del citocromo c y la exposición de restos de fosfatidilserina en linfocitos T Jurkat.

35 Después se realizó la inhibición de caspasa-2 farmacológica (Z-VDVAD-FMK, Q-VD-OPH; todas de ICN) o la disminución de la expresión del gen de caspasa-2 (ARNip) en células Jurkat tratadas con VP-16.

#### Validación de ARNip en células humanas

40 El pretratamiento por la pan-caspasa Q-VD-OPH (25-100  $\mu\text{M}$ ) o el inhibidor selectivo de caspasa-2, Z-VDVAD-FMK (25-100  $\mu\text{M}$ ) impide la muerte celular inducida por el inhibidor de topoisomerasa II y lesión de ADN, VP16 (Figura 18). La supervivencia a las 7-8 horas se obtuvo frente a una gran diversidad de concentraciones de VP16 (Figura 18). El hecho de que Z-VDVAD-FMK bloquee la pérdida de  $\Delta\Psi_m$  sugiere que la activación de caspasa-2 se produce aguas arriba de la mitocondria en este paradigma. Por consiguiente en la Figura 19, los datos muestran que:

(i) la pérdida de  $\Delta\Psi_m$  progresiva no está anulada por Z-DEVD-FMK, Z-LEHD-FMK, Z-LETD-FMK, sino únicamente por Z-VDVAD-FMK o Q-VD-OPH;

45 (ii) Z-DEVD-FMK, Z-LEHD-FMK, Z-LETD-FMK no modifican la activación de la caspasa-2 lo que sugiere que la caspasa-2 es la caspasa más aguas arriba estudiada;

(iii) la inhibición de caspasa-9 impide la activación de caspasa-3 pero la inhibición de caspasa-3 no impide la activación de caspasa-9, lo que demuestra que la caspasa-3 está activada a través de la caspasa-9;

(iv) las alteraciones nucleares terminales y PMP están en su mayor parte impedidas por Z-VDVAD-FMK, Q-VD-OPH y a un menor grado por Z-LEHD-FMK;

50 (v) el bloqueador ANT BA, atenúa la pérdida de  $\Delta\Psi_m$  y PMP confirmando el papel de las mitocondrias en la mediación del efecto proapoptótico de la caspasa-2 activada;

(vi) la muerte celular dependiente de caspasa-2-VP16 no depende de la traducción ni transcripción, dado que CHX y ActD no impiden a pérdida de  $\Delta\Psi_m$  ni PMP;

(vii) La ruta dependiente de caspasa-8 no es importante en este modelo dado que Z-LETD-FMK no puede impedir la pérdida de  $\Delta\Psi_m$ , activación de caspasa-2 y -3, la alteración nuclear y PMP. Finalmente, todos los datos ponen de manifiesto un modelo en el que la activación pre-mitocondrial de caspasa-2 induce la disminución de  $\Delta\Psi_m$ , y promueve acontecimientos aguas abajo, al igual que la activación de caspasas-9/caspasa-3, condensación/fragmentación nuclear y PMP terminal.

Este paradigma ha permitido ensayar y validar el ARNip humano dirigido contra caspasa-2. En primer lugar, el ARNhip C2 wt puede disminuir la expresión de la proteína pro-caspasa-2 en células HeLa y Jurkat, respectivamente (como se muestra mediante análisis por Transferencia de Western en Figura 20 A). Todas las células se transflectaron y se sometieron al ensayo por detección de fluorescencia en las células de ARNip-FITC por citometría de flujo. Una vez transflectadas estas células, también se protegieron contra un tratamiento posterior de 7 horas con VP16 (Figura 21A-B), demostrando la validez del ARNhip C2 wt.

### Sección experimental

#### Cultivo de células:

Se adquirieron células Jurkat en ATCC (clon E6-1) y se cultivaron a una densidad de 100000-120000 células/pocillo (placas de 24 pocillos) en medio RPMI 1640 (rico en Glutamax) complementado con suero bovino fetal al 10%. La célula E6-1 Jurkat (número ATCC: TIB-152) es un clon de Jurkat-FHCRC, un derivado de la línea de células Jurkat (previamente establecido de sangre periférica de un niño de 14 años por Schneider y col. (1977) y originalmente diseñada JM). Las células se usaron en los pases 7-14 de los experimentos.

#### Inducción de la apoptosis y ensayo de citoprotección

Las células se pretrataron con diversos agentes farmacológicos durante 30 minutos-1 hora, antes de tratamiento con VP16 posterior (VP16 o etopósido; Sigma) (10-20  $\mu\text{M}$ ) durante 7-8 horas. Para los experimentos con ARNip, las células se trataron durante 24 horas con 3,8  $\mu\text{g}$  de ARNip (Proligo)/ 2  $\mu\text{l}$  de lipofectamine 2000 (en 500  $\mu\text{l}$ ), antes del tratamiento con VP16. Se usó caspasa-2 murina (ID N° 1-2 o ID N° 3-4) como control negativo. El producto de transfección se comprobó en la célula por detección con fluorescencia (citometría de flujo, FL-1) de ARNip-FITC (ID N° 1-2, ID N° 3-4 o ID N° 6-7)

#### Estudio de los parámetros de la apoptosis por citometría de flujo y microscopia de fluorescencia

##### Citometría de flujo

Tinción doble JC-1/7AAD: el potencial transmembrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) se evaluó por la adición de colorante sensible a  $\text{DY}_m$  yoduro de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbencimidazolilcarbocianina (JC-1, Molecular Probes, 1  $\mu\text{M}$ ). La fluorescencia verde (baja  $\Delta\Psi_m$ ) y naranja (alta  $\Delta\Psi_m$ ) se adquirieron respectivamente en los canales FL-1 y FL-2, respectivamente. El PMP se detectó por la incorporación de 7-actinomicina D (7AAD; 0,02 mg; Sigma) (canales FL-3). Como alternativa, se realizó doble tinción DioC6 (0,1  $\mu\text{M}$ )/PI (5  $\times 10^{-3}$  mg) y se detectó en los canales FL-1 y FL-2, respectivamente. Para cada condición se adquirieron al menos 7000 acontecimientos.

##### **Microscopia de fluorescencia**

Las caspasas-2, -3 y -9 activadas se detectaron usando péptidos específicos conjugados con FAM (denominados Inhibidor de Caspasa Marcado con Fluorocromo, FLICA: Kits de Actividad Caspasa con fluoresceína CaspaTag™, Q-Biogen, Illkirch, Francia; Kits de Detección de Caspasa ApoFluor™, ICN, Orsay, Francia): FAM-VDVAD-FMK, FAM-DEVD-FMK, FAM-LETD-FMK y FAM-LEHD-FMK, respectivamente. Las células se incubaron con los FLICA (1:150, CaspaTag™ o 1:500, ApoFluor™) durante 1 hora a 37 °C, después se lavaron tres veces en tampón de lavado. Para FM, los péptidos conjugados con FAM se excitaron a través del filtro BP 480/40 y la luz emitida se recogió a través del filtro BP 527/30. La permeabilidad de la membrana plasmática (PMP) se detectó a través de la unión aumentada de 7-amino Actinomicina D (0,02 mg 7-AAD, Sigma) al ADN nuclear (excitado a través de filtro BP515-560 y la fluorescencia se recogió a través del filtro de emisión de largo alcance LP590). Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33342 1  $\mu\text{M}$  (30 min) y se analizaron (filtro de excitación BP 340-380/ filtro de largo alcance LP 425). El potencial transmembrana mitocondrial se evaluó por JC-1 (1  $\mu\text{M}$ , 30 min): las fluorescencias verde y naranja se registraron simultáneamente después de 1,2 s de excitación (filtros de excitación BP 450-490 / emisión de largo alcance LP 515).

#### **Ref. Ejemplo V: ARNhp**

##### Construcción y validación del ARNhp

Incluso si el ARNip fuese capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, sería inestable en los fluidos biológicos, por tanto el obstáculo difícil de superar será una administración intracelular *in vivo*. Recientemente, diversos avances han puesto de manifiesto virus como excelentes vehículos para la administración de ARNip. Por ejemplo, retrovirus y adenovirus, los vectores de suministro de transgenes de selección de diversos estudios de terapia génica experimental, se han diseñado para administrar y expresar de manera estable el ARNip terapéutico en las células,

tanto *in vitro* como *in vivo*. De hecho, las versiones recombinantes de ARNip: ARN de horquilla pequeño (hp) (expresión de ARNip constitutivo como versión de bucle en horquilla bajo el control de un promotor de ARN pequeño) se ha producido para resolver este problema. La expresión de ARNhp puede inducirse en estructuras lentivirales por ejemplo, que pueden usarse para transfectar de manera estable neuronas *in vivo*, por administración local en el cerebro (inyección intracerebroventricular por ejemplo), que podría permitir el silenciamiento permanente del gen diana.

Para generar en las células la estructura ARNip estable, se ha desarrollado el concepto de la estructura en horquilla pequeña que consiste en la expresión de las secuencias en sentido y antisentido del ARNip unido a una pequeña secuencia y seguido por la señal de terminación (TTTTT) de la pol III polimerasa. Esta secuencia está bajo el control de promotores de pol III de los genes del ARN nuclear pequeño U6 o RnasaP H1 y conducen a la expresión de una gran cantidad de ARNip en horquilla pequeña (ARNhp) en células transfectadas. Un rápido procesamiento de la parte de bucle indudablemente por DICER conduce a la formación del ARNip funcional. Recientemente se ha desarrollado un plásmido (pGE-1) (Stratagene) y se ha utilizado este vector de expresión de mamíferos de ARNhp para proporcionar una supresión prolongada eficaz del gen diana. El ARNhp se genera a partir de un transcrito de ARN (controlado por un promotor U6) que consiste en cadenas sentido y antisentido separadas por una secuencia bucle. El transcrito de ARN se repliega sobre sí mismo para formar una horquilla. El vector de expresión pGE-1 se ha optimizado para suprimir la expresión de genes diana en células de mamífero. Para obtener un vector de expresión que contenga el ARNhp específico de caspasa-2 murina se diseñaron dos oligonucleótidos (Figura 22A), que consistían en dos repeticiones invertidas separadas por una secuencia bucle y seguido por un engarce poli(T) de 6 nucleótidos que sirve como un terminador de la transcripción para la ARN polimerasa III.

SEC ID N°: 8 5'-GATCCCgcacctctagagaaggacaGAAGCTTGtgccttctctaggagtgTTTTTT-3'

SEC ID N°: 9 5'-CTAGAAAAAcacctctagagaaggacaCAAGCTTCtgccttctctaggagtgCGG-3'

Después de la hibridación de los dos oligonucleótidos se obtuvo un inserto hp (Figura 22B) que se clonó en los sitios BamH I y Xba I del vector pGE-1. Después de seleccionar las colonias positivas mediante PCR se seleccionaron 2 clones (ARN6hp y ARN9hp). Estos clones se secuenciaron y mostraron la inserción derecha de la secuencia hp bajo el control del promotor U6.

Para validar estas construcciones de ARNhp como una herramienta para la regulación negativa de la caspasa-2, se transfectaron células 3T3 (células murinas) con los vectores ARN6hp y ARN9hp y se comprobó el nivel de expresión mediante Transferencia de Western de caspasa-2 en extractos totales de las células 3T3 24 y 48 horas después de la transfección (Figura 23).

Parece que ambas construcciones ARN6hp y ARN9hp pueden regular por disminución la expresión de caspasa-2 en células 3T3 48 horas después de la transfección. Este resultado muestra que una estrategia con ARNhp es útil como una herramienta para el silenciamiento *in vivo* de la expresión de caspasa-2. De hecho, el ARNm de caspasa-2 que se dirige al inserto hp podría introducirse en diversas estructuras virales (lentivirus, adenovirus, Semliki virus o cualquier estructura viral con un campo de aplicación terapéutico) permitiendo así una administración eficaz *in vivo* y un silenciamiento eficaz y prolongado de la expresión de caspasa-2.

Además, la construcción ARNhp específica se había obtenido para aplicación en seres humanos:

SEC ID N°: 10 5'-GATCCCGcatcttctggagaaggacaGAAGCTTGtgccttctccagaagtgTTTTTT-3'

SEC ID N°: 11 5'-CTAGAAAAAcacatcttctggagaaggacaCAAGCTTCtgccttctccagaagtgCGG-3'

#### Sección experimental

Se sintetizaron dos oligonucleótidos complementarios con salientes 5' BamH I y 3' Xba I (Proligo). Después de una etapa de hibridación, estos oligonucleótidos se clonaron en un vector pGE-1 previamente digerido (BamH I/Xba I) (Stratagene). Después de la selección por PCR de los clones positivos que contienen el inserto, se amplificaron dos clones y su secuencia se verificó (ARN6hp y ARN9hp).

Se transfectaron células 3T3 sembradas en placas de 6 pocillos el día antes usando el reactivo lipofectamine 2000 y 0,8 µg de plásmidos ARN6hp o ARN9hp durante 6 horas. El nivel de transfección se controló usando un vector GFP. 24 y 48 después de la transfección, las células se recogieron en tampón de lisis (Tris-HCl 25 mM, pH 7,4, NaCl 25 mM, EDTA 5 mM, Triton X-100 al 1%) y la concentración de proteína se determinó usando el Reactivo Bradford (BioRad). Las proteínas (20 µg por muestra) se separaron en geles de poliacrilamida al 12,5% (SDS-PAGE) y se transfectaron en membranas de PVDF (Amersham). Después de explorar con un anticuerpo monoclonal anti-ratón específico para caspasa-2 (11B4, Alexis Biochemicals, usado a una dilución 1:1000), la inmunoreactividad se detectó con un kit de quimioluminiscencia (ECL, Amersham).

Tabla 1. Las caspasas desempeñan un papel crucial en la regulación de la apoptosis relacionada con SD de neuronas corticales primarias.

Compuestos ensayados	$\square$ , $\mu$ M	Dianas/Actividad específica	Supervivencia
Actinamicina D	0,016	Síntesis de ARN	Sí
Cicloheximida	1	Síntesis proteica <i>de novo</i>	Sí
Q-YD-OPH	100	Caspasas de amplio espectro	Sí
z-VAD-fmk	100	Caspasas de amplio espectro	No
BOC-D-fmk	100	Caspasas de amplio espectro	No
Decil-Ubiquinona	10	Cadena respiratoria de complejo III; PTP	No
DIDS	50	Canales aniónicos; VDAC (PTP)	No
Ciclosporina A	1	Ciclofirina D (PTP)	No
Rojo Rutenio	50	Captación de Calcio Mitocondrial; VDAC (PTP)	No
Rapamicina	1	Diana de Mamífero de Rapamicina (mTOR) o Proteína Asociada a Rapamicina-FKBP12 (FRAP)	No No
3-Metiledenina	1000	pH lisosomal (inducción de alcalinización)	No
Bafilomicina A1	1	H <sup>+</sup> -ATPasa de tipo vacuolar lisosomal	No
z-FA-fmk	100	Actividad similar a catepsina B	No
z-FF-fmk	150	Actividad similar a catepsina L	No
Pepstatina	50	Actividad similar a catepsina D	No
E64d	100	Calpaínas + actividades similares a catepsinas B, H, L	No
ALLN	25/150	Calpaína I/20 S Proteasoma	No/No
ALLM	25/100	Calpaína II/20 S Proteasoma	No/No
MDL-28170	1-100	Calpaína I + II]	No
Pefabloc AEBSF	100	Actividad serina proteasa	No
Lactacistina	0,1-10	20S Proteasoma	No
Epoxomicina	0,1-10	20S Proteasoma	No
BAPTA-AM	50	Quelación selectiva de reservas de calcio citosólicas	No
Aminopurvalanol	500	Quinasas Dependientes de Ciclina (CDX) 1,2,5	No

(continuación)

Compuestos ensayados	$\square$ , $\mu\text{M}$	Dianas/Actividad específica	Supervivencia
Roscovitina	250	CDK1,2,5	No
SB 202190	50	Proteína Quinasa Activada por Mitógeno p38 (MAPK)	No
PD 38059	50	Proteína Quinasa Activada por Mitógeno Quinasa (MEK1)	No
SP 600125	50	Jun N-terminal Quinasas (JNK)	No
Genisteína	100	Tirosina Quinasas	No
Wonnannina	100	Fosfoinositida 3' ( $\text{PI}_3$ ) Quinasa	No
Aspirina	100	IKK	No
H-7	100	PKC ( $\gg$ PKA(PKG))	No
Ácido okadaico	0,01	Fosfatasa : PP2A	No
Microcistina LR	1-100	Fosfatasas : PP1 + PP2A	No
TroloxO	100-1000	Antioxidante	No
N-Acetil-Cisteína	100-1000	Antioxidante	No
Glutatión	100-1000	Antioxidante	No
Leptomicina B	0,05	Translocación nucleocitoplásmica de proteínas que contienen una <b>señal de exportación</b> nuclear	No No

5 La tabla muestra una amplia diversidad de clases de agentes farmacológicos ensayados en el modelo SD que pudieron o no promover la supervivencia, es decir, impedir el colapso de  $\Delta\Psi_m$ , NA, exposición a PS, PMP, activación de caspasas y alteraciones de neuronas. Todos los compuestos se añadieron al inicio de la SD. VDAC: canal aniónico dependiente de voltaje; PTP: poro de transición de permeabilidad.

REFERENCIAS

Caserta, T. M., Smith, A. N., Gultice, A. D., Reedy, M. A., y Brown, T. L. (2003). Q-VD-OPh, a broad spectrum caspase inhibitor with potent antiapoptotic properties. *Apoptosis* 8, 345-352.

10 Chang, L. K., y Johnson, E. M. Jr. (2002). Cyclosporin A inhibits caspase-independent death of NGF-deprived sympathetic neurons: a potential role for mitochondrial permeability transition. *J. Cell Biol.* 157, 771-781.

Choi, W. S., Lee, E. H., Chung, C. W., Jung, Y. K., Jin, B. K., Kim, S. U., Oh, T. H., Saïdo, T. C., y Oh, Y. J. (2001). Cleavage of Bax is mediated by caspase-dependent or - independent calpain activation in dopaminergic neuronal cells: protective role of Bcl-2. *J. Neurochem.* 77, 1531-1541.

15 Deckwerth, T. L., Elliott, J. L., Knudson, C. M., Johnson, E. M. Jr, Snider, W. D., y Korsmeyer, S. J. (1996). BAX is required for neuronal death after trophic factor deprivation and during development. *Neuron.* 17, 401-411.

Deshmukh, M., Vasilakos, J., Deckwerth, T. L., Lampe, P. A., Shivers, B. D., y Johnson, E. M. Jr. (1996). Genetic and metabolic status of NGF-deprived sympathetic neurons saved by an inhibitor of ICE family proteases. *J. Cell Biol.* 135, 1341-1354.

20 Deshmukh, M., y Johnson, E. M. Jr. (1998). Evidence of a novel event during neuronal death: development of competence-to-die in response to cytoplasmic cytochrome c. *Neuron* 21, 695-705.

Ethell DW y Green DR (2002) Assessing Cytochrome-c release from mitochondria. In: *Apoptosis techniques and protocols.* (Humana Press), pp 21-34

Johnson EJ (1995) Methods for studying cell death and viability in primary neurons. *Meth Cell Biol* 46 243-276.

25 Kawamoto JC, y Barrett JN (1986) Cryopreservation of primary neurons for tissue culture. *Brain Res* 384: 84-93.

- Knusel B, Michel PP, Schwaber JS, y Hefti F (1990) Selective and nonselective stimulation of central cholinergic and dopaminergic development in vitro by nerve growth factor, basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, insulin and the insulin-like growth factors I and II. *J Neurosci* 10: 558-570.
- 5 Lecoeur H, de Oliveira Pinto L, y Gougeon ML (2002) Multiparametric flow cytometric analysis of biochemical and functional events associated with apoptosis and oncosis using the 7-aminoactinomycin D assay. *J Immunol Methods* 265: 81-96.
- Lecoeur H, Fevrier M, Garcia S, Riviere Y y Gougeon ML (2001) A novel flow cytometric assay for quantitation and multiparametric characterization of cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods* 253: 177-187.
- 10 Lecoeur, H., Chauvier, D., Langonné, A., Rebouillat, D., Brugg, B., Mariani, J., Edelman, L., y Jacotot, E. (2004). Fixed- and real-time cytofluorometric technologies for dynamic analysis of apoptosis in primary cortical neurons. *Apoptosis* 9, 157-169.
- Lipton, P. (1999). Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol. Rev.* 79, 1431-1568.
- 15 Melnikov, V. Y., Faubel, S., Siegmund, B., Lucia, M. S., Ljubanovic, D., y Edelstein, C. L. (2002). Neutrophil-independent mechanisms of caspase-1- and IL-18-mediated ischemic acute tubular necrosis in mice. *J. Clin. Invest.* 110, 1083-1091.
- Plesnila N, Zinkel S, Le DA, Amin-Hanjani S, Wu Y, Qiu J, Chiarugi A, Thomas SS, Kohane, DS, Korsmeyer SJ, y Moskowitz MA (2001) BID mediates neuronal cell death after oxygen/glucose deprivation and focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98: 15318-15323.
- 20 Robertson, J. D., Enoksson, M., Suomela, M., Zhivotovsky, B., y Orrenius, S. (2002). Caspase-2 acts upstream of mitochondria to promote cytochrome c release during etoposide-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 277, 29803-29809.
- Schneider U, Schwenk HU, Bornkamm G. Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer.* 1977, 19:621-626.
- 25 Smolewski P, Grabarek J, Halicka HD, y Darzynkiewicz Z (2002) Assay of caspase activation in situ combined with probing plasma membrane integrity to detect three distinct stages of apoptosis. *J Immunol Methods* 265: 111-121.
- 30 Susin, S. A., Lorenzo, H., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D. R., Aebersold, R., Siderovski, D. P., Penninger, J. M., y Kroemer, G. (1999a). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397, 441-446.

**REIVINDICACIONES**

1. Un compuesto adecuado para inhibición de la actividad caspasa-2 que tiene la SEC ID N°: 5: quinolinilcarbonil-L-Valinil-L-Aspartil(metil éster)-L-Valinil-L-Alaninil-L-Aspartil(metil éster)2,6-difluorofenil éster.
- 5 2. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de la reivindicación 1 en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
3. Un compuesto que tiene la SEC ID N°: 5: quinolinilcarbonil-L-Valinil-L-Aspartil(metil éster)-L-Valinil-L-Alaninil-L-Aspartil(metil éster)2,6-difluorofenil éster para su uso como un medicamento.
- 10 4. Un compuesto que tiene la SEC ID N°: 5: quinolinilcarbonil-L-Valinil-L-Aspartil(metil éster)-L-Valinil-L-Alaninil-L-Aspartil(metil éster)2,6-difluorofenil éster para su uso en el tratamiento de una situación patológica que incluye hipoxia-isquemia, H-I, lesiones y situaciones similares a ictus.
5. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la lesión H-I es hipoxia-isquemia cerebral.
6. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el estado patológico es muerte neuronal, particularmente en hipoxia-isquemia global o focal.
- 15 7. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el estado patológico es muerte neuronal, particularmente en hipoxia-isquemia en adultos o neonatal.
8. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el estado patológico es muerte neuronal, particularmente en hipoxia-isquemia transitoria o permanente.
- 20 9. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el estado patológico es muerte neuronal, particularmente en Oclusión de Arteria Cerebral Media (OACM).

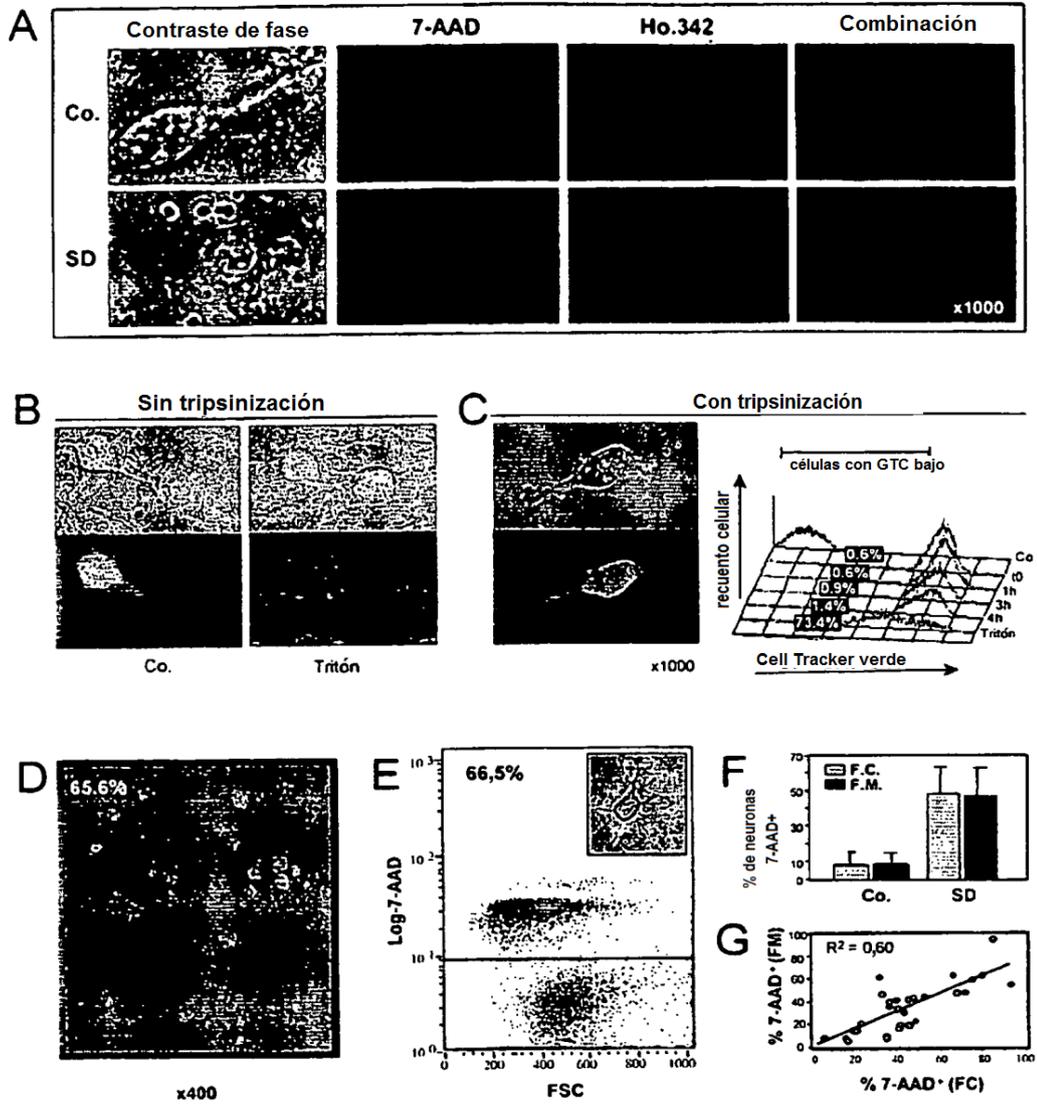


Figura 1

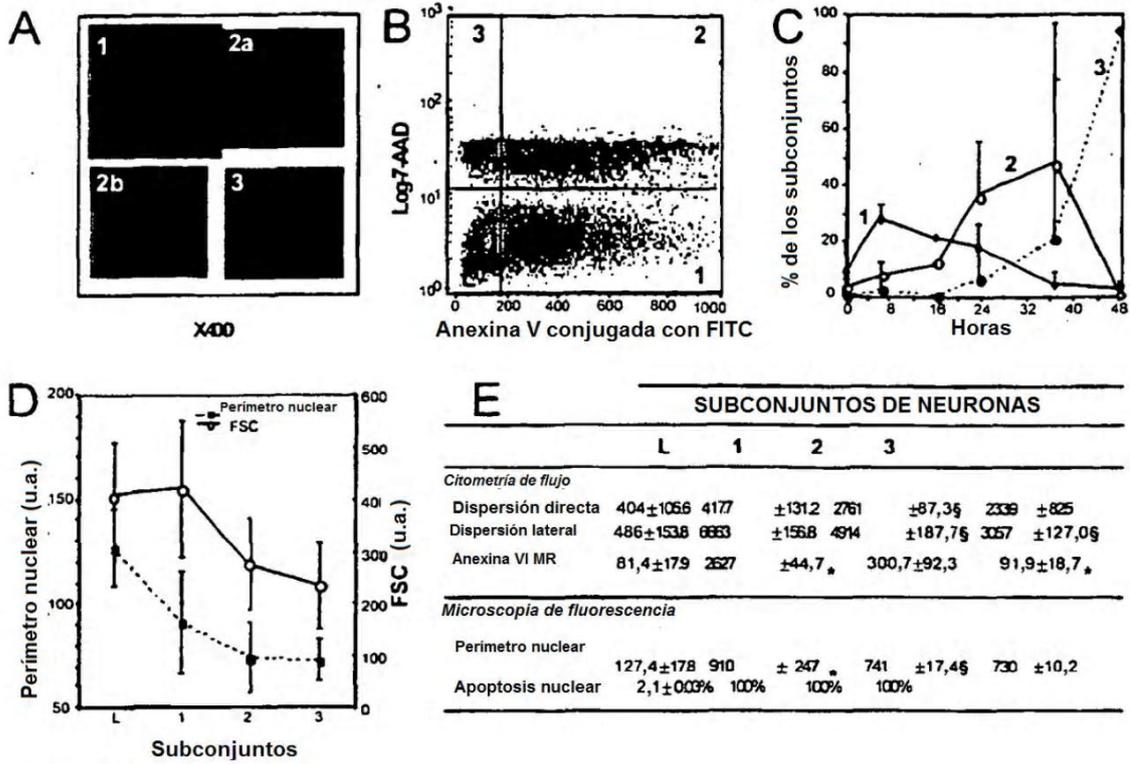


Figura 2

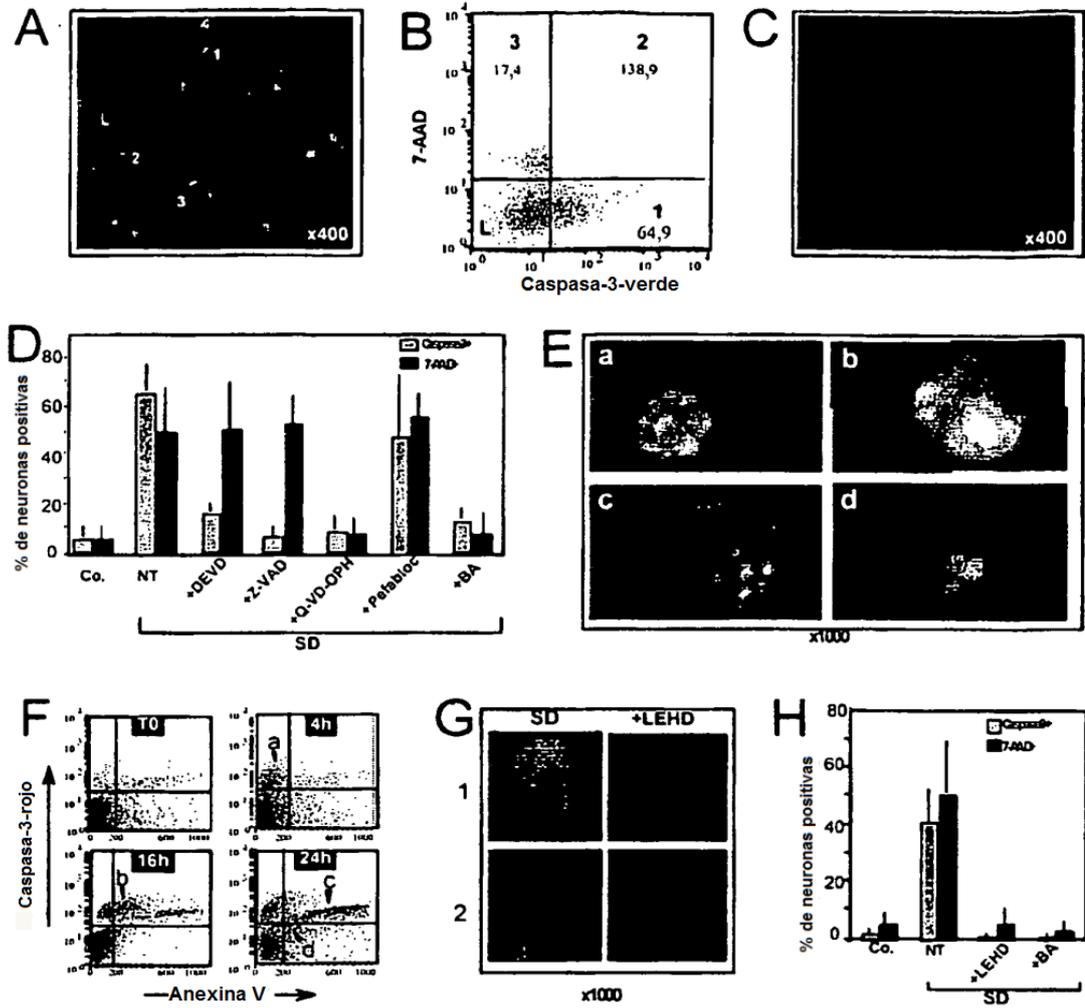


Figura 3

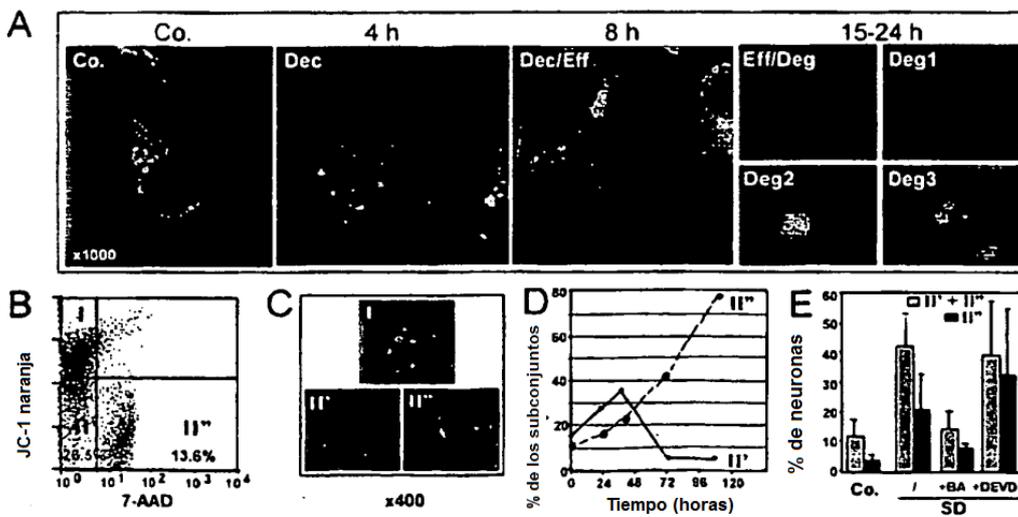


Figura 4

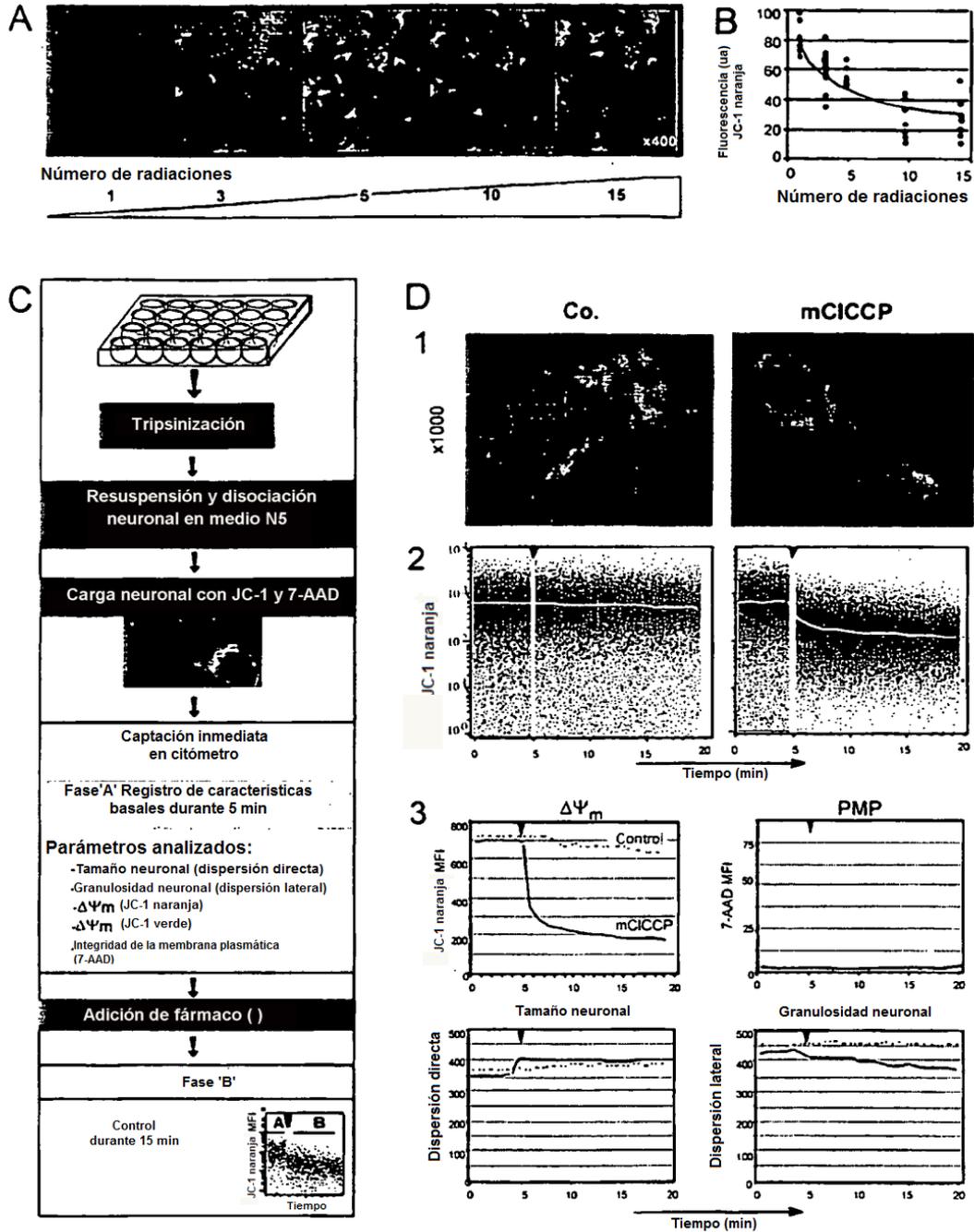


Figura 5

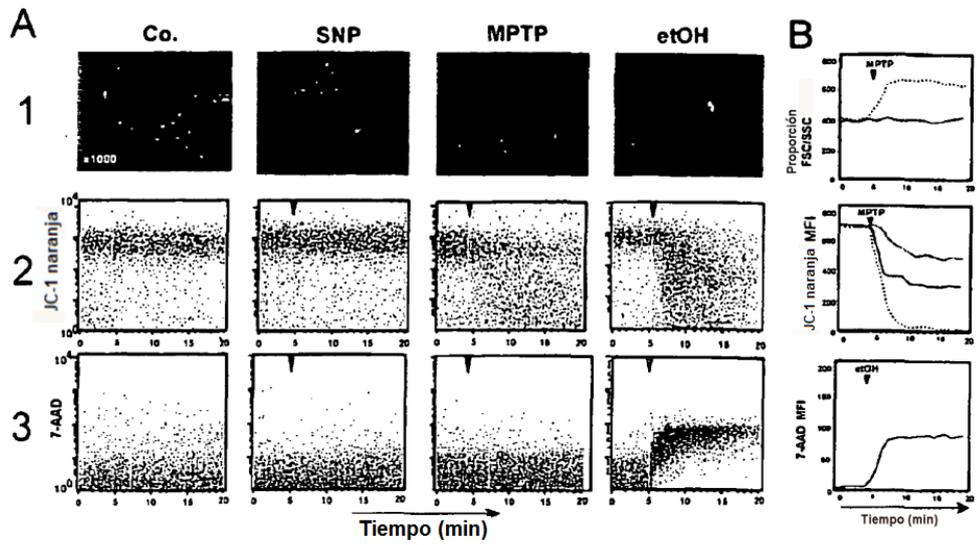


Figura 6

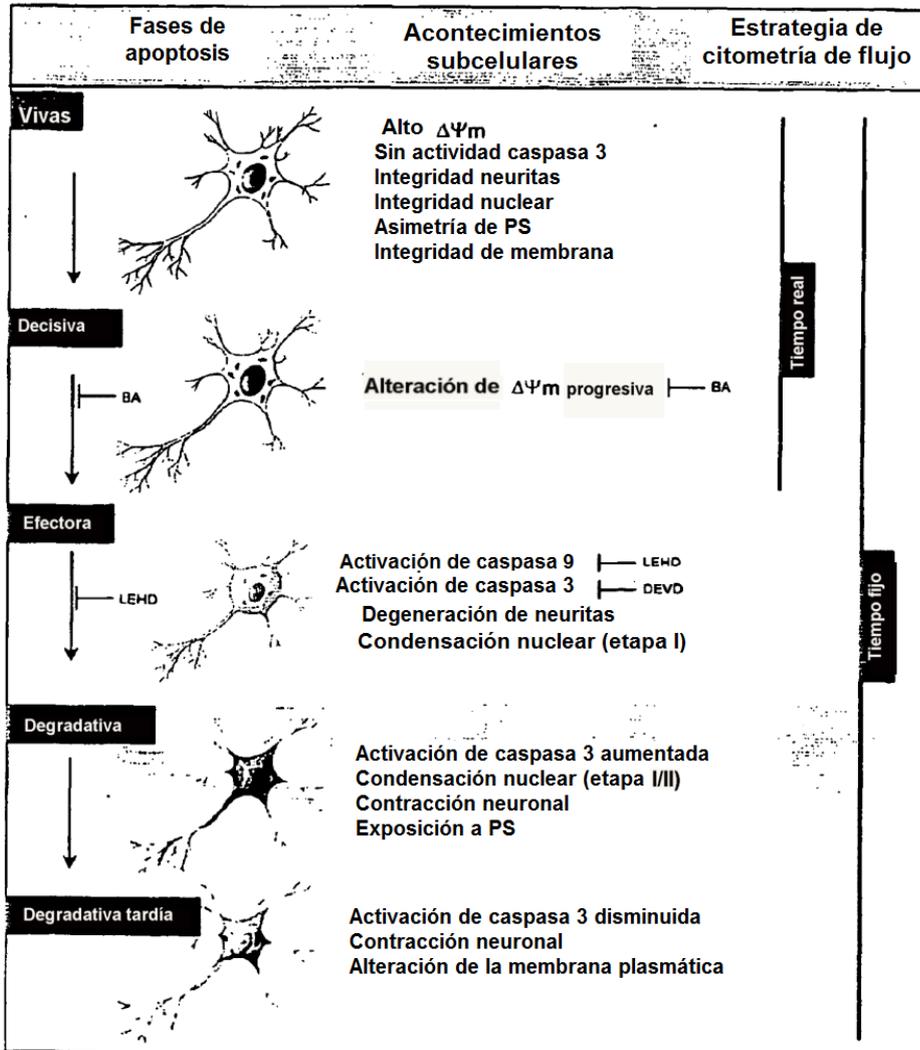


Figura 7

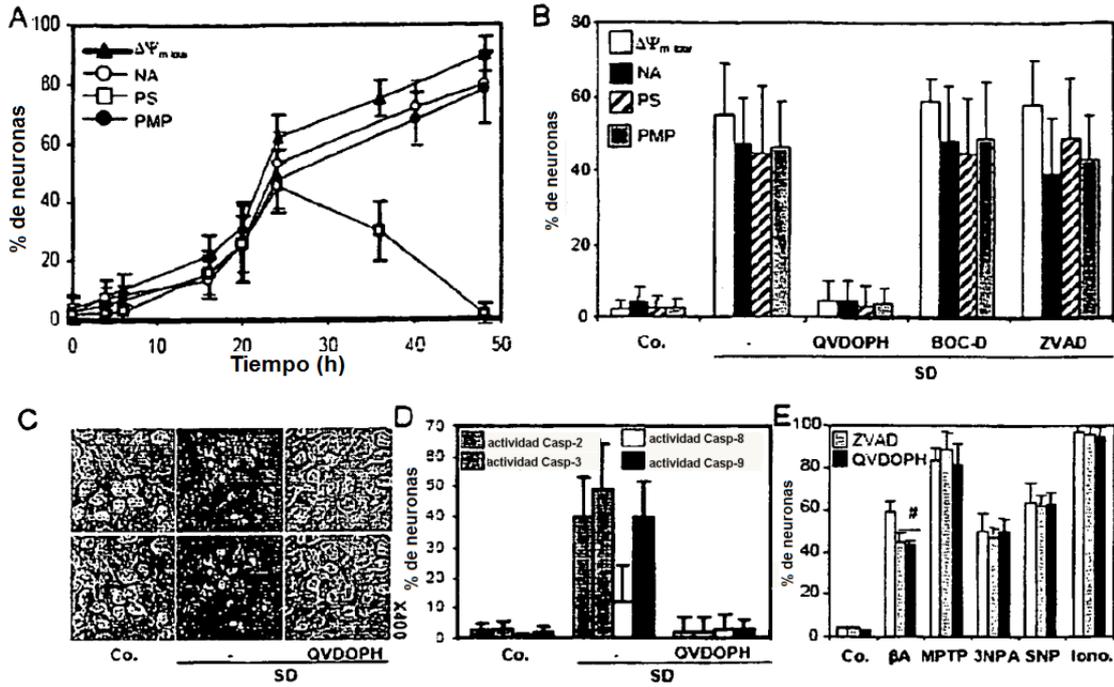


Figura 8

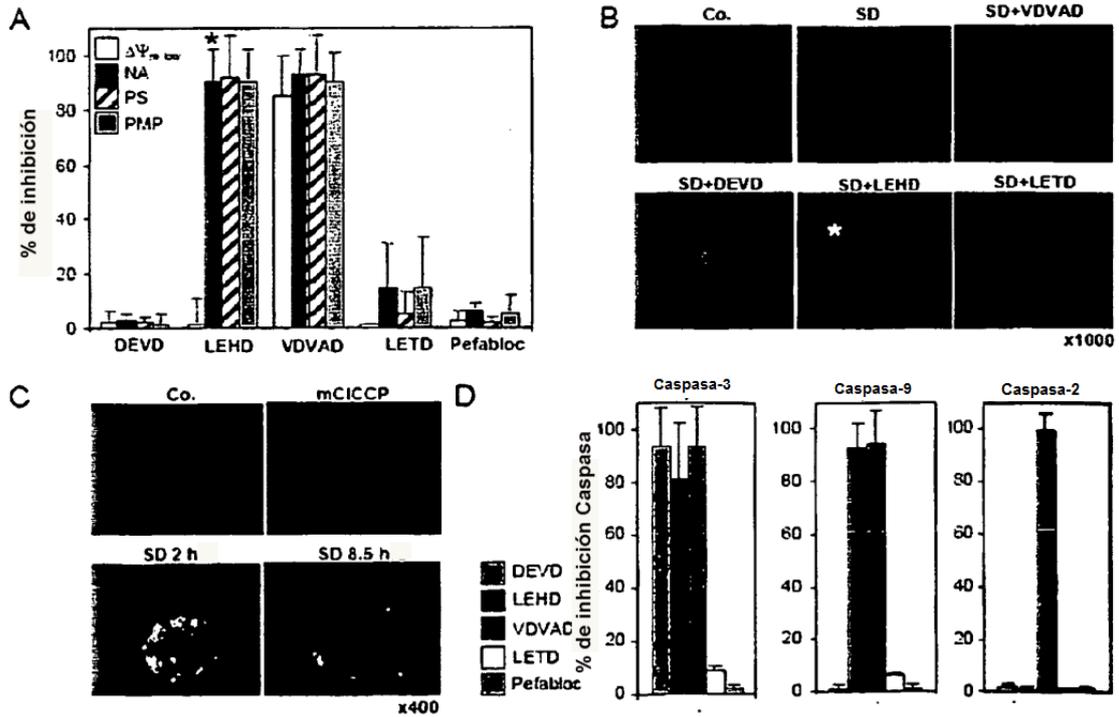


Figura 9

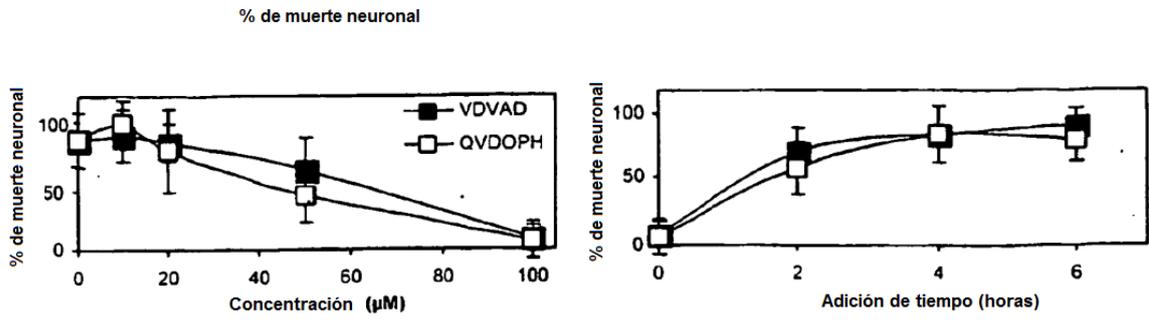


Figura 10

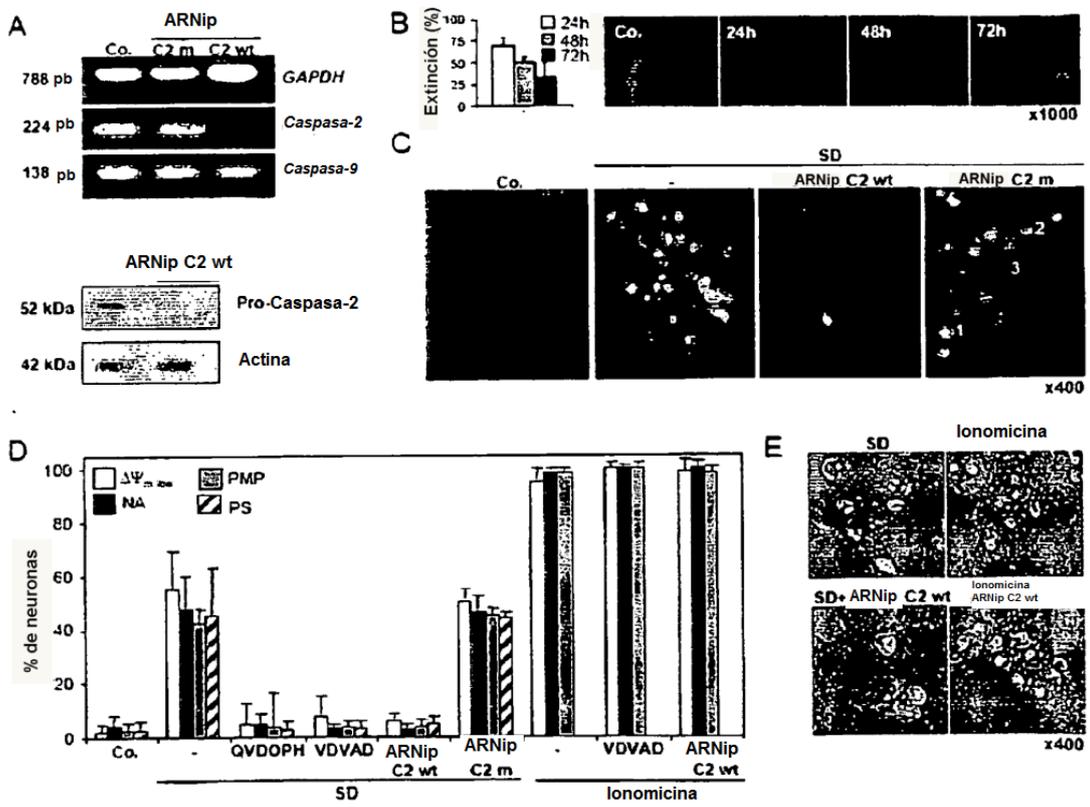


Figura 11

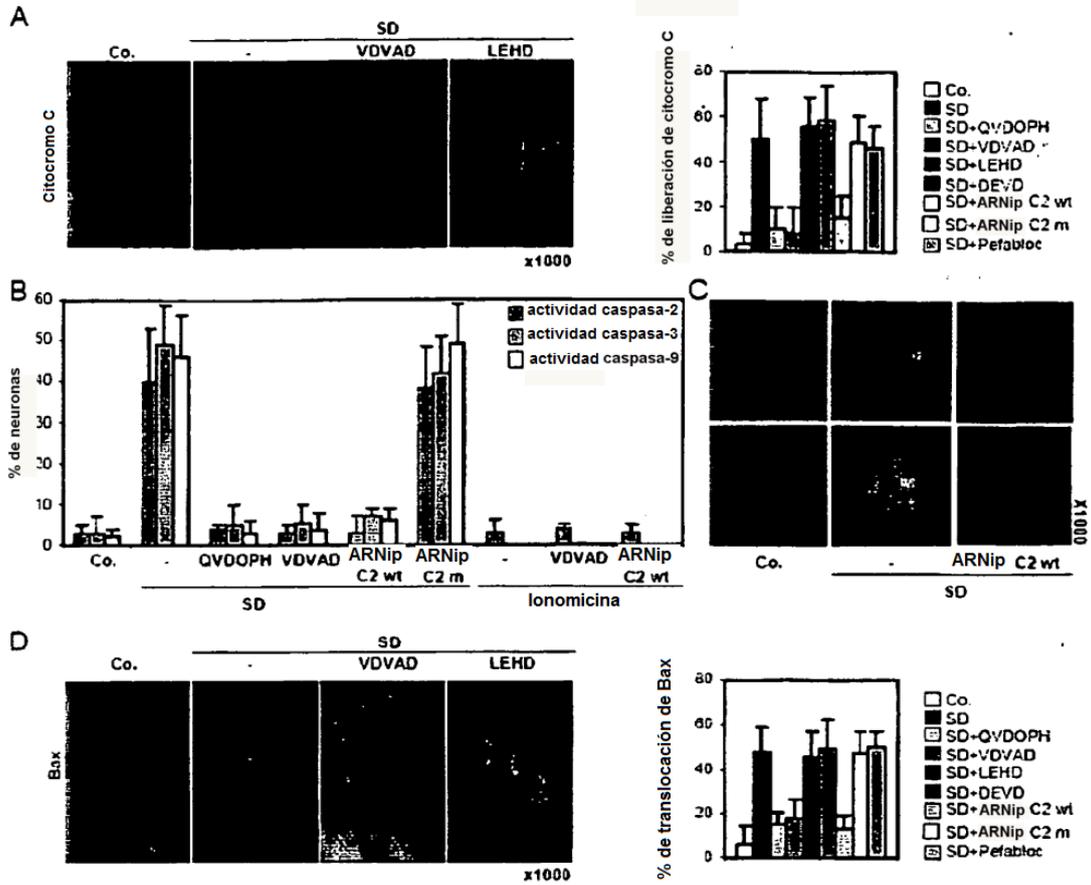


Figura 12

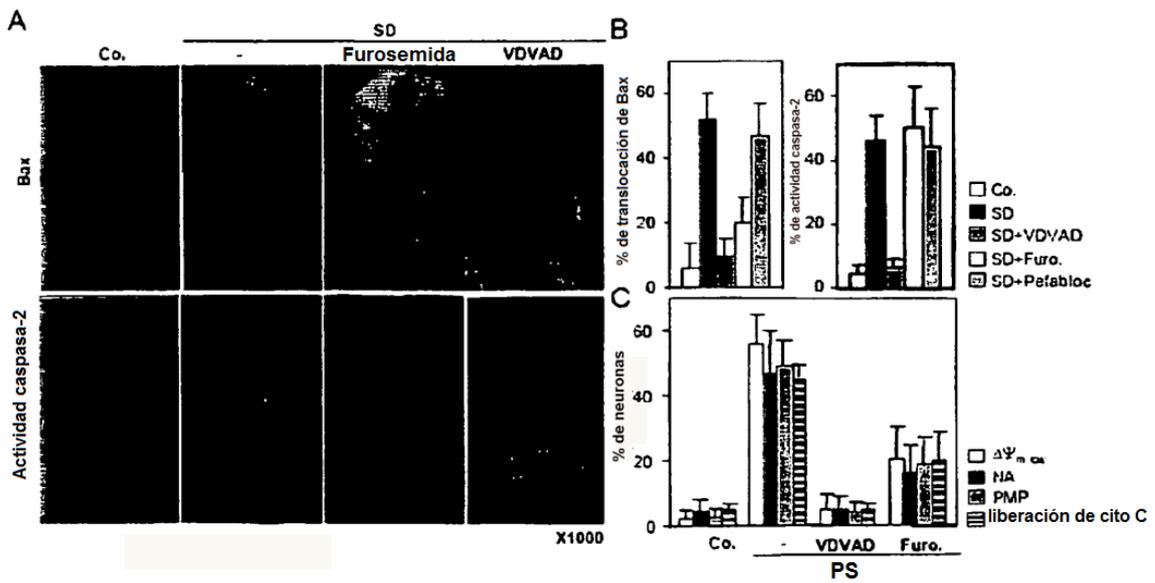


Figura 13

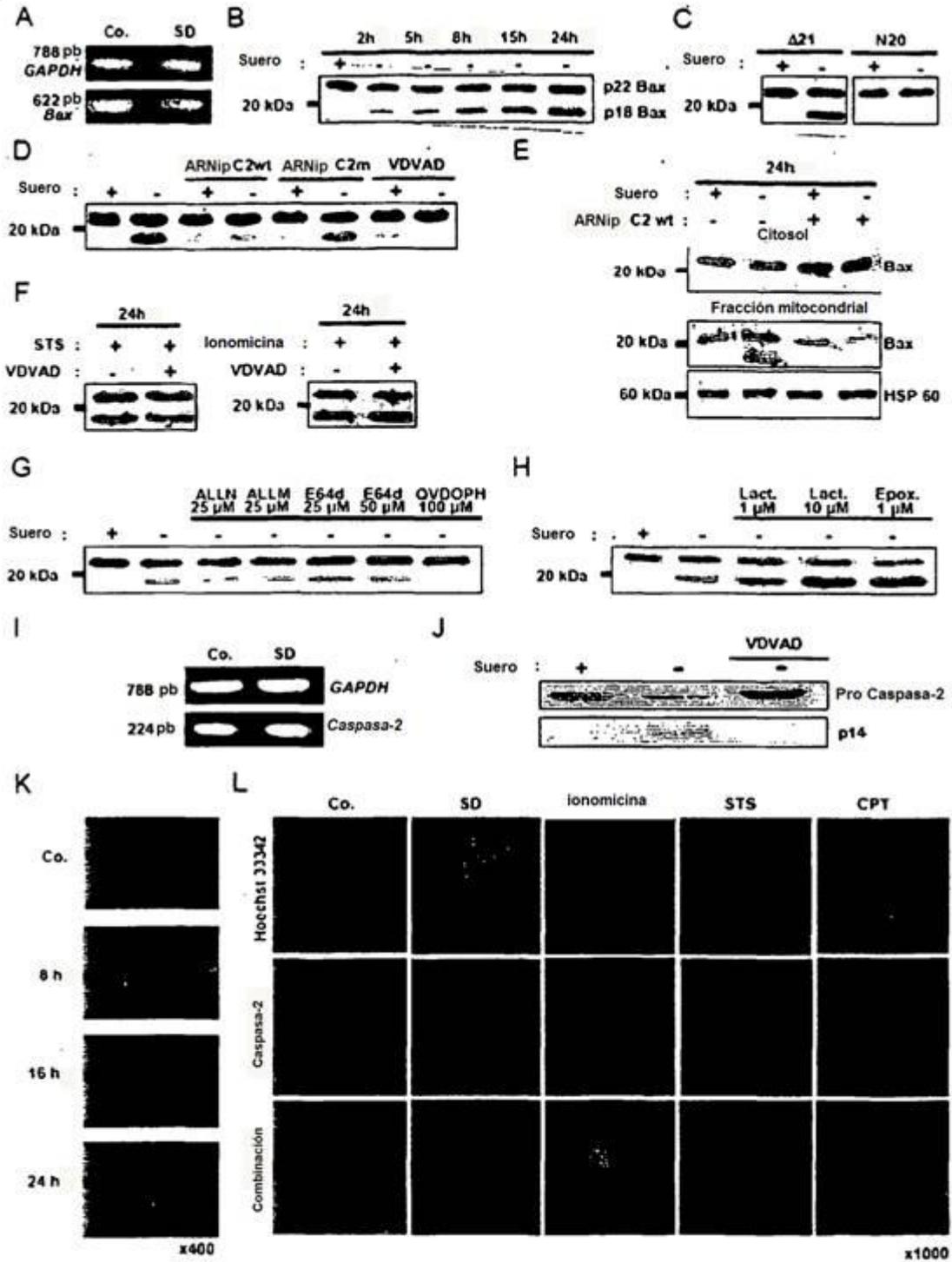


Figura 14

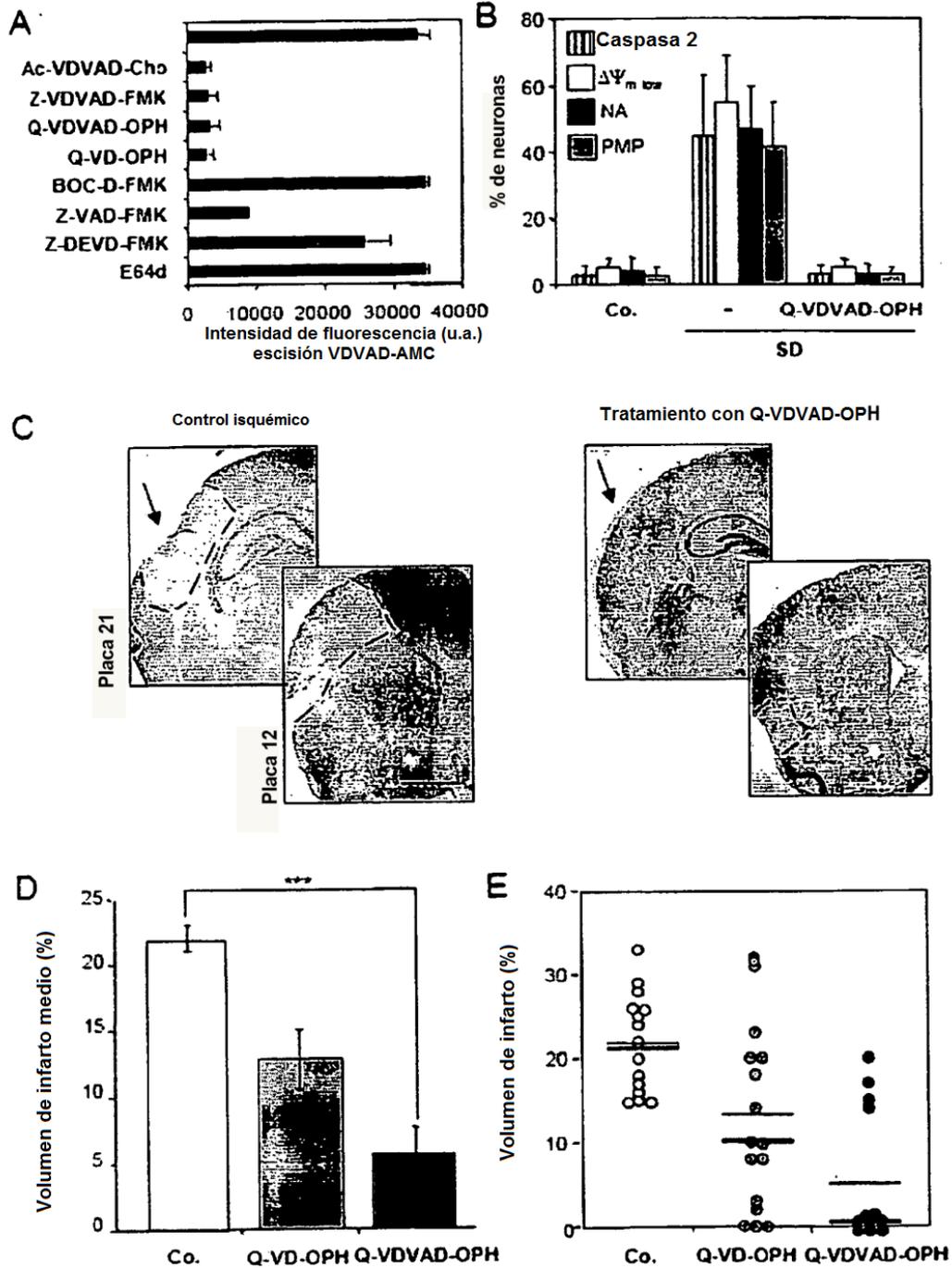


Figura 15

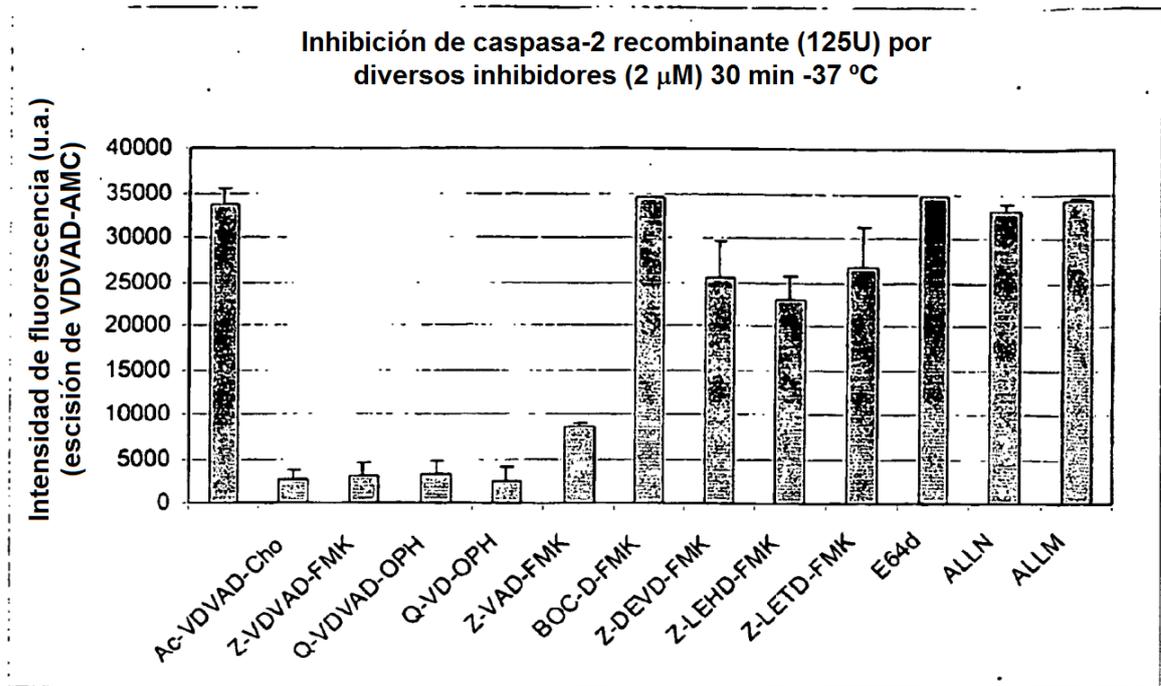


Figura 16

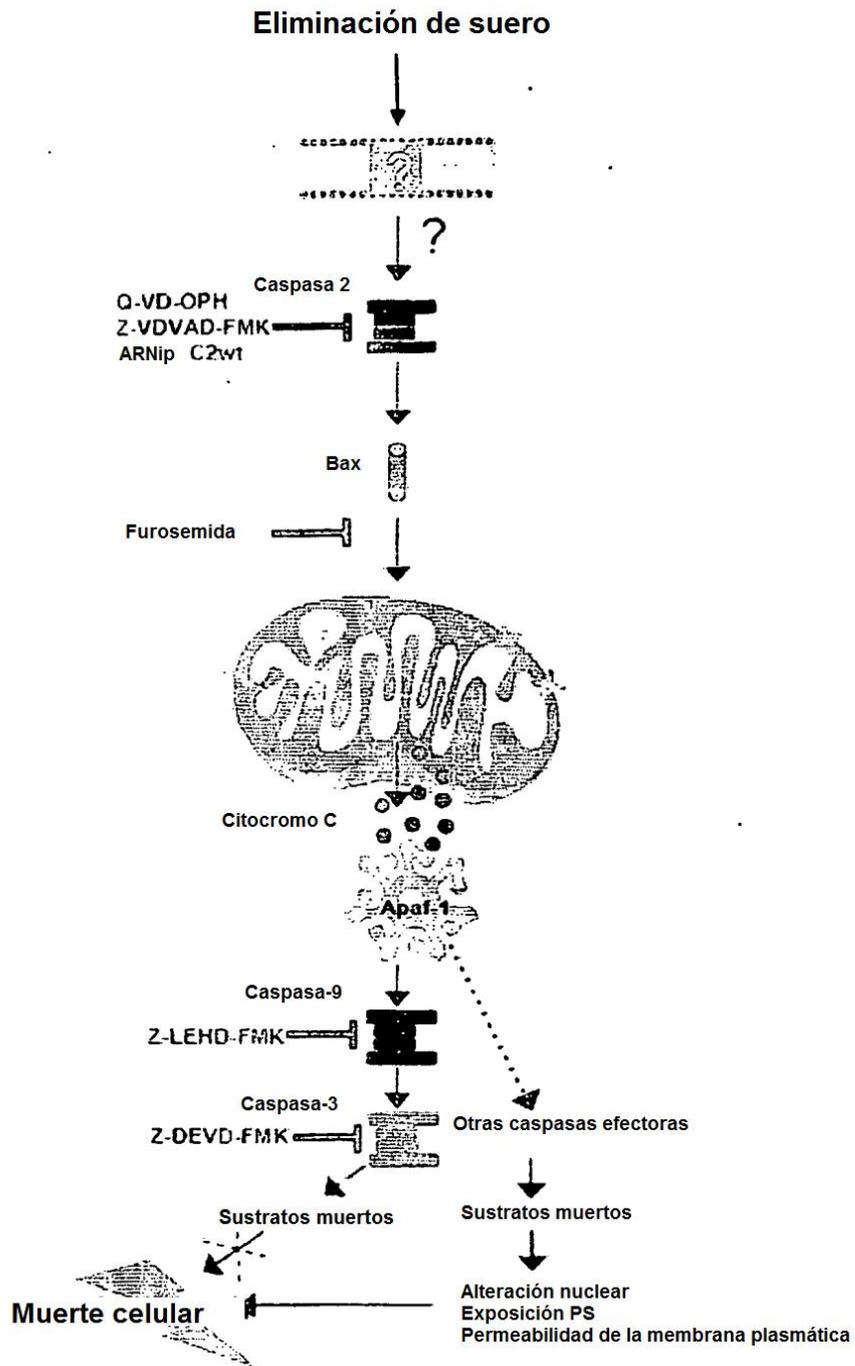


Figura 17

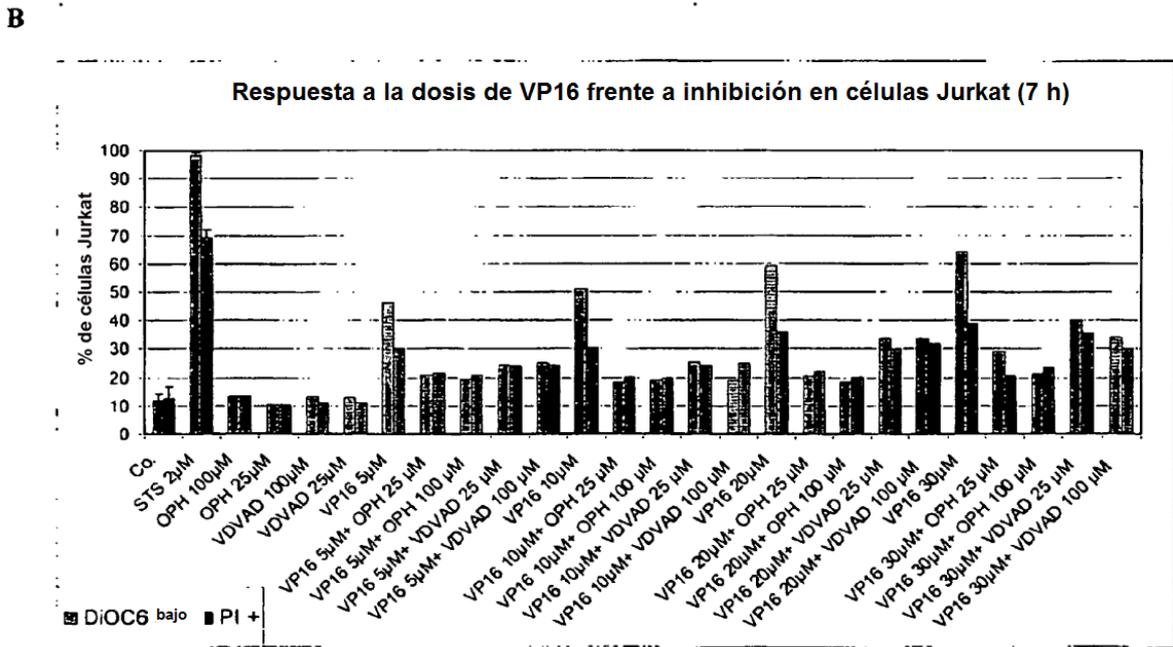
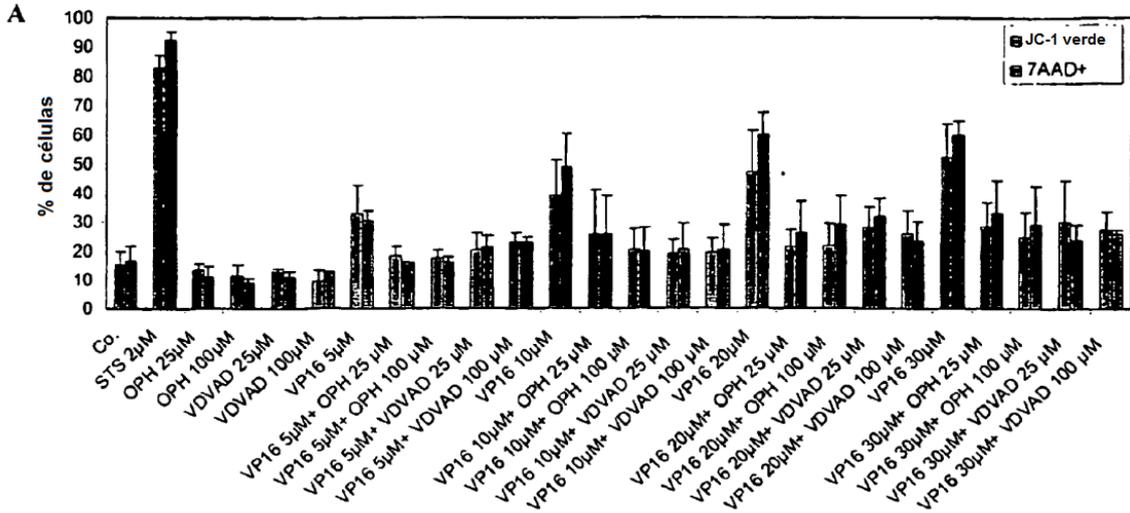
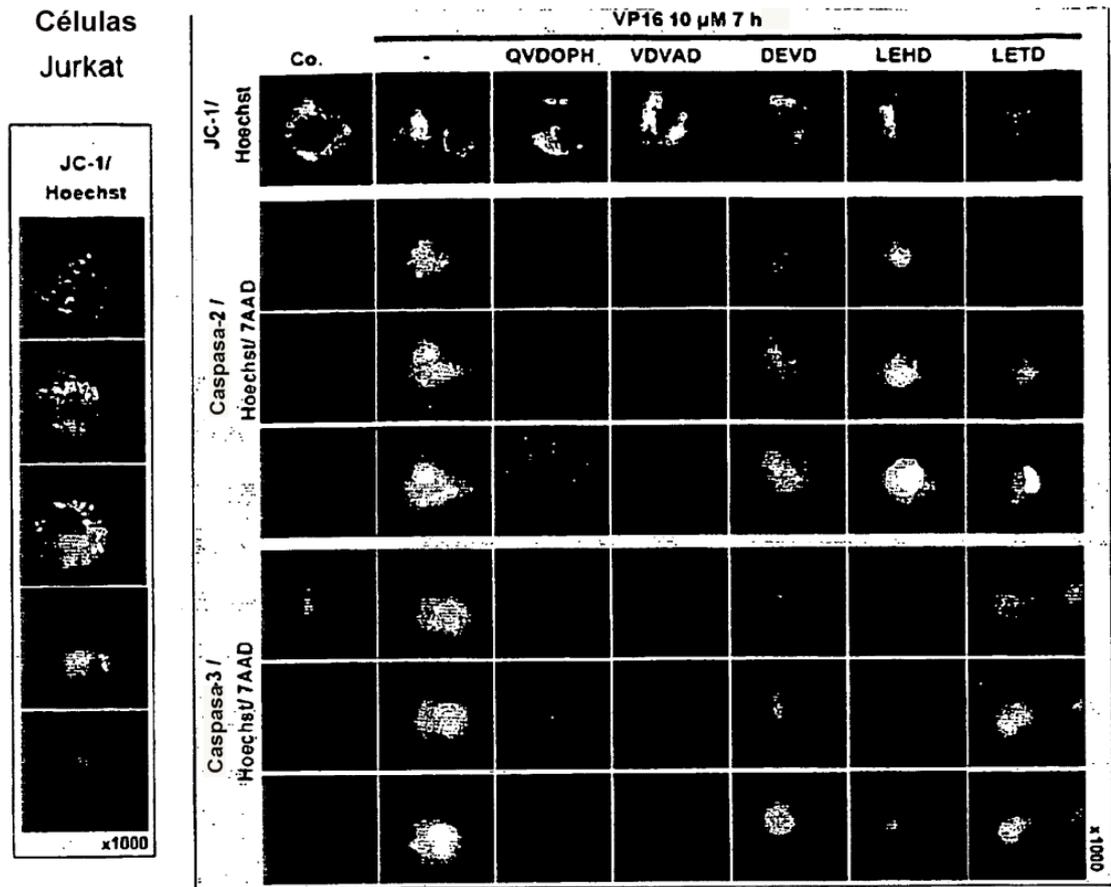


Figura 18

A



B

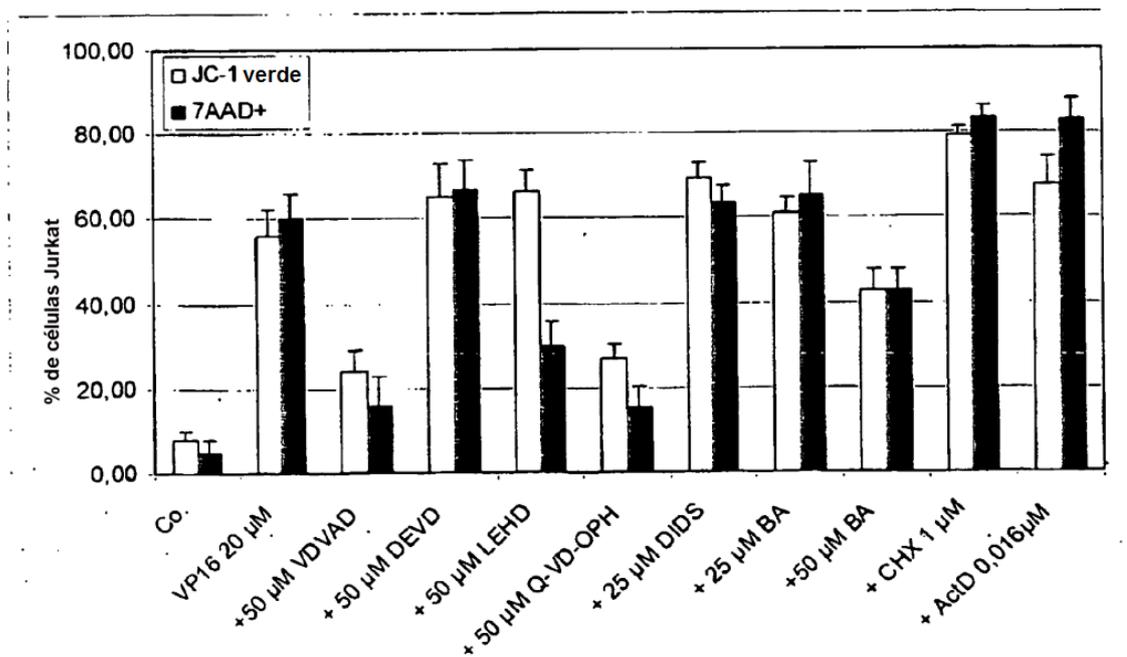


Figura 19

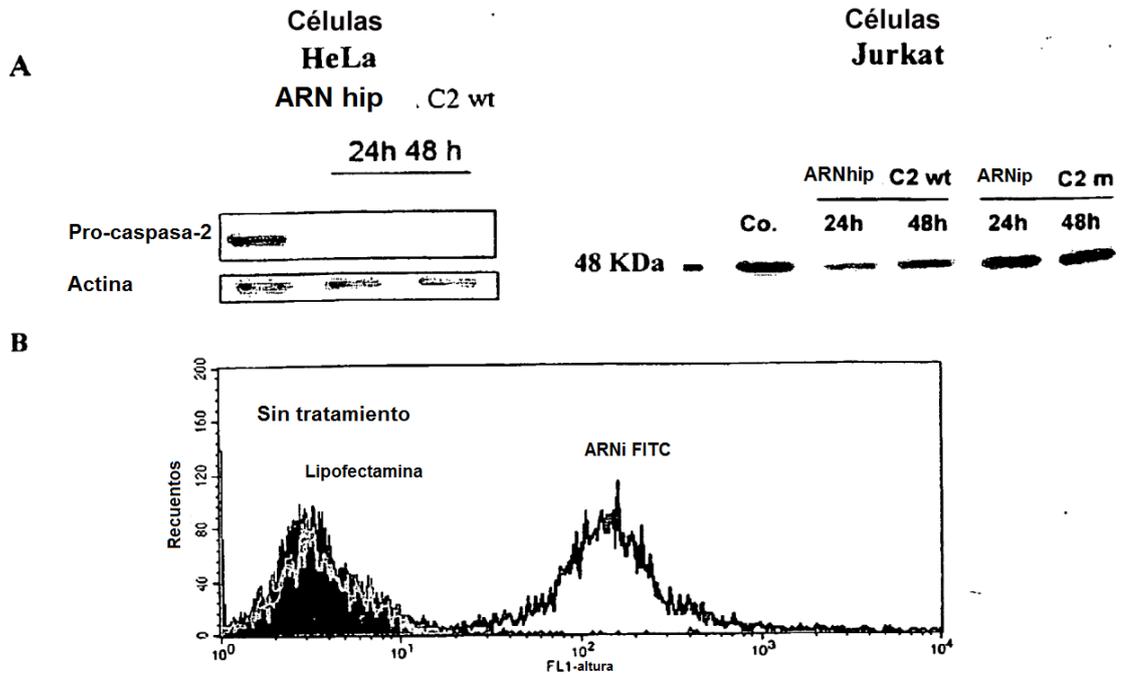
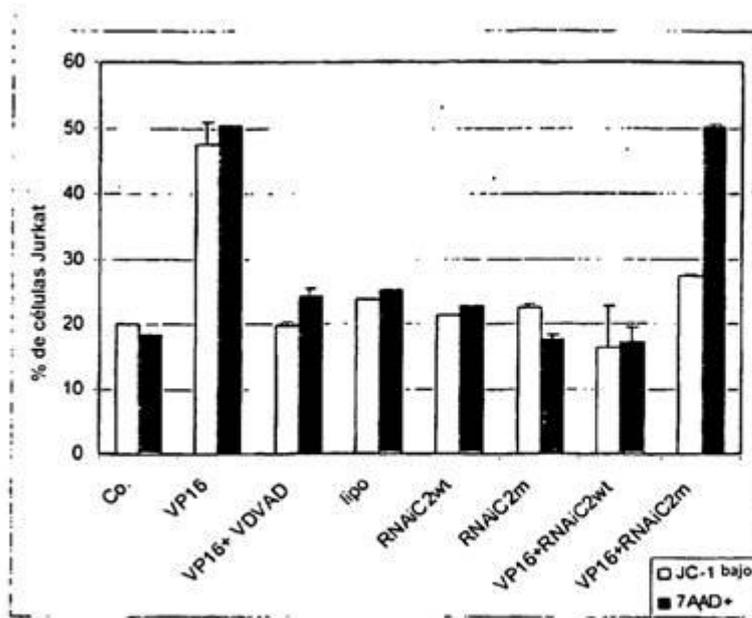
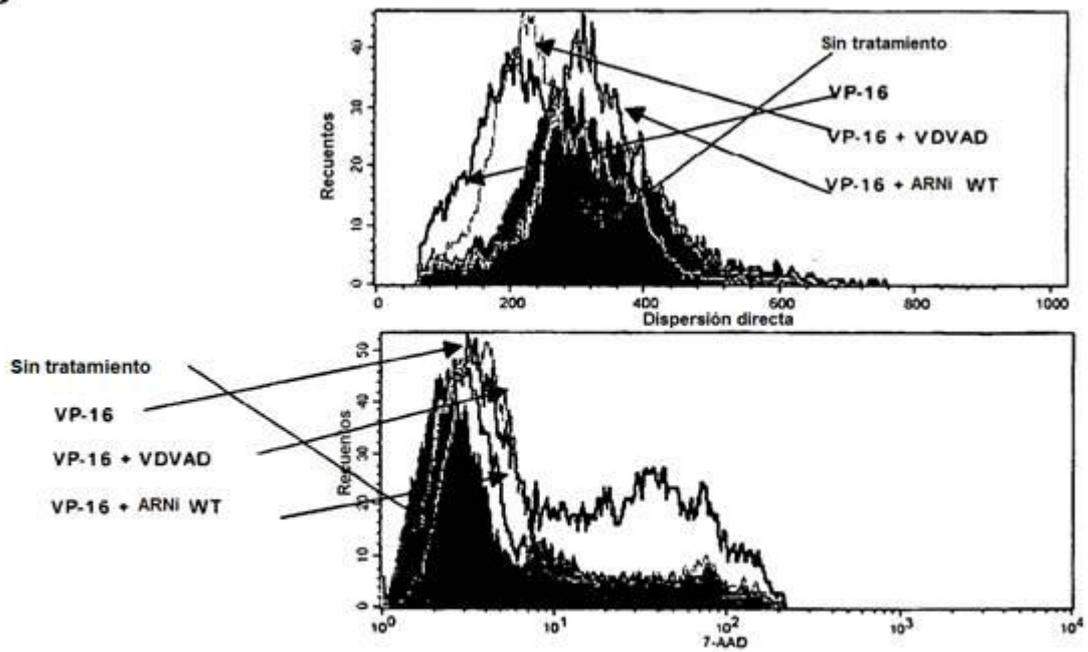


Figura 20

**A**



**B**



**Figura 21**

**A**

Oligonucleótido directo (SEC ID N°: 8)

5'-GATCCCGcacctcctagagaaggacaGAAGCTTGtgccttctctaggaggTGTGTTT-3'

Oligonucleótido inverso (SEC ID N°: 8)

5'-CTAGAAAAAcacctcctagagaaggacaCAAGCTTCtgccttctctaggaggCGG-3'

**B**

Estructura del inserto de ARNhp hibridado

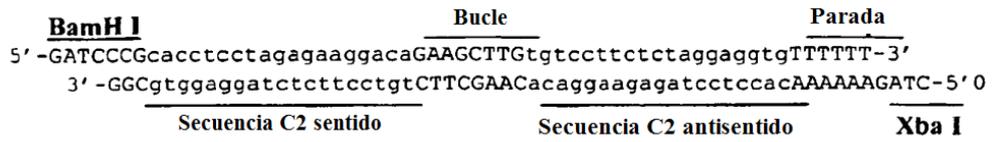


Figura 22

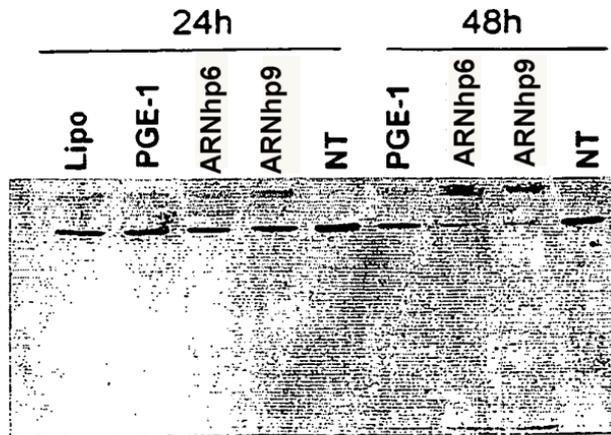


Figura 23

**A**

Oligonucleótido directo (SEC ID N°: 10)

5'-GATCCCGcatcttctggagaaggacaGAAGCTTGtgccttctccagaagatgTTTTTT-3'

Oligonucleótido inverso (SEC ID N°: 11)

5'-CTAGAAAAAcatcttctggagaaggacaCAAGCTTCtgccttctccagaagatgCGG-3'

**B**

Estructura del inserto de ARNhp hibridado

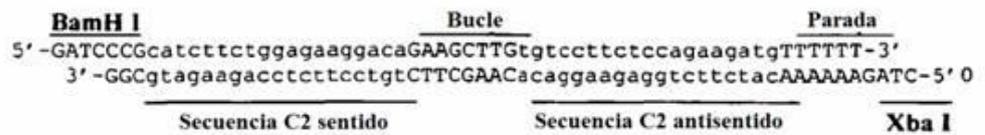


Figura 24