

**NEUROPROTECCIÓN CONFERIDA POR AGONISTAS PPARs E IGF-1 Y SU  
IMPACTO EN VÍAS DE SUPERVIVENCIA EN DOS MODELOS IN VITRO DE LA  
ENFERMEDAD DE KRABBE**

**DAVID ERNESTO MARTÍNEZ GALARZA, BSc**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
FACULTAD DE MEDICINA  
MAESTRÍA EN NEUROCIENCIAS  
Bogotá D.C.  
2014**

**NEUROPROTECCIÓN CONFERIDA POR AGONISTAS PPARs E IGF-1 Y SU  
IMPACTO EN VÍAS DE SUPERVIVENCIA EN DOS MODELOS IN VITRO DE LA  
ENFERMEDAD DE KRABBE**

**DAVID ERNESTO MARTÍNEZ GALARZA, BSc  
CÓDIGO: 05-599311**

**Tesis de investigación como requisito parcial para optar al título de:  
Magister en Neurociencias**

**DIRIGIDO POR:**  
**GONZALO HUMBERTO ARBOLEDA BUSTOS, MD, MSc, PhD**  
Profesor Asociado  
Departamento de Patología  
Facultad de Medicina  
Universidad Nacional de Colombia

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
FACULTAD DE MEDICINA  
MAESTRÍA EN NEUROCIENCIAS  
Bogotá D.C.  
2014**



## **DEDICATORIA**

A mi tía Ela.

Éste y todos mis buenos propósitos llevan tu nombre.

## AGRADECIMIENTOS

- Al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación. COLCIENCIAS.
- A la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.
- Al Dr. Gonzalo Arboleda Bustos por su contribución en el desarrollo y dirección de mi trabajo de grado, y por su apoyo durante toda mi maestría.
- Al Dr. Ernesto Bongarzone por recibirme en su laboratorio, por su apoyo académico y, especialmente, por sus enseñanzas de vida.
- A los Grupos de Neurociencias y Muerte Celular de la Universidad Nacional, especialmente al Dr. Humberto Arboleda Granados.
- A mi tutora, compañera y amiga Jenny Andrea Jaramillo por transmitirme, fraternalmente, su experiencia en técnicas y métodos de laboratorio.
- A Liliana Rojas por su amistad y por su colaboración en la realización de algunos experimentos.
- A mis compañeros y amigos de laboratorio Andrea Niño, Magda López, Adrián Sandoval, Fernando González, Edwin Bautista, Ángela Polanco, Diana Gallego, Diego Ordóñez, Mauren Ortiz, Jorge Amórtegui, Claudia Corredor, Linda Moreno, Luna Buitrago, Belfran Carbonell, María José Contreras, Jenny Ortega, Adriana Mejía y Luis Carlos Morales. Todos ellos hicieron parte, de una u otra forma, de este trabajo.
- A Samuel Mateo y Valentina por su cariño inmenso, por su hermosa compañía y por convertirse en los mejores maestros de mi día a día.
- A Leonardo, Lara, tías, tíos, primos y el resto de mis familiares y amigos, por su apoyo y cariño incondicional.
- A mi razón de ser, Fanny Galarza Amaya, Jesús Ricardo Martínez Tarquino, Juan Rafael Martínez Galarza y Ana Carolina Amaya.

## RESUMEN

La enfermedad de Krabbe (KD, del inglés Krabbe disease) es un desorden neurodegenerativo fatal, causado por mutaciones en el gen para la enzima lisosomal galactocerebrosidasa (GALC), con la consecuente acumulación de galactosilesfingosina (psicosina), esfingolípido altamente tóxico, que genera muerte severa de oligodendrocitos y otros tipos celulares.

Los Receptores Activados por el Proliferador Peroxisomal (PPARs), son receptores nucleares conformados por al menos tres tipos: PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$  y PPAR $\beta$ , todos ellos expresados en el oligodendrocito donde no es completamente clara su función. Los receptores PPARs regulan la expresión génica a través del reconocimiento y unión a los denominados "Elementos reguladores de Respuesta a PPAR" (PPREs) presentes en la región promotora de los genes diana. Han sido intensamente documentados por cumplir un importante papel en la regulación de la expresión de genes implicados en el metabolismo de lípidos, aumentar la sensibilidad a la insulina, y recientemente estudiados por mitigar la inflamación en patologías neurológicas y asociados a algunos tipos de cáncer entre otros.

Por otro lado, se ha demostrado que la acumulación de psicosina en las neuronas provoca severos daños en los axones, que pueden ser causados por alteraciones en los mecanismos de transporte axonal, y que se presentan incluso antes de la muerte celular y la desmielinización.

Con el presente trabajo, se pretende estudiar los mecanismos moleculares involucrados en el desencadenamiento de la muerte celular mediados por la acumulación de psicosina y los efectos del factor de crecimiento IGF-1 y de los agonistas de PPARs sobre la supervivencia de una línea celular oligodendroglial, en dos modelos distintos de KD. Se estudió la regulación a la baja de la proteína GALC, y su efecto sobre la supervivencia de oligodendrocitos, las vías de supervivencia celular PI3K/AKT y ERK1/2. Adicionalmente, se estudió la distribución y movilización axonal de la psicosina para determinar su relación con la axonopatía y muerte neuronal.

Aunque se ha avanzado en la comprensión de ésta enfermedad, se conoce poco acerca del mecanismo molecular que dispara la activación de las vías de apoptosis y por ende el desarrollo/progresión de la enfermedad sigue siendo poco entendido. Los resultados obtenidos en la presente investigación sugieren que la muerte celular producida por la psicosina puede ser atenuada mediante la activación de las vías de neuroprotección mediadas por IGF-1 y la regulación transcripcional de los PPARs. Conjuntamente, se propone un modelo de acumulación de la psicosina en la mielina y las neuronas.

---

**Palabras clave:** Krabbe, oligodendrocitos, desmielinización, PPARs, IGF-1, neuroprotección, transporte vesicular, axonopatía.

## ABSTRACT

Krabbe disease (KD), also known as globoid cell leukodystrophy, is an autosomal recessive neurodegenerative disease caused by the genetic deficiency of galactocerebrosidase (GALC), a lysosomal enzyme responsible for the degradation of several glycosphingolipids like galactosylsphingosine (psychosine) and galactosylceramide. The resulting accumulation of psychosine generates severe cell death, neurodegeneration and demyelination.

Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$  are members of the nuclear receptor family of ligand-dependent transcription factors that regulate diverse aspects of energy homeostasis, lipid and lipoprotein metabolism, and glucose homeostasis through binding to PPAR-response elements (PPRE), which are located in the promoter region of target genes. All of them are expressed in oligodendrocytes but their function is not fully understood. PPARs have also emerged as key regulators of inflammatory and immune responses, opening a new area for the development of therapeutic drugs useful in the treatment of some types of cancer and chronic inflammatory diseases such as atherosclerosis, obesity-induced insulin resistance, and neurodegenerative diseases.

In addition, it has been shown that the accumulation of psychosine in neurons causes severe damage to axons, which can be caused by alterations in axonal transport mechanisms, and this axonopathy is generated even before cell death and demyelination.

This work aims to study the molecular mechanisms involved in triggering cell death mediated by the accumulation of psychosine in two *in vitro* models of KD. I studied the downregulation of GALC protein and its effect on survival of oligodendrocytes and the survival pathways PI3K/AKT and ERK1/2. I also evaluated pharmacological alternatives such as PPAR agonists and IGF-1. Finally, I analyzed the distribution and axonal mobilization of psychosine to determine their relationship with axonopathy and neuronal death.

Although some progress has been made in the understanding of this disease, little is known about the molecular mechanism that generates the activation of apoptotic pathways and thus the development / progression of the disease remains poorly understood. The results obtained in this investigation suggests that cell death triggered by psychosine accumulation can be attenuated by activation of neuroprotective pathways associated with IGF-1 and transcriptional regulation of PPARs. Further, a model of accumulation of psychosine in myelin and neurons is proposed.

---

**Key words:** Krabbe, oligodendrocytes, demyelination, PPARs, IGF-1, neuroprotection, vesicular transport, axonopathy.

## CONTENIDO

<b>1. JUSTIFICACIÓN</b> .....	1
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	2
<b>3. MARCO TEÓRICO/ ESTADO DEL ARTE</b> .....	3
3.1. LA ENFERMEDAD DE KRABBE.....	3
3.2. PATOFISIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE KRABBE.....	3
3.3. METABOLISMO DE GALACTOCEREBROSIDOS/GALACTOSILESFINGOSINA ...	6
3.4. RECEPTORES ACTIVADOS POR EL PROLIFERADOR PEROXISOMAL (PPARs).	7
3.5. LA VÍA PI3K/AKT Y SUPERVIVENCIA NEURONAL. ....	10
3.6. IGF-1 Y SU PAPEL EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL. ....	15
3.7. INTERACCIÓN ENTRE IGF-1 Y PPARs.....	17
3.8. LÍNEA CELULAR MO3.13 .....	18
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	19
4.1. OBJETIVO GENERAL .....	19
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	19
<b>5. METODOLOGÍA</b> .....	20
5.1. OBJETIVO ESPECIFICO 1. ....	20
5.1.1. Cultivo y diferenciación de la línea celular MO3.13 .....	20
5.1.2. Obtención de los modelos in vitro de Krabbe .....	20
5.2. OBJETIVO ESPECIFICO 2. ....	21
5.2.1. Evaluación del efecto de rosiglitazona, WY14643 y GW0742 sobre la viabilidad de células MO3.13 .....	21
5.2.2. Evaluación del efecto de rosiglitazona, WY14643 y GW0742 sobre los modelos de Krabbe.....	21
5.3. OBJETIVO ESPECÍFICO 3 .....	22
5.3.1. Activación de vías de señalización.....	22
5.4. OBJETIVO ESPECÍFICO 4 .....	22
5.4.2. Western Blot .....	22
5.4.3. Ensayo de colesterol.....	23
5.4.4. Microscopía electrónica de transmisión .....	23
5.4.5. Extracción de psicosisina .....	23
5.4.6. Espectrometría de masas .....	23



5.5.	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	23
5.6.	CONSIDERACIONES ÉTICAS E IMPACTO AMBIENTAL.....	23
5.6.	PROPIEDAD INTELECTUAL.....	24
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>25</b>
6.1.	ESTANDARIZACIÓN DE LA MUERTE DE CÉLULAS MO3.13 EN LOS DOS MODELOS DE KD. ....	25
6.1.1.	<i>Muerte celular en el modelo exógeno</i> .....	25
6.1.2.	<i>Muerte celular en el modelo endógeno</i> .....	29
6.2.	EFFECTO DE LOS AGONISTAS DE PPARs E IGF SOBRE LA SUPERVIVENCIA CELULAR. ....	31
6.2.1.	<i>Efecto de agonistas de PPARs sobre la supervivencia de células MO3.13 en el modelo exógeno de enfermedad de Krabbe.</i> .....	32
6.2.2.	<i>Efecto del factor de crecimiento IGF-1 sobre la supervivencia de células MO3.13 en el modelo exógeno de enfermedad de Krabbe.</i> .....	36
6.2.3.	<i>Efecto de la rosiglitazona y el factor de crecimiento IGF-1 sobre la supervivencia de células MO3.13 en el modelo endógeno de enfermedad de Krabbe.</i> .....	38
6.3.	EFFECTO DE LOS AGONISTAS DE PPARs E IGF SOBRE LAS VÍAS DE SUPERVIVENCIA CELULAR PI3K/Akt Y Raf/MEK/ERK. ....	40
6.3.1.	<i>Acción de la rosiglitazona e IGF-1 sobre las vías de supervivencia celular PI3K/Akt y RAF/MEK/ERK en el modelo exógeno de KD.</i> .....	40
6.3.2.	<i>Efecto de rosiglitazona sobre la activación del receptor de IGF-1 en células MO3.13.</i> 44	
6.3.3.	<i>Acción de WY14643 sobre las vías de supervivencia celular PI3K/Akt en el modelo exógeno de KD.</i> .....	45
6.3.4.	<i>Acción de GW0742 sobre las vías de supervivencia celular PI3K/Akt en el modelo exógeno de KD.</i> .....	46
6.3.5.	<i>Acción de la rosiglitazona e IGF-1 sobre las vías de supervivencia celular PI3K/Akt y RAF/MEK/ERK en el modelo endógeno de KD.</i> .....	47
6.4.	DISTRIBUCIÓN Y MOVILIZACIÓN VESICULAR DE LA PSICOSINA EN EL SISTEMA NERVIOSO .....	51
6.4.1.	<i>Fraccionamiento subcelular del tejido cerebral de ratones Twitcher y WT</i> .....	52
6.4.2.	<i>Patrón de acumulación de la psicosisina en el sistema nervioso de ratones Twitcher y WT</i> .....	55
6.4.3.	<i>Patrón de acumulación de la psicosisina en el sistema nervioso de ratones Twitcher y WT</i> .....	56

6.4.4. Niveles de fosforilación de los motores moleculares del transporte axonal en ratones <i>Twitche</i> r y <i>WT</i> . .....	57
<b>7. DISCUSIÓN</b> .....	59
7.1. ESTANDARIZACIÓN DE LA MUERTE DE CÉLULAS MO3.13 EN LOS DOS MODELOS DE KD. ....	59
7.1.1. Muerte celular en el modelo exógeno .....	59
7.1.2. Muerte celular en el modelo endógeno .....	61
7.2. EFECTO DE LOS AGONISTAS DE PPARs E IGF SOBRE LA SUPERVIVENCIA CELULAR. ....	62
7.2.1. Efecto de agonistas de PPARs sobre la supervivencia de células MO3.13. ....	62
7.2.2. Efecto del factor de crecimiento IGF-1 sobre la supervivencia de células MO3.13. ....	65
7.3. EFECTO DE LOS AGONISTAS DE PPARs E IGF SOBRE LAS VÍAS DE SUPERVIVENCIA CELULAR PI3K/Akt Y Raf/MEK/ERK. ....	67
7.3.1. Acción de la rosiglitazona e IGF-1 sobre las vías de supervivencia celular PI3K/Akt y RAF/MEK/ERK.....	67
7.3.2. Acción de WY14643 sobre las vías de supervivencia celular PI3K/Akt.....	70
7.3.3. Acción de GW0742 sobre las vías de supervivencia celular PI3K/Akt. ....	71
7.4. DISTRIBUCIÓN Y MOVILIZACIÓN VESICULAR DE LA PSICOSINA EN EL SISTEMA NERVIOSO .....	71
7.4.1. Fraccionamiento subcelular del tejido cerebral de ratones <i>Twitche</i> r y <i>WT</i> .....	72
7.4.2. Patrón de acumulación de la psicosis en el sistema nervioso de ratones <i>Twitche</i> r y <i>WT</i> .....	73
7.4.3. Patrón de acumulación del colesterol en el sistema nervioso de ratones <i>Twitche</i> r y <i>WT</i> .....	74
7.4.4. Niveles de fosforilación de los motores moleculares del transporte axonal en ratones <i>Twitche</i> r y <i>WT</i> . ....	75
7.4.5. Modelo de transporte y acumulación de la psicosis en el sistema nervioso y su asociación con PPARs, IGF-1 y vías de supervivencia y proliferación.....	76
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	79
<b>ANEXO 1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	94

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Vías metabólicas referentes a la galactosilceramida y compuestos relacionados....	7
<b>Figura 2.</b> Representación esquemática de los dominios funcionales de los PPARs.....	8
<b>Figura 3.</b> Vías de supervivencia PI3K/Akt y MAPK.....	15
<b>Figura 4.</b> Receptores, ligandos y vías de señalización del sistema IGF-1 .....	16
<b>Figura 5.</b> Características morfológicas de las células MO3.13.....	26
<b>Figura 6.</b> Ensayo de WST que muestra el efecto en de la psicossina sobre la muerte de las células MO3.13.....	27
<b>Figura 7.</b> Ensayo de LDH que muestra el efecto tiempo dependiente de la psicossina 10 $\mu$ M sobre la muerte de las células MO3.13.....	28
<b>Figura 8.</b> Silenciamiento de GALC.....	29
<b>Figura 9.</b> Efecto del silenciamiento de GALC sobre la muerte celular (LDH).....	30
<b>Figura 10.</b> Efecto del silenciamiento de GALC sobre la muerte celular (MTT).....	31
<b>Figura 11.</b> Ensayos de LDH que muestran la neuroprotección conferida por rosiglitazona en el modelo exógeno de KD.....	33
<b>Figura 12.</b> Efecto de GW0742 sobre la supervivencia de células MO3.13 en el modelo exógeno de KD.....	34
<b>Figura 13.</b> Efecto de WY14643 sobre la supervivencia de células MO3.13 en el modelo exógeno de KD.....	35
<b>Figura 14.</b> Neuroprotección conferida por agonistas PPARs e IGF-1 en el modelo exógeno de KD.....	37
<b>Figura 15.</b> Efecto de rosiglitazona e IGF-1 sobre la supervivencia celular en el modelo endógeno de KD.....	39
<b>Figura 16.</b> Efecto de rosiglitazona (A) e IGF-1 (B) sobre los niveles de fosforilación de Akt (Ser 473) en células MO3.13.....	42
<b>Figura 17.</b> Efecto de rosiglitazona sobre los niveles de fosforilación de ERK1/2.....	43
<b>Figura 18.</b> Efecto de la rosiglitazona sobre la activación del receptor IGF-1 en células MO3.13.....	45

<b>Figura 19.</b> Efecto de WY14643 (A) sobre los niveles de fosforilación de Akt (Ser 473) en células MO3.13.....	46
<b>Figura 20.</b> Efecto de GW0742 (A) sobre los niveles de fosforilación de Akt (Ser 473) en células MO3.13.....	47
<b>Figura 21.</b> Efecto de rosiglitazona e IGF-1 sobre los niveles de fosforilación de Akt (Ser 473) en células MO3.13 silenciadas para GALC.....	49
<b>Figura 22.</b> Efecto de rosiglitazona (1 $\mu$ M) (A) e IGF-1 (100 nM ) (B) sobre los niveles de fosforilación de ERK1/2 en células MO3.13 silenciadas para GALC.....	50
<b>Figura 23.</b> Esquema que representa el procedimiento de fraccionamiento celular de tejido cerebral en ratones Twitcher y WT.....	53
<b>Figura 24.</b> Control de calidad de las fracciones vesiculares del tejido cerebral de ratones Twitcher y WT.....	54
<b>Figura 25.</b> Caracterización molecular de las fracciones subcelulares del tejido cerebral de ratones Twitcher y WT.....	55
<b>Figura 26.</b> Evidencia de la acumulación diferencial de la psicossina en nervios periféricos de ratones Twitcher y WT.....	56
<b>Figura 27.</b> Acumulación progresiva del colesterol en el plasmalema de ratones Twitcher y WT.....	57
<b>Figura 28.</b> La acumulación de la psicossina en el plasmalema y en vesículas se asocia motores moleculares.....	58
<b>Figura 29.</b> Modelo propuesto para el transporte y distribución de la psicossina en el sistema nervioso.....	91

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Agonistas de PPARs y sus potenciales efectos como mediadores de enfermedades.....	11
---	----

## 1. JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de Krabbe, también conocida como leucodistrofia de células globoides, es un desorden degenerativo de herencia autosómica recesiva, causado por una deficiencia de la enzima lisosomal galactocerebrosidasa (galactosilceramidasa - GALC) (1). Los defectos en GALC que resultan en la reducción de la actividad enzimática conllevan a la acumulación del metabolito citotóxico psicósina, lo que resulta en una desmielinización severa causada por la muerte de las células que forman la mielina (2, 3). La enfermedad de Krabbe infantil temprana se presenta con una aparición súbita de irritabilidad, respuesta de sobresalto a estímulos y detención del desarrollo entre el tercer y el sexto mes de edad (4). En el transcurso de varios meses, los niños afectados desarrollan hipertonicidad, ataques y ceguera, y la mayoría no sobrevive más allá de los dos años de edad (5). Esta enfermedad puede presentar formas raras y atenuadas que incluyen: la infantil tardía, juvenil y adulta, cuya severidad y progresión cambian ampliamente. La prevalencia de la enfermedad es de aproximadamente 1:100000 nacimientos, aunque hay una gran variación entre países. Dos comunidades genéticamente homogéneas tienen una extremadamente alta prevalencia de 1 en 100-150 nacimientos vivos (6).

Hasta la fecha la enfermedad de Krabbe no tiene cura y, aunque el trasplante de células madre hematopoyéticas ha mostrado tener algunos efectos benéficos en recién nacidos, solo consigue retardar la muerte de los pacientes en algunos meses (7). La falta de efectividad observada en los tratamientos para esta enfermedad se debe en parte al gran vacío que hay en el conocimiento de los mecanismos moleculares que subyacen a la acumulación de la psicósina, que conllevan a la muerte de los oligodendrocitos y a una rápida e irreversible desmielinización; además, obstáculos naturales internos como la barrera hematoencefálica hacen que dichos tratamientos fallen en alcanzar los blancos celulares críticos a nivel del sistema nervioso central.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Como se mencionó, las estrategias que se han venido utilizando como herramientas neuroprotectoras en enfermedades desmielinizantes, brindan en general sólo una protección temporal lo cual puede ser atribuido al desconocimiento de muchos de los eventos celulares y moleculares asociados a dichos procesos. La comprensión de los procesos de regulación de las vías de muerte y supervivencia celular en procesos desmielinizantes y neurodegenerativos podrá facilitar la creación de fármacos para proteger de daños diversos a los que se ven enfrentadas las neuronas y en particular los oligodendrocitos durante el proceso desmielinizante.

La detección temprana de los procesos neurodegenerativos y los riesgos asociados a ellas están íntimamente relacionados con la identificación de factores neuroprotectores con potencial terapéutico. En tal sentido es de vital importancia aclarar el papel de diversos metabolitos, como la psicossina, que han sido involucrados en la fisiopatología de la enfermedad, un campo nuevo y muy poco explorado, ya que la regulación de vías pro-apoptóticas reguladas por ellos se constituyen en blancos terapéuticos para favorecer la supervivencia celular de poblaciones neuronales más susceptibles.

Con el presente trabajo se busca analizar los mecanismos asociados a la neuroprotección conferida por agonistas de PPARs e IGF-1, frente a la muerte celular derivada de la acumulación celular del metabolito psicossina, evento patológico causante de la enfermedad de Krabbe. Se plantea que la muerte celular de los oligodendrocitos está asociada a la desregulación de vías de señalización como la vía PI3K/Akt y MAPK/ERK, y que dichas alteraciones pueden ser revertidos mediante la utilización de factores de crecimiento como IGF-1 y activadores de PPARs. La culminación de este trabajo refuerza el entendimiento de la biología general de los oligodendrocitos, su susceptibilidad diferencial, y tiene un impacto en el desarrollo de alternativas terapéuticas encaminadas a la protección contra la desmielinización.

### 3. MARCO TEÓRICO/ ESTADO DEL ARTE

#### 3.1. LA ENFERMEDAD DE KRABBE

Las enfermedades desmielinizantes agrupan un grupo heterogéneo de enfermedades del sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP), tanto desde el punto de vista clínico como fisiopatológico (8, 9). Dentro de este amplio grupo se encuentra la Leucodistrofia de Células Globoides (Enfermedad de Krabbe), que es una enfermedad neurológica fatal con herencia autosómica recesiva (1, 9), causada por la mutación del gen *GALC* (1). Hasta el momento se han identificado cerca de 120 mutaciones diferentes causantes de la enfermedad (10), las cuales pueden afectar la expresión, el procesamiento, la localización o la actividad enzimática de la enzima galactosilceramidasa (*GALC*) (11). El término globoide fue definido por Collier y Greenfield para describir la presencia de células fagocíticas multinucleares en la sustancia blanca de estos pacientes, como una marca histopatológica de la enfermedad (1). Las características patológicas de la enfermedad incluyen pérdida axonal, pérdida de mielina, astrogliosis y la presencia de células globoides PAS-positivas. Estas células globoides acumulan galactocerebrosidos, pero con un radio reducido de sulfatido/galactocerebrósido (1). El defecto bioquímico en KD es la acumulación de psicósina en diferentes tipos celulares, incluidos los oligodendrocitos y las neuronas, causada por la deficiencia de la enzima lisosomal encargada de su degradación, *GALC* (1, 12, 13). KD es más frecuentemente observada en la infancia temprana, alrededor de 4 a 5 meses, pero también pacientes han sido reportados con inicio de sintomatología en adultos jóvenes (12, 14). La hipodensidad difusa asociada a desmielinización de la sustancia blanca en la región perioccipital puede ser evidenciada mediante neuroimagenología en pacientes Krabbe (15).

#### 3.2. PATOFISIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE KRABBE

Los cambios histopatológicos más importantes hallados en pacientes KD y en el modelo de ratón de la enfermedad (ratón Twitcher), es la extensa desmielinización, gliosis y presencia de macrófagos únicos o células globoides (10). La deficiencia de galactosilcerebrosidasa causa un exceso y acumulación de psicósina, infiltración de células globoides, pérdida de

mielina y oligodendrocitos. Esto ha conducido a la hipótesis de que la acumulación de psicósina puede ser responsable de la patología observada en el cerebro KD (1).

Existen varios modelos animales naturales bien caracterizados de la KD, incluyendo ratón, perro y primate (10). El modelo de ratón Twitcher de KD tiene una mutación sin sentido (W339X) en el gen GALC en ratones C57Bl (11), que es un modelo funcional, enzimático y morfológico auténtico de KD humano (10;11). El ratón Twitcher desarrolla temblores hacia el día posnatal 20, seguido por deficiencias del crecimiento, pérdida de peso, debilidad y parálisis de patas traseras. En el día posnatal 40, el ratón alcanza un estado terminal y usualmente no sobrevive más allá de 45 días (10). El cerebro del Twitcher presenta células globoides, deficiencia de GALC, acumulación de psicósina y pérdida de oligodendrocitos (10).

Se ha demostrado que la psicósina es altamente tóxica. Aumenta cJun, como vía proapoptótica; disminuye NF-kB, como vía de supervivencia; promueve la liberación de citocromo C (16) y la inducción de la actividad de la fosfolipasa A2 (17), generando agentes inflamatorios; además inhibe enzimas plasmalógenas (18, 19). En células progenitoras de oligodendrocitos, se ha mostrado que la psicósina inhibe la fosforilación de Akt, conduciendo a la muerte en estas células (18, 20). La psicósina también induce la formación de células globoides mediante la inhibición de la citocinesis (21). Recientemente se ha reportado que la psicósina se acumula en la membrana celular, especialmente en las denominadas balsas lipídicas (lipid rafts). La acumulación de psicósina en dichas regiones específicas de la membrana alteran su arquitectura y perturba vías de señalización involucradas en supervivencia y mielinización (22), por ejemplo, se ha demostrado que la presencia elevada y persistente de psicósina en esas balsas lipídicas membranales puede inhibir la endocitosis en células neuronales e impide la translocación a la membrana de PKC, evento crucial en la activación de importantes vías de señalización intracelulares (23). La aplicación de terapias de reemplazo enzimático no son suficientes para restablecer la degradación de la psicósina a niveles normales; posiblemente por una difusión insuficiente de la enzima a regiones del cerebro que no están inmediatamente expuestas al tratamiento (24).

Recientes estudios (17, 20, 25, 26), indican que la psicósina es capaz de inducir apoptosis en células C6 gliales de rata, en neuronas de ratón Twitcher, en líneas celulares de



oligodendrocitos y en una línea progenitora de oligodendrocitos. La inducción de apoptosis por psicossina parece ser mediada por múltiples vías de señalización e involucra la activación de caspasas (16, 26). De modo que la apoptosis parece ser la vía principal mediante la cual la psicossina actúa para inducir la pérdida de oligodendrocitos y la axonopatía en cerebros Twitcher y KD. El descubrimiento de un blanco de psicossina, el receptor asociado a proteínas G (TDAG8) podría dar luces acerca de la función de esfingolípidos en la formación de células multinucleares, re arreglos de filamentos de actina y fagocitosis(27, 28). Sin embargo, se demostró recientemente que éste receptor no es específico para la psicossina, además, otros resultados indican que la muerte de oligodendrocitos inducida por psicossina es independiente de TDAG8 en células MO3.13 (17) y una nueva función como sensor de pH se le ha definido a este receptor en varias líneas celulares (29, 30). Estos reportes sugieren que la psicossina media efectos como la liberación de ácido araquidónico (AA), LPC y generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) independiente de TDAG8 (16).

El incremento en la expresión de citocinas inflamatorias TNF- $\alpha$  e IL-6 (31), junto con la correlación de células TUNEL positivas y ADN fragmentado (células apoptóticas) (16, 18), indica que la producción local de citocinas inflamatorias podrían jugar un papel en la pérdida apoptótica de oligodendrocitos en el cerebro Twitcher. Se ha demostrado que la psicossina potencia la expresión de citocinas pro inflamatorias así como de la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) y por ende la producción de óxido nítrico (NO) (31, 32); dicha respuesta inflamatoria podría estar relacionada con la activación de receptores TLR2, pertenecientes al sistema inmune innato, que estarían siendo activados por la liberación de sus ligandos por parte de los oligodendrocitos apoptóticos (33). Estudios recientes también han demostrado la pérdida de peroxisomas en el cerebro Twitcher (18). Más aún, estudios utilizando tratamientos de psicossina en células gliales C6 muestran disminución en las proteínas peroxisomales (19) y una regulación a la baja de la actividad transcripcional de PPAR $\alpha$  (18), un factor de transcripción involucrado en la expresión de proteínas peroxisomales (34), indicando un papel importante de los peroxisomas en la patobiología de KD.

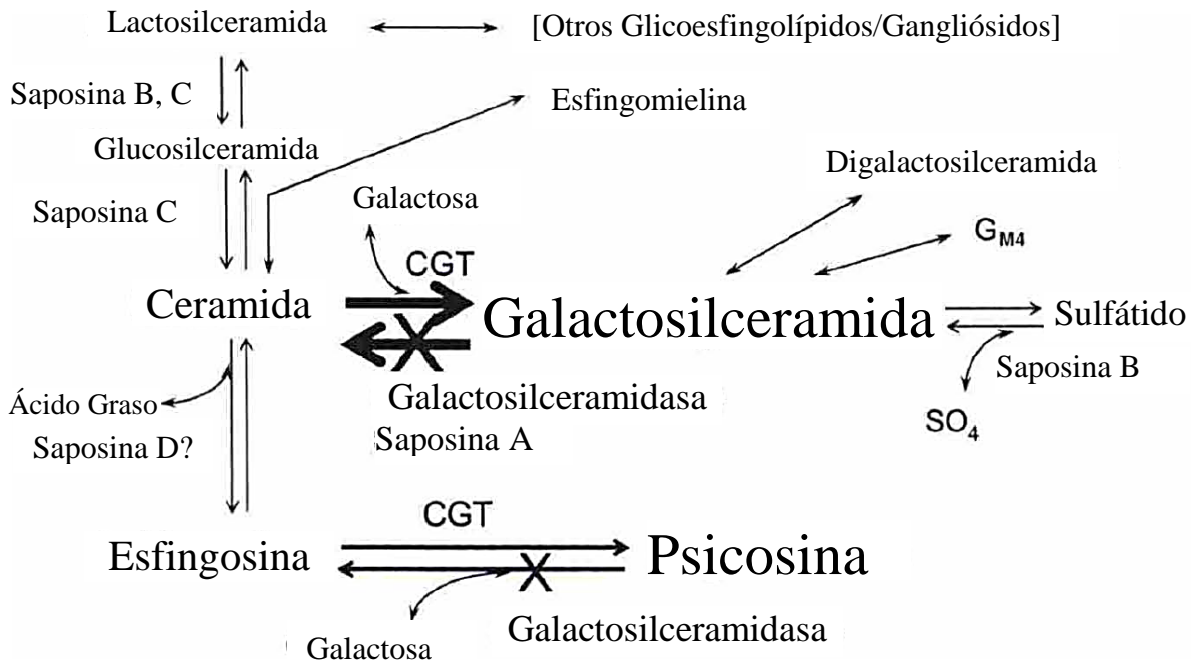
Un nuevo enfoque que se le ha dado a la fisiopatología de KD, es el papel que juega la acumulación de la psicossina sobre la progresión de la enfermedad, no solo sobre los oligodendrocitos, sino también sobre las neuronas, y concretamente sobre los axones, pues

se ha demostrado que previo a la desmielinización y a la muerte de los oligodendrocitos, hay una alteración severa, dependiente de la activación de caspasa 3 de los axones, las cuales presentan hinchamientos y rupturas que conllevan a la muerte neuronal luego de la exposición a la psicosisina, lo que sugiere una progresión de la enfermedad que se origina desde la periferia del sistema nervioso (26, 35). Otro posible efecto de la acumulación de este esfingolípido sobre los axones, es una disminución en su diámetro, ocasionada por una reducción en la abundancia y fosforilación de las tres subunidades de los neurofilamentos, asociadas a un aumento en la actividad de las fosfatasa PP1 y PP2A (36), y se ha propuesto que esto último está coligado a una inhibición del transporte axonal rápido a través de la activación de la quinasa GSK3 $\beta$ , lo que genera una desregulación de los motores moleculares asociados a microtúbulos (37). Todos estos resultados dan fe de cuan complejos son los procesos celulares implicados en la toxicidad de la psicosisina, de la poca información que se tiene respecto a ellos y de la necesidad de identificarlos, entenderlos y, sobre todo, de contrarrestarlos.

### 3.3. METABOLISMO DE GALACTOCEREBROSIDOS/GALACTOSILESFINOSINA

La mielina es rica en galactocerebrosidos y sulfátidos y está presente en bajas cantidades en enfermedades con pérdida de mielina. Los galactocerebrosidos son esfingoglicolípidos que consisten de una cadena larga de ácidos grasos y una base galactosilesfingosina. La psicosisina es sintetizada por la galactosilación de esfingosina por la UDP-galactosa: ceramida galactosiltransferasa (CGT) (38). La psicosisina en el cerebro existe en muy bajas concentraciones, pero incrementa en KD y llega a ser hasta el 50% de los cerebrosidos (1, 22). Los galactocerebrosidos y galactosilesfingosina son degradados en el lisosoma a ceramida más galactosa y esfingosina más galactosa por la enzima GALC (1). Esta enzima puede también hidrolizar monogalactosil-diglicerido y lactosilceramida (Figura 1) (1). La deficiencia en la actividad de GALC en KD resulta en la acumulación de psicosisina, mientras los niveles de galactosilceramida y sulfátidos no se ven afectados. El incremento en galactocerebrosidos se confina solo a las células globoides. Adicional a galactosilcerebrosidasa (GALC), GM1 gangliosidasa (beta-galactosidasa), también degrada galactocerebrosidos pero no puede degradar psicosisina (1). Por esto, en los tejidos KD, la incapacidad de la beta-galactosidasa para hidrolizar psicosisina resulta en su acumulación (1).

El gen *GALC* está localizado en el cromosoma 14 en humanos (39, 40) y en el cromosoma 12 en ratones (40). El gen para la enzima humana es de 60 kDa en longitud y contiene 17 exones (39). Diferentes tipos de mutaciones han sido identificadas en este gen en pacientes con KD, y lo más común es encontrar deleciones en regiones diferentes al dominio catalítico de la enzima(5).



**Figura 1.** Vías metabólicas referentes a la galactosilceramida y compuestos relacionados. Adaptado de Suzuki 2003 (1).

### 3.4. RECEPTORES ACTIVADOS POR EL PROLIFERADOR PEROXISOMAL (PPARs).

Los receptores nucleares constituyen una familia de proteínas con 48 miembros conocidos que actúan como factores de transcripción, regulando la expresión de diferentes genes a través de la formación de heterodímeros funcionales activados por unión del ligando. Todos los miembros de esta familia presentan características estructurales comunes: un dominio de unión de ligando localizado en la mitad C-terminal, un dominio de unión a DNA altamente conservado en la región central, y un dominio de activación de la transcripción hacia el extremo N-terminal de la molécula (Figura 2) (41).



**Figura 2.** Representación esquemática de los dominios funcionales de los PPARs. El dominio A/B es responsable de la fosforilación, la unión al DNA se da a través del dominio C (o DBD, por sus siglas en inglés), el dominio D (Co-FBD) es responsable de la unión a cofactores y el dominio E/F (LBD) es el encargado de la unión al ligando. Tomado de Monsalve *et al.*, 2013 (42).

Una subfamilia de receptores nucleares es la de los Receptores Activados por el Proliferador Peroxisomal (PPARs), que contiene al menos tres miembros: PPAR $\alpha$  expresado mayoritariamente en tejidos con tasas metabólicas altas de ácidos grasos como son hígado, musculo, riñones, intestino grueso, tejido adiposo y corazón; PPAR $\gamma$  expresado mayoritariamente en el tejido adiposo, tejido linfoide, colon, hígado, corazón, y en el cerebro en microglia, astrocitos, oligodendrocitos y neuronas. PPAR $\beta$ , también conocido como PPAR- $\delta$  de amplia distribución. Los receptores PPARs regulan la expresión génica a través del reconocimiento y unión a los denominados “Elementos reguladores de Respuesta a PPAR (PPREs) presentes en la región promotora de los genes diana. Los receptores PPAR cumplen un importante papel en la regulación de la expresión de genes implicados en el metabolismo de lípidos: PPAR $\alpha$  regula genes implicados en el metabolismo del colesterol, mientras que PPAR $\gamma$  hace lo propio en el metabolismo de los ácidos grasos (35). Además, se han demostrado su función como reguladores del metabolismo de la glucosa, y su importante papel en la respuesta a procesos inflamatorios (42).

El mecanismo de acción de los receptores PPAR comienza con su unión en el núcleo a otro tipo de receptores nucleares conocidos como RXR (receptor X retinoide), seguido por la unión de este heterodímero a regiones particulares del ADN denominadas PPREs, o elementos de respuesta al proliferador peroxisomal, ubicadas en cercanías a las regiones promotoras de los genes diana. Posteriormente, la unión del ligando promueve la disociación de las moléculas correpresoras y el reclutamiento de moléculas coactivadoras. La formación de este complejo activado conduce a la modificación de histonas y altera la expresión génica (43).

Los agonistas de PPARs más utilizados en la actualidad para el tratamiento de las complicaciones asociadas con la diabetes tipo-2 y dislipidemias son las tiazolidinedionas o

TZDs (rosiglitazona y pioglitazona, entre otros), que son agonistas de PPAR $\gamma$  y actúan como antidiabéticos al aumentar la sensibilidad a la insulina y mejorar el metabolismo de la glucosa (44). Otro tipo de fármacos son los fibratos (fenofibrato y gemfibrozil, entre otros), que son agonistas de PPAR $\alpha$  y actúan como hipolipemiantes y anti-ateroscleróticos al ayudar en el metabolismo de lípidos (45).

Se ha demostrado en diferentes modelos que tratamientos con agonistas de PPARs regulan positivamente los niveles de proteínas PPAR-coactivador-1 (PGC1) tanto  $\alpha$  como  $\beta$  (46, 47), estas proteínas son reconocidas como las reguladoras de la biogénesis mitocondrial en diferentes tejidos, incluyendo adipocitos marrones, blancos y neuronas (48, 49), adicionalmente se ha demostrado en diferentes modelos, incluyendo neuronas, que los PPARs pueden proteger de apoptosis mediante la regulación positiva de los niveles de proteínas antiapoptóticas como Bcl2 (50). Una revisión reciente sugiere que la señalada neuroprotección de los agonistas PPAR $\beta$  está dada, en gran parte, por la modulación de los procesos inflamatorios mediante la inhibición de la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B, lo cual produce una disminución en los niveles de citocinas inflamatorias como TNF- $\alpha$ , MCP-1 e IL-6 (51); además de los procesos asociados al estrés oxidativo (52).

Los receptores PPARs están involucrados en la diferenciación celular en una variedad de tejidos (53, 54). Estos receptores PPAR están presentes en el sistema nervioso central, con una mayor expresión, particularmente de PPAR $\beta$  (55). En células obtenidas de glioma, los tratamientos con agonistas de PPAR $\gamma$  han mostrado una disminución en la proliferación celular e inhibición en los procesos de migración e invasión. Adicionalmente, agonistas de PPAR $\beta$  promueven la diferenciación y maduración de los oligodendrocitos (56) y agonistas de PPAR $\gamma$  tienen la capacidad de inducir maduración de oligodendrocitos en medula espinal (57). El tratamiento con agonistas PPAR $\gamma$  en cultivos primarios de células progenitoras de oligodendrocitos de rata promueve la diferenciación de estas células y además incrementa su capacidad antioxidante mediante el incremento en los niveles de enzimas como la catalasa, superóxido dismutasa de cobre-zinc, promoviendo el equilibrio en la homeostasis celular (58), que resulta de gran importancia en este tipo celular por la gran cantidad de radicales libres que se generan durante metabolismo de la formación de la mielina. Un estudio reciente muestra que el tratamiento de cultivos de precursores de oligodendrocitos con agonistas de

PPAR $\gamma$  acelera su diferenciación y adicionalmente, aumenta el número de peroxisomas e incrementa la actividad del complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial (59). Es importante resaltar que la diferenciación de los precursores de oligodendrocitos a oligodendrocitos maduros mielinizantes es fundamental en este tipo de enfermedades, pues la deficiencia en el proceso de diferenciación no sólo causa desmielinización severa, sino que afecta drásticamente el proceso de remielinización. Por tal razón, el papel que juegan los agonistas de PPARs en la diferenciación de éstas células en particular, es muy importante para el desarrollo de fármacos y de alternativas terapéuticas para el tratamiento de KD y de otras enfermedades similares.

Particularmente en la enfermedad de Krabbe, los efectos de los agonistas de PPARs han sido parcialmente estudiados, hasta el momento, se ha determinado que los ratones Twitcher, tienen menores niveles de expresión de PPAR $\alpha$  y de su actividad transcripcional, lo que puede dar razón de la disminución de proteínas peroxisomales (18).

En la Tabla 1 se resumen los principales agonistas de PPARs, y los potenciales efectos sobre la supervivencia que han sido caracterizados.

### 3.5. LA VÍA PI3K/AKT Y SUPERVIVENCIA NEURONAL.

La vía PI3K/Akt puede participar en la supervivencia celular y neuroprotección mediante el bloqueo de la apoptosis, al promover la proliferación celular, y regulando vías adicionales de señalización celular. En neuronas la fosfatidil-inositol-3-quinasa (PI3K) y su mediador corriente abajo proteína quinasa B o Akt (PKB/Akt) median señales de supervivencia, diferenciación y proliferación neuronal (60, 61).

Estas vías activadas por diversos factores de crecimiento (FC) son un punto crucial en el cuál convergen diversas señales de supervivencia celular (62, 63). La unión de FC a los receptores tirosina quinasa causa autofosforilación de sus residuos tirosina, recluta proteínas adaptadoras como Shc, acoplándose corriente abajo y activando las vías PI3K/Akt y Raf/MEK/ERK, también conocida como la vía de las MAP quinasas (64-67).

PI3K consiste de una subunidad reguladora (85kDa) y una catalítica (100kDa) encargada de la fosforilación de lípidos de inositol para generar 3-fosfoinositoles (PI: PI(3)P, PI(3,4)P<sub>2</sub> y

Ligandos	Receptor	Selectivo	Función
Ácidos grasos saturados	PPAR- $\alpha$ (hígado, tejido adiposo, riñón, corazón, esqueleto, músculo, intestino grueso)	Lípido endógeno con agonista de PPAR $\alpha$ activo	Metabolismo de lípidos y glucosa
Ácidos grasos insaturados		Lípido endógeno con agonista de PPAR $\alpha$ activo	Metabolismo de lípidos y glucosa
CP775146		Agonista selectivo de PPAR $\alpha$ de alta afinidad	Metabolismo de lípidos y glucosa
Fenofibrato		Agonista de PPAR $\alpha$	Tratamiento de hipertrigliceridemia y dislipidemia
GW7647		Agonista potente de PPAR $\alpha$ , altamente selectivo. Activo por vía oral	Homeostasis lipídica, beta oxidación
Oleiletanolamida		Agonista de PPAR $\alpha$	Disminuye el peso corporal y la hiperlipidemia
Palmitoiletanolamida		Lípido endógeno con agonista de PPAR $\alpha$ activo	Antiinflamatorio, reduce el dolor
WY14643		Agonista selectivo de PPAR $\alpha$	Aterosclerosis y antiinflamación, previene hiperinsulinemia
GW6471		Antagonista selectivo de PPAR $\alpha$	Antagonista de fenofibratos
MK886		Antagonista selectivo de PPAR $\alpha$	Inhibe la actividad de PPAR $\alpha$ , $\beta$ y $\gamma$
Ácidos grasos	PPAR- $\beta$ (Ubicuo)		
(i) Ácido docahexanóico		Lípido endógeno con agonista de PPAR $\alpha$ activo	Anti inflamación
(ii) Ácido araquidónico			
(iii) Ácido linoleico			
GW501516		Agonista potente de PPAR $\beta$ , altamente selectivo	Incrementa el HDL-c sérico en dislipidemia aterogénica y decrece el azúcar en sangre en ayunas.
GW0742		Agonista potente de PPAR $\beta$	Antiinflamatorio
L-165,041	Agonista selectivo de PPAR $\beta$	Hiperlipidemia, hiperglicemia, aterosclerosis y obesidad.	
GW610742	Agonista selectivo de PPAR $\beta$	Tratamiento de diabetes y nefropatía	

FH535		Antagonista selectivo de PPAR $\beta$	Tratamiento de diabetes y nefropatía
GSK0660		Antagonista selectivo de PPAR $\beta$	Agonista inverso de PPAR $\beta/\gamma$
GSK3787		Antagonista potente y selectivo de PPAR $\beta$	Agonista inverso de PPAR $\beta/\gamma$
AINEs		Antagonista selectivo de PPAR $\beta$	Cáncer
Ácido linoleico		Lípido endógeno con agonista de PPAR $\gamma$ activo	Antiinflamación
Ácido araquidónico		Lípido endógeno con agonista de PPAR $\gamma$ activo	Antiinflamación
15d-PGJ2		Lípido endógeno con agonista de PPAR $\gamma$ activo	Antiinflamación
9-HODE		Lípido endógeno con agonista de PPAR $\gamma$ activo	Antiinflamación
13-HODE		Lípido endógeno con agonista de PPAR $\gamma$ activo	Antiinflamación
15-HETE		Lípido endógeno con agonista de PPAR $\gamma$ activo	Antiinflamación
Ciglitazona		Agonista selectivo de PPAR $\gamma$	Inhibe la proliferación celular
Hidrocloruro de GW1929	PPAR- $\gamma$ (tejido adiposo, Tejido linfoide, colon, hígado, corazón)	PPAR $\gamma$ selectivo. Activo por vía oral	Disminuye la glucosa, ácidos grasos y triglicéridos
LG100754		Agonista de PXR:PPAR	Sintetiza PPAR $\gamma$
nTZDpa		Agonista selectivo de PPAR $\gamma$	Antidiabético y anti carcinógeno
JTT-501		Agonista selectivo de PPAR $\gamma$	Antidiabético
Hidrocloruro de pioglitazona		Agonista selectivo de PPAR $\gamma$	Antidiabético
S26948		Agonista selectivo de PPAR $\gamma$	Antidiabético
Tioglitazona		Agonista selectivo de PPAR $\gamma$	Antidiabético
FH535		Antagonista de PPAR $\gamma$	Inhibe la señalización Pnt./ $\beta$ -catenina
GSK0660		Antagonista de PPAR $\gamma$	Agonista inverso de PPAR $\beta/\gamma$
GSK3787		Antagonista de PPAR $\gamma$	Agonista inverso de PPAR $\beta/\gamma$
BADGE	Selectivo de PPAR $\gamma$	Antagonista de rosiglitazona	
LG-100641	Selectivo de PPAR $\gamma$	Bloquea los antagonistas de TZDs	

**Tabla 1.** Agonistas de PPARs y sus potenciales efectos como mediadores de enfermedades. Adaptado de Monsalve *et al.*, 2013 (42).



PI(3,4,5)P<sub>3</sub>). Estos se unen a un dominio homólogo a pleckstrina presente en una variedad de moléculas de señalización, alterando su actividad y localización subcelular (61). La función de supervivencia de PI3K en particular está mediada por la activación de Akt (68-70). Recientemente, se ha demostrado que este proceso requiere su translocación a la membrana plasmática y la fosforilación en treonina 308 (Thr308) y serina 473 (Ser473).

Los blancos que están corriente abajo de Akt son diversos, se asocian a respuestas metabólicas y de supervivencia celular (71, 72). En neuronas, Akt regula la supervivencia pero no se ha demostrado que promueva en el crecimiento o la diferenciación (63).

Los sustratos de Akt incluyen la inactivación por fosforilación de mediadores pro-apoptóticos (Bad, Bax, caspasa-9, factor de transcripción Forkhead, GSK-3, p53), y activación de proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL, IAP y mTOR) (68, 73-77) (Figura 3).

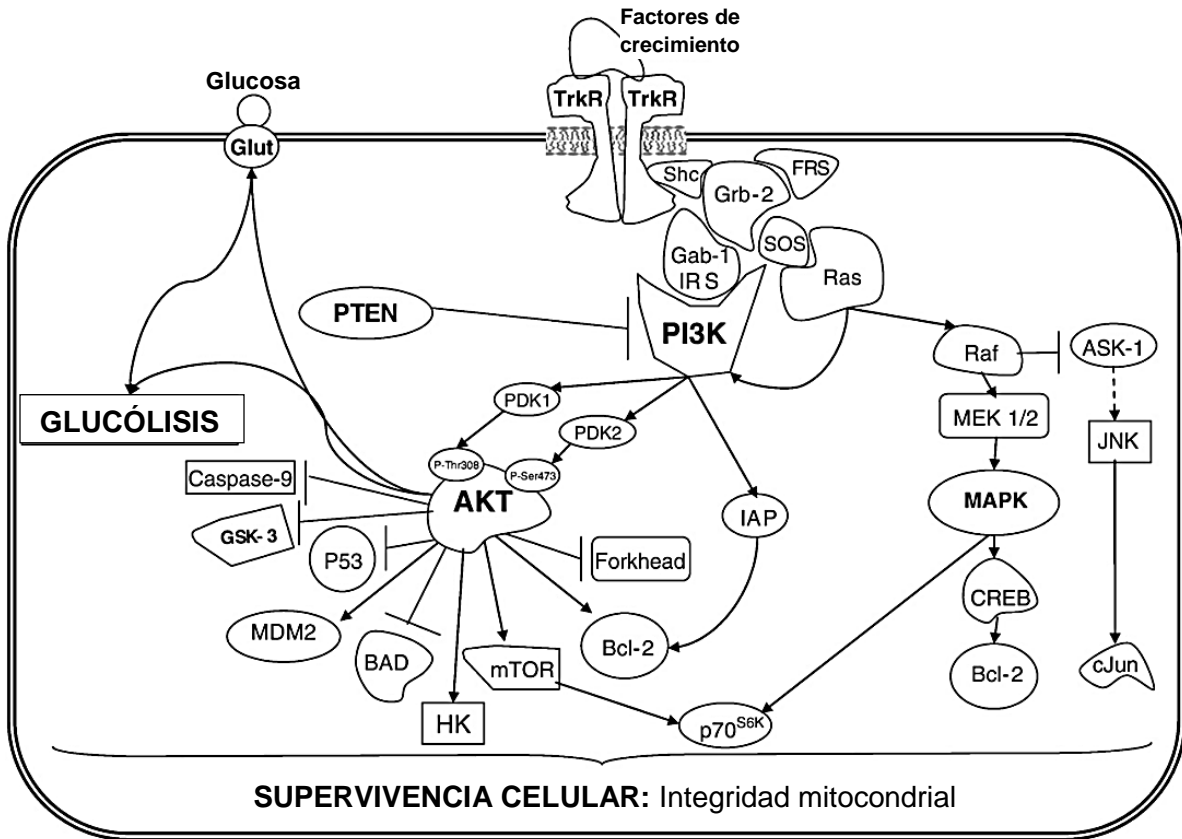
Probablemente Akt media la supervivencia neuronal a diferentes niveles dependiendo del tipo celular, de la disponibilidad de blancos y del requerimiento de eventos transcripcionales o post-transcripcionales (78). El desarrollo de terapias dirigidas contra componentes específicos de la vía PI3K/Akt y sus blancos corriente abajo, pueden constituir una de las principales opciones para la regulación de la muerte celular y un blanco terapéutico para favorecer la supervivencia neuronal de las poblaciones más susceptibles.

Adicional a su función en supresión de la muerte celular, los FC vía PI3K/Akt también regulan el metabolismo celular modulando la captación de glucosa (79-84). Poco se conoce acerca de la función de la vía PI3K/Akt en la regulación del metabolismo de la glucosa (glucólisis) y cómo esta contribuye a las decisiones de supervivencia/muerte celular (83-85).

A diferencia de las proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2, que mantienen la homeostasis mitocondrial en respuesta a remoción de FC al promover el transporte continuo de metabolitos a través de la membrana mitocondrial externa aún en presencia de metabolismo celular disminuido (84, 86, 87), la supervivencia mediada por PI3K/Akt requiere de un suplemento continuo de sustratos metabólicos y por ende depende del metabolismo celular (81, 87).

En modelos de ausencia de FC y de glucosa, la disminución en la glucólisis se ha asociado de forma consistente con estadios iniciales de apoptosis (depleción de ATP, translocación mitocondrial de Bax, activación de JNK, disminución del potencial mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), y liberación de citocromo c al citoplasma). Estos cambios se generan debido a la ausencia de sustratos metabólicos derivados de la glucosa, ya que la sobreexpresión de Glut1 (transportador de glucosa) previene tales alteraciones (80, 88, 89). La sobreexpresión de Akt previene también las alteraciones asociadas a ausencia de FC y mantiene la supervivencia celular al estabilizar la bioenergética celular vía incremento en el transporte y metabolismo de glucosa (81). Se ha demostrado que Akt incrementa (o posiblemente redistribuye) la actividad hexoquinasa, de tal forma que la hexoquinasa permanece asociada a la mitocondria y disminuye la muerte celular (90). Estos estudios sugieren que el acoplamiento entre glucólisis y la función mitocondrial es un pre-requisito para que los FC y en particular Akt medien sus efectos en supervivencia. Además la actividad hexoquinasa es suficiente para que Akt inhiba la apoptosis (90). La forma como la vía PI3K/Akt regula la función hexoquinasa, su asociación/desplazamiento del canal aniónico voltaje dependiente (VDAC) y la función mitocondrial, y cómo la actividad hexoquinasa contribuye a la supervivencia celular mediada por los FC, requieren mayor análisis. Así, la inhibición de la vía glucolítica a través de inhibición de la vía PI3K/Akt puede determinar eventos que dirigen las neuronas a muerte celular, y constituyen un blanco terapéutico poco explorado en EP.

Las facultades de la vía PI3K/Akt y de los factores de crecimiento en la promoción de la supervivencia han sido menos exploradas en oligodendrocitos, sin embargo, se ha demostrado que la psicosina inhibe la fosforilación de Akt y de ERK1/2 (20). Recientemente se probó que los astrocitos secretan factores que pueden promover la supervivencia de los oligodendrocitos a través de Akt y ERK (91), aumentando la evidencia de éstas vías como blancos terapéuticos para tratar enfermedades que afectan a los oligodendrocitos. De manera paradójica, otro estudio mostró que la expresión de Akt constitutivamente activo no afecta la supervivencia de los oligodendrocitos, pero si aumenta la producción de mielina en el sistema nervioso central, aparentemente a través de su fosforilación por mTOR (92, 93), lo que abre nuevas alternativas en el estudio de los posibles mecanismos de acción de Akt sobre los procesos de mielinización y desmielinización.



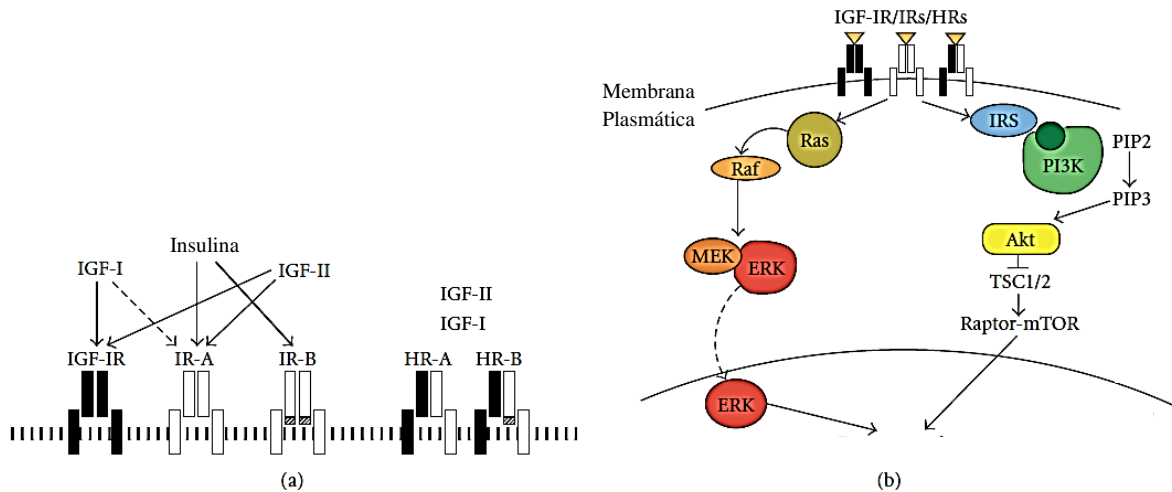
**Figura 3.** Vías de supervivencia PI3K/Akt y MAPK. Adaptado de Arboleda, *et al.* 2009(94).

### 3.6. IGF-1 Y SU PAPEL EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

La insulina y los factores de crecimiento similares a insulina (IGFs) son miembros de la superfamilia de péptidos similares a insulina y tienen un importante papel en el desarrollo, la diferenciación celular, la plasticidad y la supervivencia del sistema nervioso (95). Estos péptidos actúan en varios receptores que inician cascadas de fosforilación corriente abajo que se encargan de regular la transcripción, maduración sináptica y apoptosis. En el cerebro adulto, la insulina y el IGF-1 actúan como señales circulantes que alcanzan el SNC atravesando la barrera hematoencefálica; IGF-1 también actúa como una señal paracrina liberada por todos los tipos celulares del sistema nervioso. La biodisponibilidad de IGF-1 es regulada por su interacción con proteínas de unión a IGF (IGFBPs). IGF-1 participa en

neuroprotección y puede tener un importante papel en la patofisiología de diversos desórdenes neurológicos y como posible blanco terapéutico para estas condiciones (95).

Las acciones biológicas de los péptidos similares a insulina están mediadas por 3 tipos diferentes de receptores. La unión del ligando al receptor de insulina inicia la actividad tirosina quinasa intrínseca, y subsecuentemente inicia una cascada de señalización que conlleva al reclutamiento de proteínas de anclaje, tales como los miembros de la familia del sustrato de receptores de insulina (IRS) (96). Los efectos de IGF-1 son mediados por el receptor de IGF-1 (IGF1R). IGF1R es una glicoproteína que forma homodímeros pero puede actuar también como un híbrido funcional con el receptor de insulina, sugiriendo una cooperación entre IGF-1 y la señalización de insulina (97-99). La activación del receptor de insulina o de IGF-1 dispara dos vías de señalización: la vía PI3K/Akt y la vía de las quinasas Ras/Raf-1/MEK/ERK (Figura 4). Como se mencionó previamente, estas vías modulan la transcripción génica y activan múltiples quinasas y fosfatasa corriente abajo que afectan la síntesis de proteínas, el tráfico vesicular, el crecimiento y la diferenciación celular, el metabolismo y la resistencia al estrés oxidativo (97-99).



**Figura 4.** Receptores, ligandos y vías de señalización del sistema IGF-1. **a.** Representación esquemática de los receptores y ligandos involucrados en el sistema IGF-1. Las isoformas del receptor de insulina (IR-A o IR-B) se unen a la insulina con alta afinidad, mientras que el receptor de IGF-1 (IGF-1R) se une a IGF-1 e IGF-2. En las células que expresan ambos, IR e IGF-1R, los hemireceptores IR pueden heterodimerizar con los hemireceptores IGF-1R, conduciendo a la formación de los híbridos IR/IGF-1Rs (HRs), los cuales se unen a IGF-1 e IGF-2 con alta afinidad y a insulina con una afinidad mucho más baja. **b.** Representación esquemática de las dos vías de señalización principales envueltas en el sistema IGF-1. IGF-1, IGF-2 e insulina se unen a sus

receptores afines, llevando a la activación de las vías PI3K/Akt y Ras/Raf-1/MEK/ERK pathway. Tomado de Belfiore *et al.*, 2009 (100).

Los efectos producidos por IGF-1 sobre la supervivencia y en la proliferación han sido demostrados y caracterizados en oligodendrocitos. Por ejemplo, investigaciones recientes muestran que la proliferación y la síntesis de proteínas en células progenitoras de oligodendrocitos inducida por IGF-1 requiere de las vías PI3K/Akt, Ras/Raf-1/MEK/ERK y la de tirosinas quinasas del tipo Src (101, 102). Por otro lado, Pang Y. *et al.*, 2007 demostraron que IGF-1 es capaz de proteger oligodendrocitos del daño inflamatorio producido por citocinas, de nuevo, a través de la activación de la vía de señalización PI3K/Akt, aunque en este caso, la vía Ras/Raf-1/MEK/ERK parece no tener ningún efecto (103). La forma mediante la cual IGF-1 otorga protección a las células progenitoras de oligodendrocitos es a través del bloqueo de proteínas proapoptóticas como BAD y BAX y la supresión de la activación de caspasas 3 y 9, lo que parece revalidar el importante papel que cumplen las mitocondrias en los procesos apoptóticos generados en diversas enfermedades neurodegenerativas.

### 3.7. INTERACCIÓN ENTRE IGF-1 Y PPARs.

Aún más interesantes resultan las investigaciones que procuran describir el efecto de los agonistas de PPARs sobre las vías de señalización de IGF-1. Dichas investigaciones sugieren que el resultado final de las interacciones entre PPARs e IGF-1 va a depender del contexto celular en el cual se lleven a cabo, y pueden ser tanto pro supervivencia como pro apoptóticas (100).

En algunos contextos celulares, los ligandos de PPAR $\gamma$  reducen la expresión de las proteínas MEK1/2 e inhiben la fosforilación de ERK1/2 (104, 105), lo que genera una detención del crecimiento celular y apoptosis, y podría interpretarse como que los agonistas de PPAR $\gamma$  bloquean las acciones biológicas de IGF-1. Sin embargo, en otros sistemas celulares, los agonistas de PPAR $\gamma$  pueden activar ERK1/2 (106), promoviendo la supervivencia y la división celular. Mecanismos alternativos de interacción entre PPAR $\gamma$  y la vía MAPK/PI3K incluyen la inactivación por fosforilación en Ser84/114 de PPAR $\gamma$  mediada por ERK (107-109), lo que produce un efecto anti-proliferativo, anti-inflamatorio y pro-diferenciativo; la

exportación nuclear de PPAR $\gamma$  dependiente de MEK1/2 (110) seguida de la degradación de PPAR $\gamma$  en el citosol; regulación a la alta de PTEN en diversos tipos celulares (111-116), regulación a la baja de mTOR por medio de la activación de AMPK; y la inhibición de la fosforilación de p70S6K (117, 118).

Otro importante descubrimiento hecho recientemente (119) señala que las TZDs, fuertes agonistas de PPAR $\gamma$ , pueden suprimir los niveles de IGFs o de las proteínas de unión a IGFs (IGFBPs) *in vitro* e *in vivo*, cuando las células son expuestas por periodos prolongados (> de 24h) a TDZs, lo que tiene un efecto inhibitorio directo sobre la diferenciación y proliferación celular mediada por los efectos transcripcionales y postranscripcionales de esta vía; posiblemente relacionado con varios genes del ciclo celular (120, 121).

### 3.8. LÍNEA CELULAR MO3.13

En este trabajo se utilizó la línea oligodendroglial humana MO3.13, esta línea celular fue creada por McLaurin y colaboradores en (1995), se originó e inmortalizó por la fusión de un rdbomiosarcoma con oligodendrocitos adultos humanos. Estas células presentan marcadores de oligodendrocitos maduros tales como (GALC, MAG, MBP, PLP), junto con la expresión del marcador para astrocitos maduros GFAP (122) por lo tanto se encuentran en un estado inmaduro del linaje celular glial. La diferenciación de ésta línea celular se induce cuando son cultivadas en medio DMEM libre de suero fetal bovino y en presencia de PMA, un agonista de la PKC, generando una mayor expresión de marcadores de oligodendrocitos tales como (MBP y PLP), al igual que regulación a la baja del marcador de astrocitos GFAP (122).

Este modelo celular presenta ventajas metodológicas, teniendo en cuenta lo dispendioso de la obtención, mantenimiento y costos de los cultivos primarios de oligodendrocitos. Esta línea celular resuelve parcialmente este problema (123). Adicionalmente, los oligodendrocitos maduros de un cultivo primario no proliferan *in vitro*. Sin embargo, esta línea celular presenta ciertas desventajas, como son; presentar células precursoras de oligodendrocitos (OPCs), un origen tumoral, lo cual podría tener alteraciones en los resultados, que se correlacionen con pérdida o disminución del fenotipo de la célula madura (123).

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de agonistas de PPARs y del factor de crecimiento IGF-1 sobre dos modelos *in vitro*, uno endógeno y otro exógeno, de la enfermedad de Krabbe, y analizar su papel como posibles blancos terapéuticos para el tratamiento de esta enfermedad.

Estudiar los procesos de distribución y acumulación de la psicossina en el sistema nervioso del modelo murino de la enfermedad de Krabbe.

### 4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estandarizar la muerte de oligodendrocitos a través de dos modelos *in vitro* de KD, uno exógeno (psicossina) y otro endógeno (silenciamiento del gen *GALC*), utilizando la línea celular MO3.13.
2. Evaluar el efecto de agonistas de PPARs (rosiglitazona, WY14643, GW0742) y el factor de crecimiento (IGF-1) sobre la muerte de oligodendrocitos asociada a los dos modelos celulares de KD.
3. Analizar el papel de las vías de señalización IGF1R, PI3K/AKT, MAPK/ERK, y PPAR (alfa, beta y gamma) sobre el efecto de los agonistas de PPAR: rosiglitazona, WY14643, GW0742 e IGF-1.
4. Analizar diferentes fracciones membranales subcelulares de tejido cerebral de ratones Twitcher con el fin de determinar el patrón de acumulación y distribución de la psicossina en el sistema nervioso.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1. OBJETIVO ESPECIFICO 1.

*Estandarizar la muerte de oligodendrocitos a través de dos modelos in vitro de KD, uno exógeno (psicosina) y otro endógeno (silenciamiento del gen GALC), de enfermedad de Krabbe, utilizando la línea celular MO3.13.*

#### 5.1.1. Cultivo y diferenciación de la línea celular MO3.13

La línea celular MO3.13 es cultivada en cajas de 75cm<sup>2</sup> conteniendo 10 mL de medio fresco DMEM, suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% y 100U/ml Penicilina y 100µg/ml de Estreptomicina en una incubadora a 37°C y 5% (v/v) en CO<sub>2</sub>. El cultivo de células diferenciadas se obtiene cultivando las células sembradas a una confluencia del 70%, en DMEM libre de SFB, suplementado con 100U/ml Penicilina y 100µg/ml de Estreptomicina, con 4-β-phorbol-12-myristato 13-acetato (PMA) 20µM por 3 días (122, 123).

#### 5.1.2. Obtención de los modelos in vitro de Krabbe

Se obtendrán dos modelos, uno de inducción de psicosis endógena, en el cual se silenciará el gen *GALC* en la línea celular MO3.13, y otro exógeno en el cual se expondrán las células MO3.13 a diferentes dosis de psicosis y a diferentes periodos de exposición al tóxico.

Para el modelo endógeno se utilizará un sistema de expresión lentiviral inducible por derivados de tetraciclina (TTC) "Lenti-X<sup>TM</sup>Tet-On®", para ello, células MO3.13 se transfectarán utilizando liposomas, posteriormente será activado el silenciamiento del gen *GALC* cultivando las células en medio de diferenciación y en presencia de TTC, de modo que expresen el shRNA. Los plásmidos son obtenidos de ThermoScientific Open Biosystems (TRIPZ Lentiviral Inducible shRNAmir), los cuales poseen una secuencia específica para el gen *GALC*, un promotor inducible con TTC, el marcador fluorescente Turbo RFP, y un marcador de selección con puromicina. Se usarán como controles plásmidos semejantes pero que no poseen la secuencia específica para *GALC*. Las células serán seleccionadas con puromicina (4µg/mL), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. El silenciamiento de *GALC* será confirmado por western blot específico.



El modelo exógeno consiste en realizar cultivos de las células MO3.13 en medio de diferenciación (DMEM + PMA) y exponerlos a diferentes concentraciones de psicossina (1, 5, 10, 20 y 50  $\mu\text{M}$ ) por 24 horas. Para evaluar el efecto de los agonistas de PPAR, se aplicaran 3 concentraciones diferentes de cada uno (WY 14 643, GW 0742 y Rosiglitazona), 1 hora y 24 horas antes de aplicar la psicossina. El IGF-1 se aplicará a una concentración de 100 nM, 1 hora antes de la psicossina. Posteriormente, se realizará la extracción de proteína de los cultivos celulares y se analizarán las vías de supervivencia por western blot.

## 5.2. OBJETIVO ESPECIFICO 2.

*Evaluar el efecto de agonistas de PPARs (rosiglitazona, WY14643, GW0742) y factores de crecimiento (IGF-1) sobre la muerte de oligodendrocitos asociada a los dos modelos celulares de KD.*

Los métodos a utilizar en los ensayos colorimétricos de citotoxicidad para los modelos basados en la línea celular MO3.13 serán: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), sales de Tetrazolio solubles en agua (WST) y lactato deshidrogenasa (LDH) en microplaca según las condiciones del proveedor.

### *5.2.1. Evaluación del efecto de rosiglitazona, WY14643 y GW0742 sobre la viabilidad de células MO3.13*

Se estudiará el efecto de la concentración de los fármacos agonistas rosiglitazona, WY14643 y GW0742, en la viabilidad de células MO3.13 mediante ensayos de MTT, WST y LDH determinando la concentración óptima de trabajo, que corresponderá a la concentración máxima que no tiene un efecto negativo en la viabilidad celular.

### *5.2.2. Evaluación del efecto de rosiglitazona, WY14643 y GW0742 sobre los modelos de Krabbe*

Se estudiara el efecto de la psicossina y del silenciamiento de forma independiente y posteriormente se estudiara el efecto neuroprotector de los fármacos (rosiglitazona, WY14643, GW0742) e IGF-1 realizando pre-tratamientos de los fármacos según se especifica a continuación.

Se realizaran pre-tratamientos de una hora y 24 horas con la concentración estandarizada de cada fármaco y posteriormente se inducirá muerte celular con diferentes concentraciones de

Psicosina exógena entre 0 - 50 $\mu$ M. Las células silenciadas para el gen *GALC* serán tratadas con pre-tratamientos de los fármacos de (1 y 12 horas) previo al silenciamiento inducido con TTC exógena. Se estudiara el efecto de la liberación de lactato deshidrogenasa por el método del LDH, y citotoxicidad mediante MTT.

### 5.3. OBJETIVO ESPECÍFICO 3

*Analizar el papel de las vías de señalización IGF1R, PI3K/AKT, MAPK/ERK, y PPAR (alfa, beta y gamma) sobre el efecto de los agonistas de PPAR rosiglitazona, WY14643, GW0742 e IGF-1.*

#### 5.3.1. Activación de vías de señalización

A partir de los resultados que se obtengan en los experimentos del Objetivo 2 se realizará el análisis de la activación de las vías de señalización PI3K/AKT, MAPK/ERK, mediante el estudio de los niveles en la fosforilación de las proteínas en comparación con los niveles totales por western blot. Se tomará como control constitutivo,  $\beta$ -actina. El análisis de expresión se realizará mediante la técnica de western blot, con anticuerpos específicos para cada receptor.

### 5.4. OBJETIVO ESPECÍFICO 4

*Analizar diferentes fracciones membranales subcelulares de tejido cerebral de ratones Twitcher con el fin de determinar el patrón de acumulación y distribución de la psicosina en el sistema nervioso.*

#### 5.4.1. Toma de muestras de tejido y preparaciones de fraccionamiento vesicular

Cerebros completos de ratones Twitcher y WT (wild type) de edades P7, P15 y P30 fueron homogenizados en buffer de lisis y luego separados, por centrifugación diferencial, para producir distintas fracciones membranosas y una fracción final que contiene las proteínas citosólicas.

#### 5.4.2. Western Blot

La concentración de proteína de cada fracción membranal fue determinada por el método de Bradford Assay (Biorad), seguida por SDS-PAGE, electrotransferida a membranas de PVDF,

bloqueada e incubada por toda la noche con anticuerpos específicos para la bomba de Na/K, flotillina, nucleoporina, HSP60, kinesina de cadenas ligera y pesada, PP1 y GSK3- $\beta$ .

#### 5.4.3. *Ensayo de colesterol*

El colesterol total fue determinado con el kit Amplex Red Cholesterol Assay, las medidas fluorimétricas fueron cuantificadas por el detector multimodo Beckman Coulter DTX 880.

#### 5.4.4. *Microscopía electrónica de transmisión*

Pellets de cada fracción fueron procesadas para microscopía electrónica por tinción negativa. Las muestras fueron observadas con un microscopio electrónico JOEL 1100.

#### 5.4.5. *Extracción de psicossina*

La psicossina fue selectivamente extraída y separada con acetona y cromatografía de intercambio catiónico débil (Waters Acell Plus CM Cartridge).

#### 5.4.6. *Espectrometría de masas*

La psicossina fue analizada por HPLC-MS-MS (HPLC Colum- Shimadzu Shimpak VP-ODS-C18 reverse phase 4.5x150mm), seguida por espectrometría de masas en tándem usando un espectrómetro de masas API 4000 triple quadrupole.

### 5.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

El análisis de resultados se realizó mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido por una prueba de comparación múltiple de Dunnett para comparar los diferentes tratamientos contra el control, por una prueba de Bonferroni cuando se quiso comparar entre pares de tratamientos seleccionados, una prueba de Tukey-Kramer cuando se compararon todos los pares de tratamientos, o una prueba de tendencia lineal para determinar los efectos dosis o tiempo-dependientes. Para tales análisis se usó el software GraphPadPrism Demo 5. Todos los datos se presentan como promedio  $\pm$  desviación estándar (DE) (Anexo 1).

### 5.6. CONSIDERACIONES ÉTICAS E IMPACTO AMBIENTAL

Este trabajo se desarrolla en el marco de la Ley 430 de Enero 16 de 1998 por la cual se dictan las normas prohibitivas en materia ambiental, referentes a los desechos peligrosos.

Dentro del diseño experimental propuesto para el desarrollo de este trabajo se requiere utilizar cultivos celulares, lo que implica la utilización de sustancias con potencial tóxico que pueden ser nocivas para la salud de las personas que manipulen estos reactivos; por lo tanto para mitigar estos efectos se exige la aplicación de las normas básicas de bioseguridad en laboratorio (cabinas de flujo, utilización de bata de laboratorio, guantes, tapabocas) para evitar posibles consecuencias negativas sobre los investigadores.

Además, se debe tener en cuenta la producción de desechos tóxicos que pueden repercutir de manera adversa sobre el medio ambiente, específicamente medios de cultivo, guantes y demás elementos del laboratorio contaminados, por lo cual antes de descartar cualquier elemento será clasificado y depositado en bolsas rojas, y los líquidos, en especial los medios de cultivo contaminados, serán inactivados con hipoclorito de sodio antes de ser descartados.

La aplicación de estas normas permitirá realizar un uso sostenible de los recursos y disminuir la presión antrópica a los cuales son sometidos los ecosistemas acuáticos y terrestres circundantes de Bogotá garantizando su conservación a largo plazo.

## 5.6. PROPIEDAD INTELECTUAL

Durante el desarrollo del proyecto es posible que el trabajo escrito en forma de artículos, reportes y tesis de maestría pueda contener material original que podrían representar nuevos descubrimientos. Es la responsabilidad de la Universidad Nacional de Colombia, cuando lo considere apropiado, proteger los derechos que surgen de los resultados del proyecto. Los derechos de explotación del proyecto son propiedad del Universidad Nacional de Colombia, a menos que exista un acuerdo que especifique lo contrario.

No obstante, la Universidad Nacional de Colombia reconoce la posición de los investigadores, co-investigadores y estudiantes cuyo trabajo genere beneficios económicos, y normalmente llega a un acuerdo con las personas que participan en tal beneficio, en reconocimiento a su contribución.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. ESTANDARIZACIÓN DE LA MUERTE DE CÉLULAS MO3.13 EN LOS DOS MODELOS DE KD.

Como se mencionó previamente, se realizaron dos modelos celulares *in vitro* de la enfermedad de Krabbe, uno exógeno, al que se le aplicaban directamente sobre el medio de cultivo diferentes dosis de psicossina con la idea de que, al incorporarla al interior celular, se simularan los efectos citotóxicos de este esfingolípido; y otro endógeno en el que la acumulación intracelular de psicossina se diera de manera autónoma por medio del silenciamiento del gen GALC, encargado de la degradación de la psicossina, esperando de esta manera, obtener un modelo más auténtico de la enfermedad.

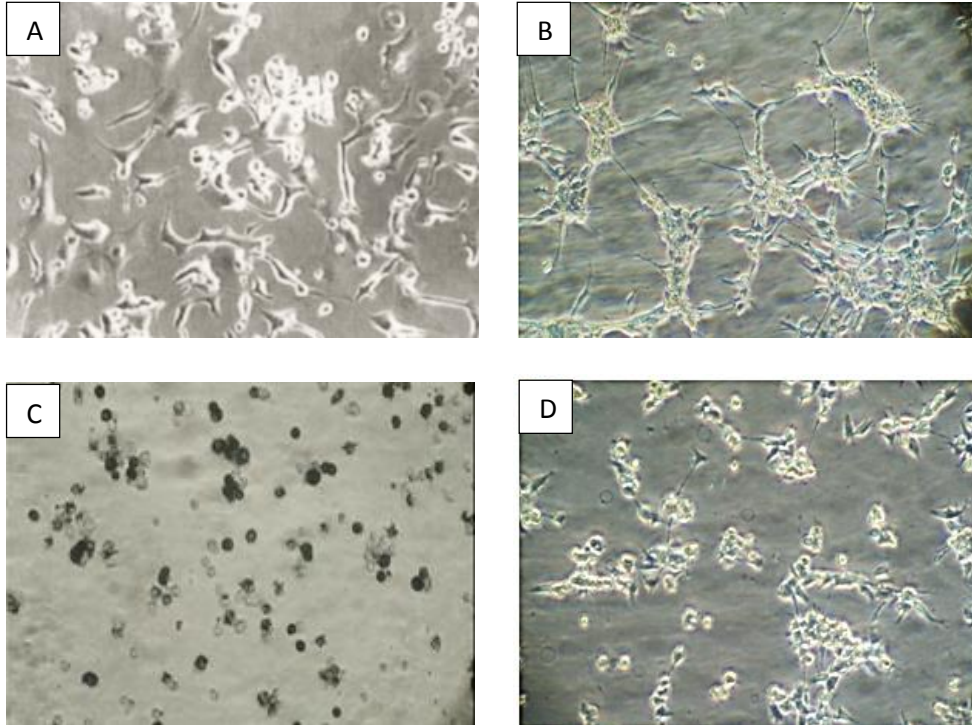
#### 6.1.1. Muerte celular en el modelo exógeno

Se realizaron cultivos de células MO3.13, diferenciadas y no diferenciadas, en cajas de cultivo de 96 pozos, aproximadamente al 70% de confluencia, a los que se les aplicaron diferentes dosis de psicossina y, posteriormente, se les realizaron pruebas de viabilidad y de citotoxicidad (LDH y WST) a periodos variables de exposición a la psicossina (3, 6, 9, 12, 24 y 48 horas) para ver su efecto sobre la supervivencia celular.

Las células MO3.13 no diferenciadas se ven al microscopio de luz adheridas, refringentes, tienen procesos alargados principalmente en forma bipolar y el cuerpo celular es de forma circular (Figura 5 A), mientras que las células diferenciadas muestran mayor número de procesos que se entretrejen con los de células de las aledañas conformando una red celular (Figura 5 B). Aunque las células diferenciadas, en teoría, tienen la maquinaria necesaria para producir la mielina, en cultivos *in vitro* no son capaces de producirla puesto que carecen de la comunicación y el soporte proporcionado por los axones y los astrocitos para generar la vaina de mielina. Sin embargo, la ramificación elevada es un indicador morfológico de su maduración.

La exposición de las células a psicossina en concentraciones superiores a 10  $\mu$ M causa cambios morfológicos indicativos de un proceso de muerte celular, entre los que son más visibles la retracción de los procesos membranales, la pérdida de la adherencia a la superficie

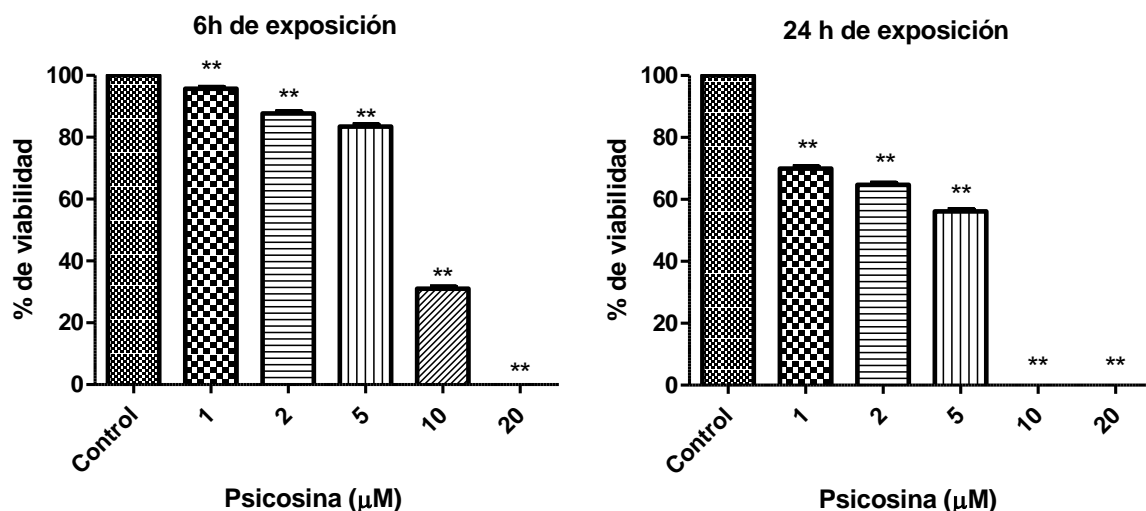
del frasco de cultivo, se anula la refringencia y los cuerpos celulares se tornan irregulares (Figura 5, C-D).



**Figura 5.** Características morfológicas de las células MO3.13 sin diferenciar (A), con 3 días de diferenciación (B); y luego de aplicar 20  $\mu\text{M}$  de psicossina por 24 h a las células no diferenciadas (C) y diferenciadas (D).

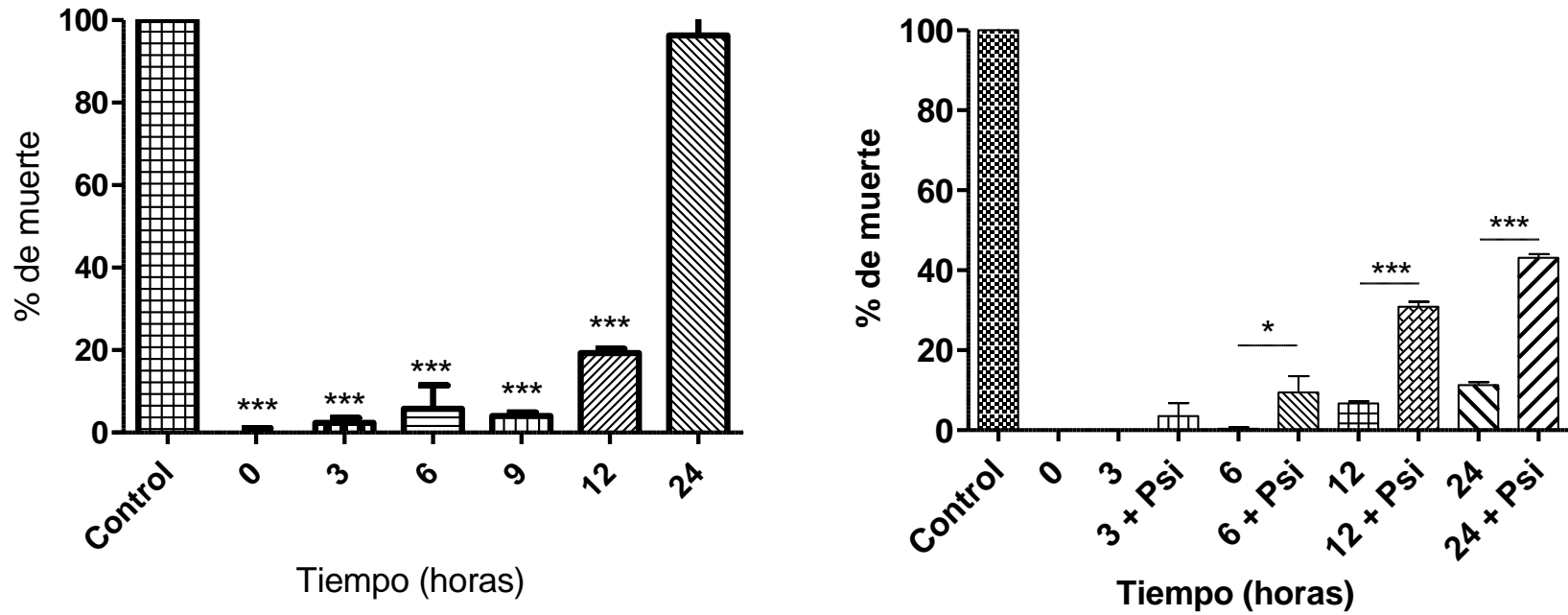
Se realizaron ensayos de WST con el fin de analizar el efecto de la psicossina sobre la supervivencia de las células MO3.13, y, consecuentemente, determinar la dosis adecuada para los experimentos dirigidos a evaluar el efecto de los agonistas de PPARs y de IGF-1 sobre la supervivencia celular. Para ello, se diferenciaron las células en medio DMEM + PMA por 72 horas y a continuación expusieron las células a concentraciones ascendentes de psicossina (1, 2, 5, 10 y 20  $\mu\text{M}$ ), por un periodo de 6 h (Figura 6 A) o de 24 h (Figura 6 B). Los resultados muestran que ya a las 6 h de exposición hay una disminución estadísticamente significativa ( $P < 0,001$ ) en la viabilidad celular a una concentración tan baja como 1  $\mu\text{M}$ , disminución que se hace más evidente a medida que aumenta la concentración de psicossina y con mayor tiempo de exposición.

A partir de estos resultados se determinó que 10  $\mu\text{M}$  de psicossina es la concentración más apropiada para realizar los experimentos siguientes, puesto que es cuando se observa la disminución más severa en la supervivencia celular, tanto a las 6 h como a las 24 h, lo que permite atribuirle, categóricamente, la muerte celular.



**Figura 6.** Ensayo de WST que muestra el efecto en de la psicossina sobre la muerte de las células MO3.13 luego de 72 horas de diferenciación. (A) 6h de tratamiento, (B) 24 de tratamiento. Los valores son normalizados al control sin psicossina y presentados como el promedio  $\pm$  EEM de 3 tratamientos independientes \*\* $P < 0.001$ ; comparaciones realizadas respecto al control.

Posteriormente se determinó la cinética de toxicidad de la psicossina exponiendo las células MO3.13 no diferenciadas o diferenciadas, a 10  $\mu\text{M}$  de psicossina en periodos variables de tiempo (0, 3, 6, 9, 12 y 24 h), y subsiguientemente realizando ensayos de LDH para estimar el porcentaje de muerte celular (Figura 7). Tanto en las células diferenciadas como en las no diferenciadas, se observó un efecto tiempo dependiente en la toxicidad de la psicossina, siendo el periodo de 24 horas el que produjo mayor porcentaje de liberación de LDH. Teniendo en cuenta que la privación de SFB más la aplicación de PMA que son necesarios para la diferenciación de las células genera, por sí mismos, un estrés celular que puede aumentar los niveles de liberación de LDH, en las células diferenciadas se realizó un control adicional con células a las que no se les aplicó psicossina, con el fin de comparar legítimamente sus efectos sobre la supervivencia celular (Figura 7, B).

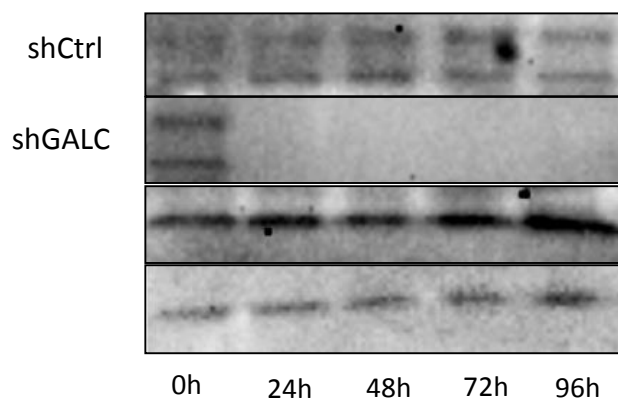


**Figura 7.** Ensayo de LDH que muestra el efecto tiempo dependiente de la psicossina 10 µM sobre la muerte de las células MO3.13 no diferenciadas (A) y luego de 72 horas de diferenciación (B). Los valores son normalizados al control de muerte y presentados como el promedio ± EEM de 3 tratamientos independientes. \*P < 0,05, \*\*\*P < 0.01; comparaciones realizadas respecto al control de muerte en (a), y respecto al control sin psicossina en (b).



### 6.1.2. Muerte celular en el modelo endógeno

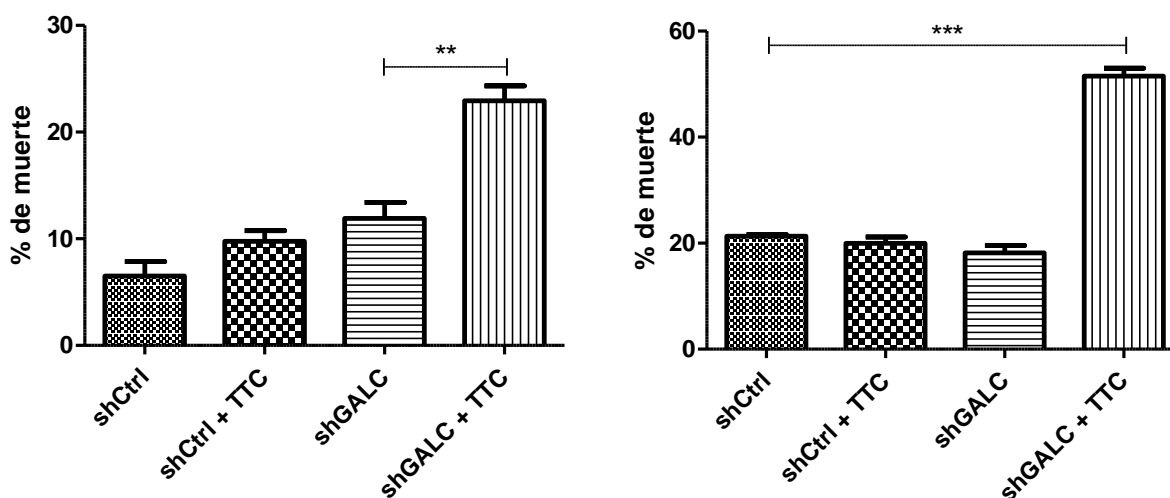
Para determinar el efecto del silenciamiento del gen GALC sobre la supervivencia de las células MO3.13, se realizaron cultivos de las células silenciadas en medio de diferenciación, y luego de 48 horas se realizó la inducción del silenciamiento con tetraciclina (TTC) (0.5 µg/mL). Se verificó el silenciamiento de GALC mediante western blot con un anticuerpo específico para las dos subunidades de la enzima GALC, a diferentes tiempos de exposición a la TTC (24, 48, 72 y 96 h). Como se puede observar en la Figura 8, tras 24 horas de la inducción con TTC, ya no hay evidencia de GALC en las células que expresan el shARN de interferencia, mientras que en el control de la transfección, es decir, las células que fueron transfectadas con el plásmido que no contiene la secuencia específica para GALC, se detectó la presencia de GALC, incluso 96 horas después de la aplicación de la TTC.



**Figura 8.** Silenciamiento de GALC. Los niveles de la enzima GALC en células shGALC y shControl fueron determinados por western blot tras 24, 48, 72 y 96 h de inducción con 0,5 µg/mL de TTC. Imagen representativa de tres experimentos independientes.

Una vez verificado el silenciamiento del gen GALC, se procedió a realizar las pruebas de viabilidad celular, para determinar el efecto que tiene la ausencia de GALC sobre la supervivencia. Para esto, se realizaron cultivos de las células silenciadas (shGALC) y de las células control (shControl), y tras 48 de diferenciación, se les indujo el silenciamiento con TTC. Pasados 3 días de diferenciación (24 h después de la inducción del silenciamiento) y/o 7 días (96 h después de la inducción del silenciamiento) se realizaron ensayos de LDH y MTT para cuantificar los niveles de supervivencia celular (Figuras 9 y 10).

La Figura 9 muestra un aumento significativo en la liberación de LDH en las células transfectadas, luego de inducirles el silenciamiento tras 3 días (A) y 7 días (B) de diferenciación. Se puede notar que el porcentaje de muerte en las células silenciadas (shGALC) alcanza un valor cercano al 25 por ciento con respecto al control de muerte en las células que se mantuvieron por 7 días, mientras que en las células que permanecieron en cultivo durante 3 días, el valor llegó casi el 60 por ciento. Por el contrario, los niveles de muerte en las células control (shCtrl) con y sin TTC, así como en las células shGALC sin inducción, fue muy inferior (valores cercanos al 10 y al 20 por ciento para células diferenciadas 3 y 7 días, respectivamente).

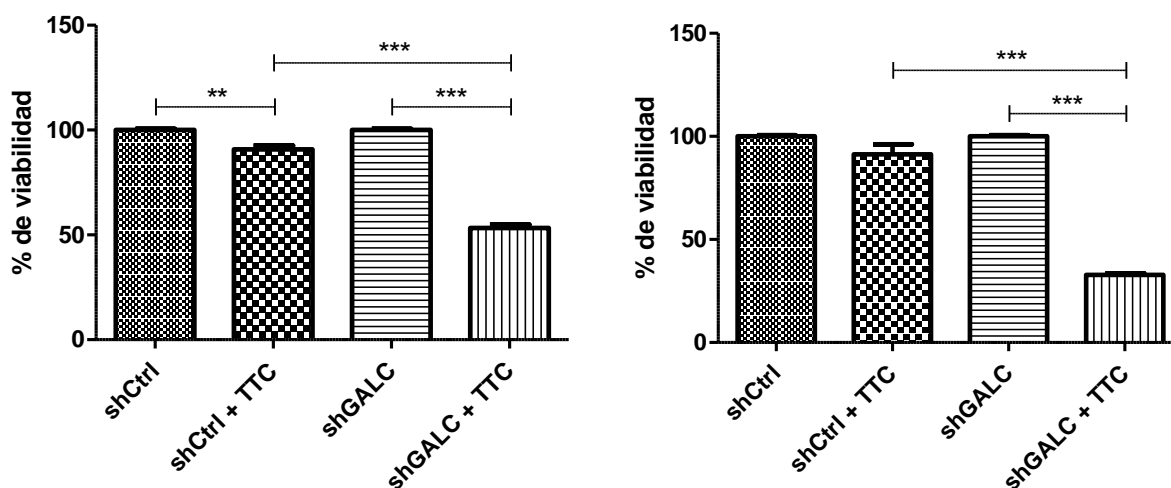


**Figura 9.** Efecto del silenciamiento de GALC sobre la muerte celular. Ensayos de LDH que muestran un aumento significativo de la muerte de las células silenciadas con respecto a los controles luego de 3 días (A) y 7 días (B). Los valores son normalizados al control de muerte y presentados como el promedio  $\pm$  EEM de 3 tratamientos independientes. \*P < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001.

Para confirmar estos resultados se realizaron, adicionalmente, ensayos de MTT con las mismas condiciones experimentales que los ensayos de LDH. Brevemente, se cultivaron las células shControl y shGALC en medio de diferenciación, a las 48 horas se indujo el silenciamiento con 0.5  $\mu$ g/mL de TTC y tras 3 y 7 días de diferenciación, se realizaron los ensayos de viabilidad. En la Figura 10 se puede observar que efectivamente hay un descenso significativo en la actividad mitocondrial del 47 % luego de 3 días en cultivo (A), y del 67 %

luego de 7 días en cultivo (B), con respecto a las células que no se les indujo la inducción. Dicha disminución en la viabilidad celular también fue estadísticamente significativa ( $P < 0,001$ ) con respecto al control del silenciamiento, es decir, a las células shControl.

En general, hubo una ligera reducción en la viabilidad atribuible al tratamiento con TTC, que alcanzó a tener valores significativos en los experimentos de MTT a los 3 días de diferenciación (ver Figura 10, A), pero es radicalmente insignificante con respecto a los efectos deletéreos del silenciamiento del gen GALC; por tal razón, esa ligera tendencia no es tenida en cuenta como un factor determinante en los eventos de muerte celular encontrados.



**Figura 10.** Efecto del silenciamiento de GALC sobre la muerte celular. Ensayos de MTT que muestran una disminución significativa de la supervivencia en las células silenciadas con respecto a los controles luego de 3 días (A) y 7 días (B). Los valores son normalizados a los controles de silenciamiento (shControl), y de inducción (- TTC), y presentados como el promedio  $\pm$  EEM de 3 tratamientos independientes. \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ .

## 6.2. EFECTO DE LOS AGONISTAS DE PPARs E IGF SOBRE LA SUPERVIVENCIA CELULAR.

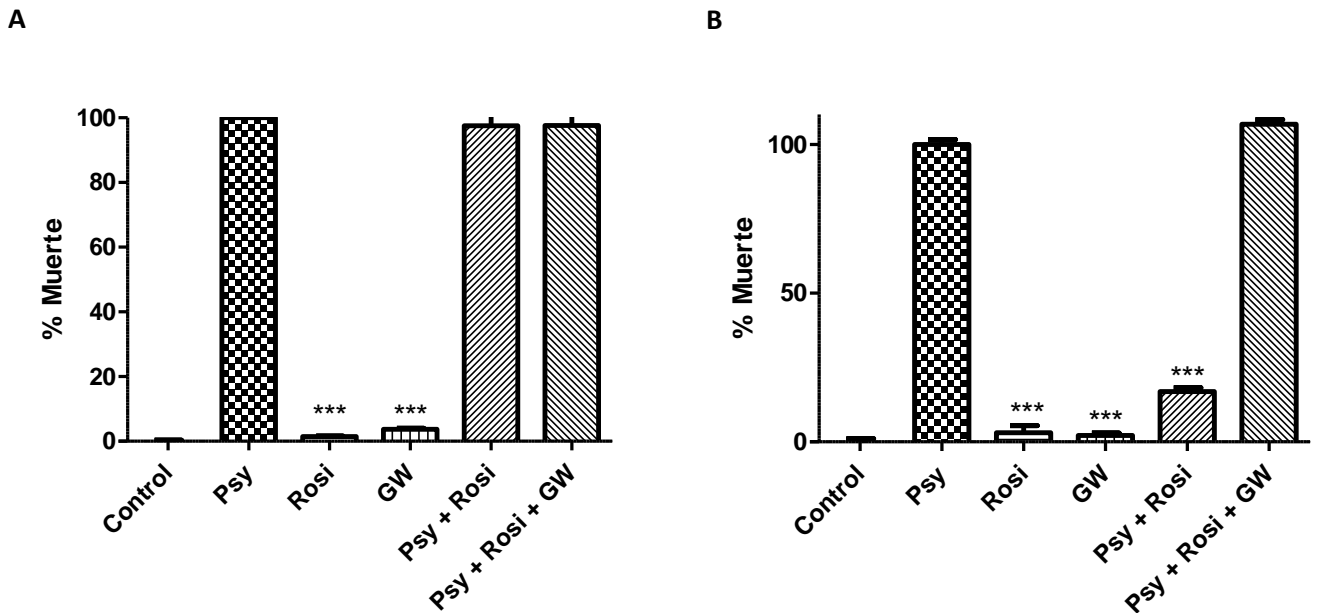
Una vez estandarizados los modelos celulares de la enfermedad de Krabbe se procedió a determinar el efecto de los agonistas de PPAR y del factor de crecimiento IGF-1 sobre la muerte celular generada por la aplicación (modelo exógeno) y acumulación (modelo endógeno) de psicovina en la línea celular oligodendroglial MO3.13. Para ello, se utilizaron los compuestos WY14346, que es un potente agonista de PPAR $\alpha$ ; GW0742, agonista de

PPAR $\beta/\delta$ ; y rosiglitazona, agonista de PPAR $\gamma$ . Se escogieron estos agonistas debido a su alta afinidad por los receptores correspondientes, por sus señaladas propiedades antiinflamatorias y pro-supervivencia (ver Tabla 1); y, teniendo en cuenta las características inflamatorias generadas por la activación de la microglia y la astrogliosis que se presentan en KD, es razonable esperar observar resultados más contundentes con ellos.

#### *6.2.1. Efecto de agonistas de PPARs sobre la supervivencia de células MO3.13 en el modelo exógeno de enfermedad de Krabbe.*

En primer lugar se evaluó el efecto de la rosiglitazona (agonista específico de PPAR $\gamma$ ) sobre la supervivencia de las células MO3.13 diferenciadas y tratadas con el esfingolípido psicosisina. Se realizaron tratamientos con 1 $\mu$ M de rosiglitazona durante 1 hora o 24 horas antes de aplicar la dosis de psicosisina (10 $\mu$ M). En adición, se evaluó el efecto de la aplicación de 10  $\mu$ M de GW9662, un potente antagonista de PPAR $\gamma$ , con el fin de atribuir los cambios observados en la supervivencia de las células MO3.13 a la activación de PPAR $\gamma$ , o al menos, a algún mecanismo molecular mediado por la rosiglitazona.

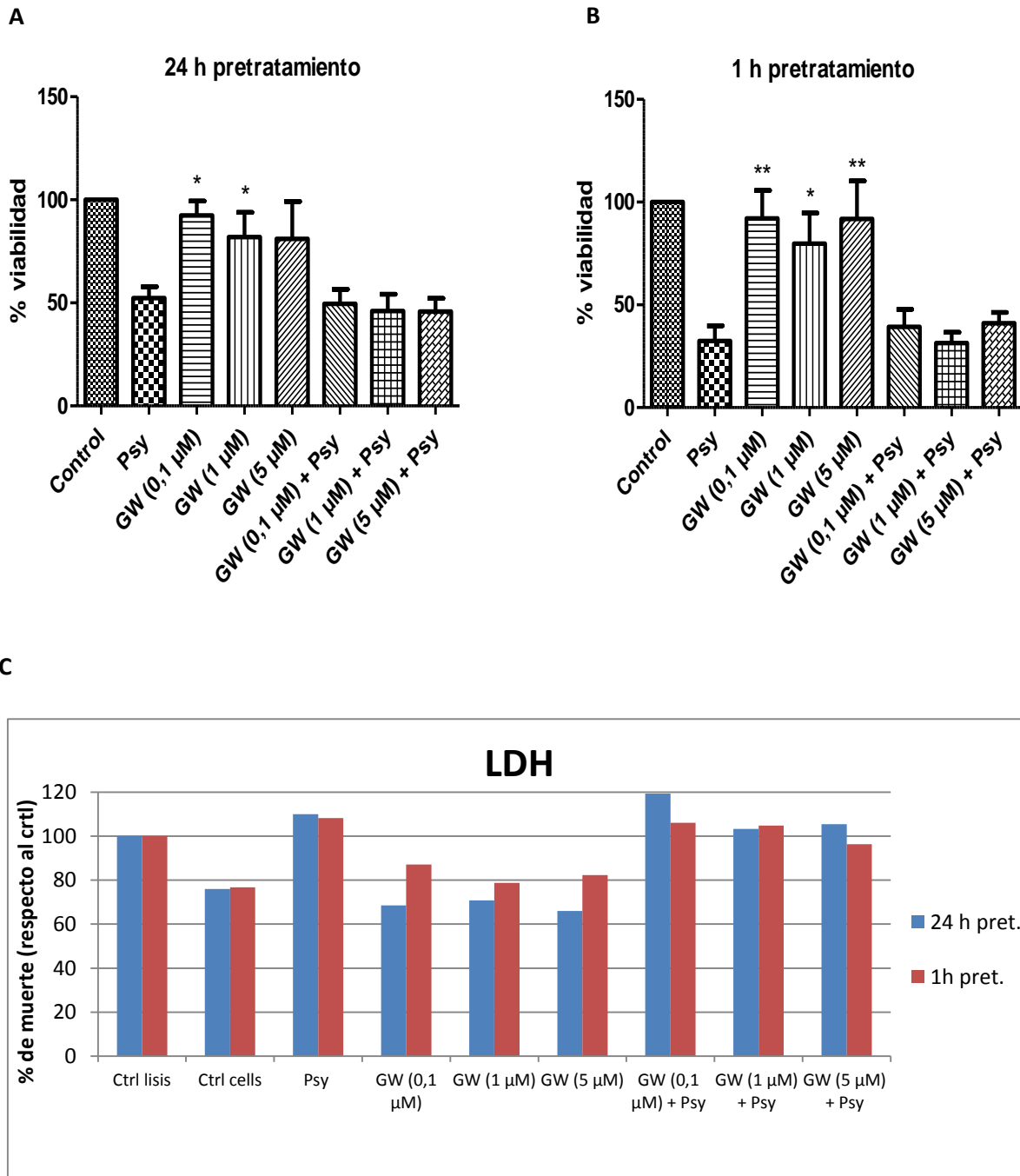
Los resultados de los ensayos de LDH muestran un claro efecto pro supervivencia de la rosiglitazona cuando es aplicada 1 h antes de poner la psicosisina (Figura 11). El pre tratamiento de 24 h no tuvo ningún efecto sobre la supervivencia de las células, ya que no se observa ninguna diferencia estadísticamente significativa con respecto a la aplicación de psicosisina sola (control de muerte). Más aún, estos resultados evidencian que el efecto favorable observado con el pre tratamiento de 1 hora es bloqueado por la acción del agonista GW9662, lo cual sugiere que dicho efecto es aplicable a la rosiglitazona. También se muestra que ni la rosiglitazona ni el antagonista GW9662 tuvieron un efecto significativo en la liberación de LDH cuando se aplicaron en solitario, pues no hay diferencias significativas con el control (células sin ningún tratamiento y sin psicosisina).



**Figura 11.** Ensayos de LDH que muestran la neuroprotección conferida por rosiglitazona. 24h pre-tratamiento de rosiglitazona 1 $\mu$ M (A) y 1h pre-tratamiento de rosiglitazona 1 $\mu$ M (B), en células diferenciadas por 72 h. Los valores son normalizados al control de muerte (psicosina 20  $\mu$ M) y presentados como el promedio  $\pm$  EEM de 3 tratamientos independientes. \*\*\*P < 0,001

Posteriormente se estudió el efecto del agonista de PPAR $\beta$ , GW0742. Para ello, se sembraron células MO3.13 diferenciadas por 72 horas, a una confluencia de 70% y, a continuación, se montaron 3 experimentos independientes en placas de 6 pozos con pre-tratamientos de 24 y 1 hora de 3 dosis diferentes del agonista (0.1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M y 5  $\mu$ M) (Figura 12). Una vez finalizados los tiempos de exposición en los experimentos, se realizaron ensayos de MTT (Figura 12, A) y LDH (Figura 12, B) para evaluar el impacto de los tratamientos sobre la supervivencia celular.

Los resultados muestran que, aunque la aplicación del agonista en todas las concentraciones probadas no tiene ningún efecto sobre la viabilidad celular respecto al control, la combinación con la psicosina no otorga ningún aumento significativo en la supervivencia de las células MO3.13, tanto con el pre-tratamiento de 24 h, como con el de 1h.



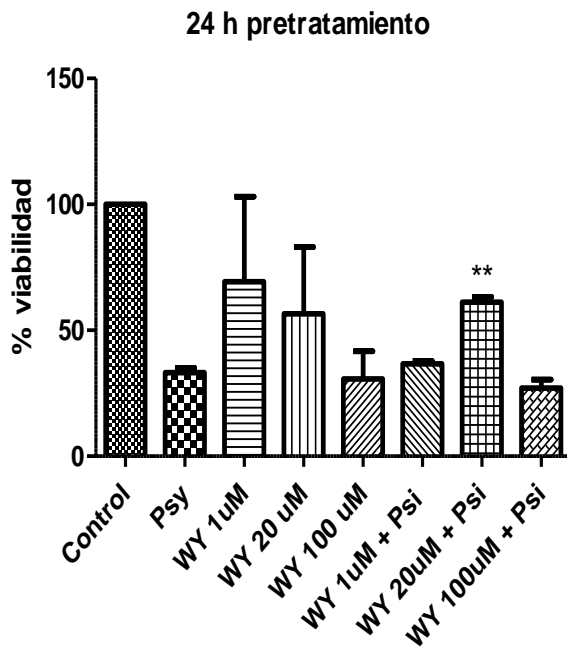
**Figura 12.** Ensayos de MTT (A y B) y LDH (C) que muestran el efecto de GW 0742 sobre la supervivencia en células MO3.13 diferenciadas por 72 h. Los valores son normalizados al control de muerte (psicosina 10 μM), y presentados como el promedio ± EEM de 3 tratamientos independientes. \*\*P < 0,01; \*P < 0,05

Consecuentemente, se repitieron los experimentos anteriores pero esta vez se evaluó el efecto de la aplicación del agonista de PPAR $\alpha$ , WY14643. Al igual que en el segmento anterior, en

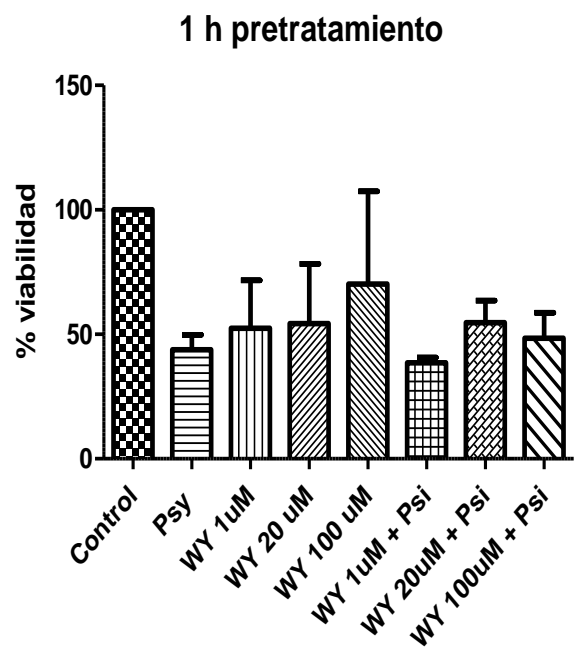
este caso se usaron 2 tiempos de tratamiento con el agonista, 24 y 1 hora, y se usaron 3 concentraciones diferentes del mismo (1  $\mu$ M, 20  $\mu$ M y 100  $\mu$ M). Es de aclarar que las concentraciones utilizadas fueron basadas en múltiples revisiones de literatura en las se usa un rango similar de concentraciones de los agonistas, tanto en células MO3.13, como en otros tipos celulares.

La Figura 13 muestra los resultados obtenidos de ensayos de MTT (A) y LDH (B) en donde se pudo determinar que el pretratamiento por 24 horas con WY14643 a una concentración de 20  $\mu$ M, en efecto recupera significativamente la viabilidad de las células MO3.13 luego de ser tratadas con 10  $\mu$ M de psicossina. De igual manera se pudo constatar que ninguno de los pre-tratamientos de 1 h con el agonista generó cambios significativos en la viabilidad celular pero, a diferencia de los tratamientos con GW0742, incluso la aplicación de los agonistas solos, sin psicossina, disminuyen la viabilidad celular.

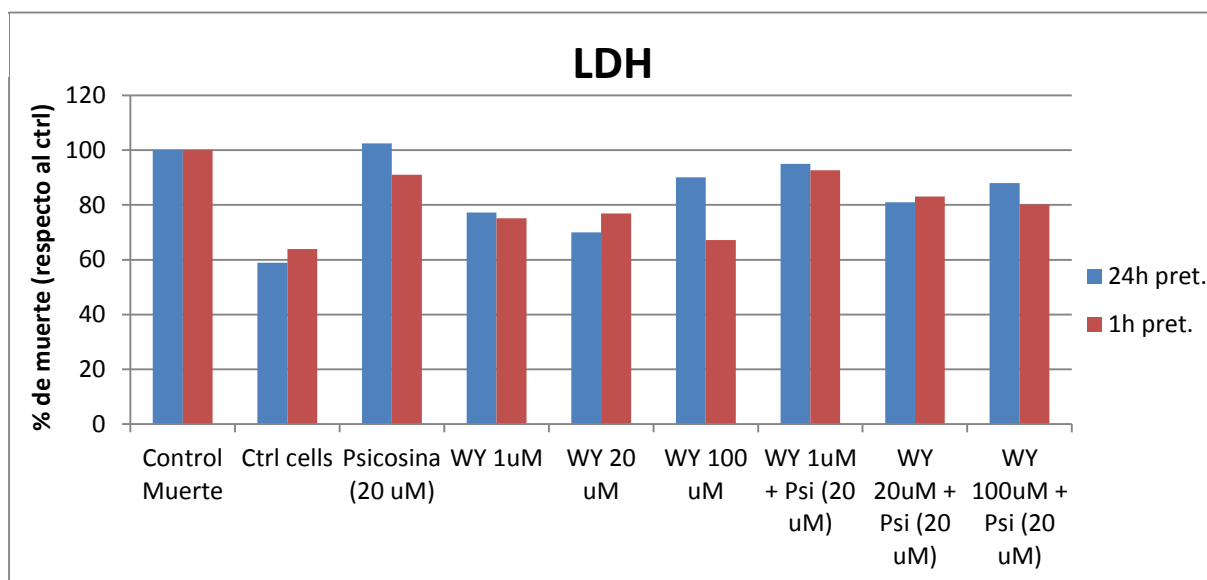
A



B



C



**Figura 13.** Ensayos de MTT (A y B) y LDH (C) que muestran el efecto de WY 14643 sobre la supervivencia en células MO3.13 diferenciadas por 72 h. Los valores son normalizados al control de muerte (psicosina 10  $\mu$ M), y presentados como el promedio  $\pm$  EEM de 3 tratamientos independientes. **\*\*P < 0,01**

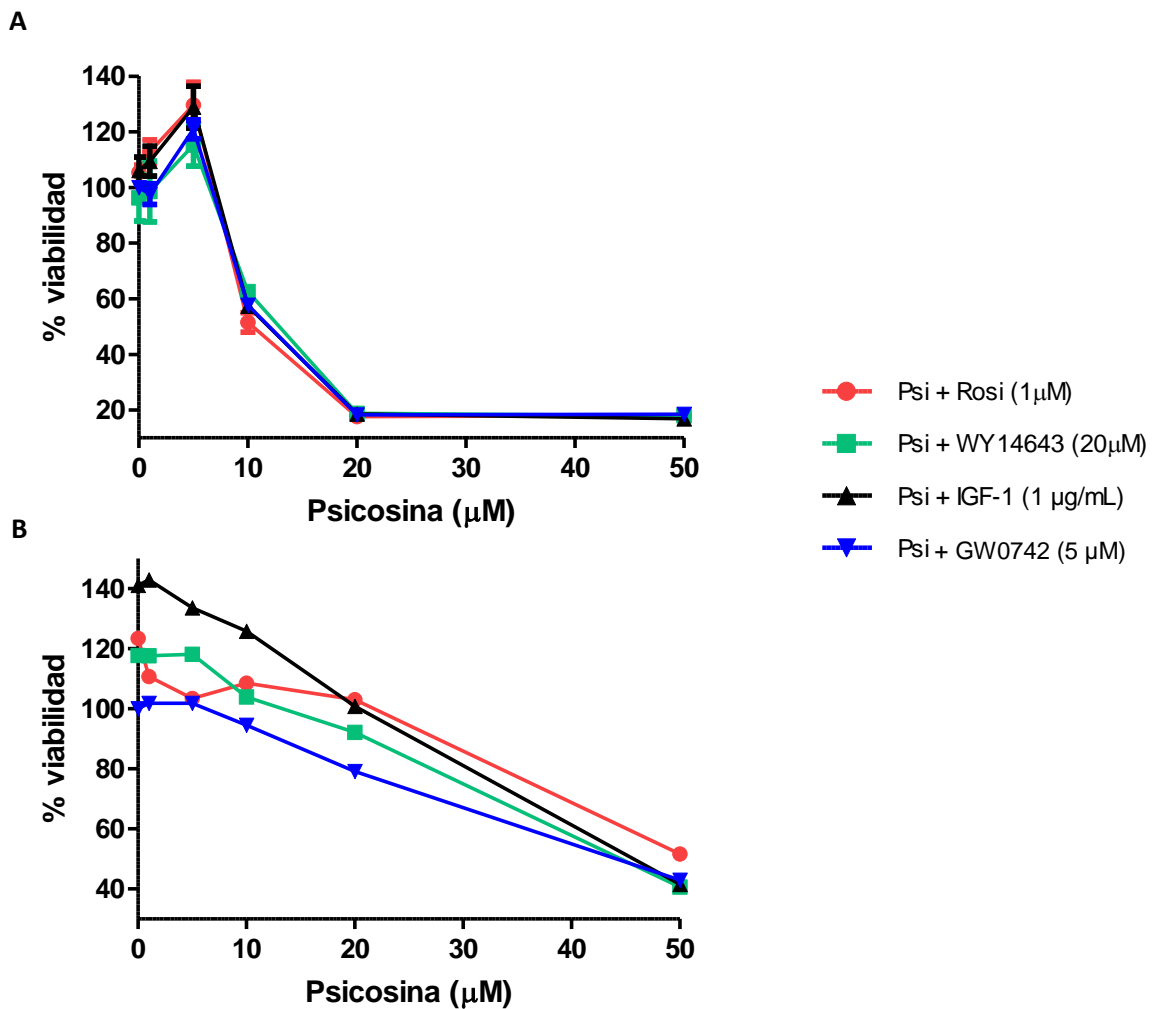
### 6.2.2. Efecto del factor de crecimiento IGF-1 sobre la supervivencia de células MO3.13 en el modelo exógeno de enfermedad de Krabbe.

De igual manera, se quiso evaluar el papel del factor de crecimiento IGF-1 sobre la viabilidad de las células MO3.13 tanto diferenciadas como no diferenciadas, y para ello se realizaron ensayos de MTT en los cuales se probaron diferentes dosis de psicosisina (5, 10, 20 y 50  $\mu$ M), además del pre-tratamiento por 24 horas de los agonistas rosiglitazona (1  $\mu$ M), WY14643 (20  $\mu$ M), GW0742 (5  $\mu$ M) y, por supuesto, IGF-1 (1  $\mu$ g/mL) (Figura 14).

Los resultados muestran un claro efecto de IGF-1 en la supervivencia celular cuando es aplicado en las células no diferenciadas, sin embargo, no se observó ningún efecto significativo en las células diferenciadas. A pesar de ello, se observa que en las células diferenciadas hay un aumento en la viabilidad celular cuando se aplican tratamientos con los agonistas de PPAR  $\alpha$  y  $\gamma$  (WY14643 y rosiglitazona, respectivamente) para todas las dosis



de psicossina, exceptuando las dosis más altas (20 y 50  $\mu\text{M}$ ); mientras que no se observa ningún efecto de éstos mismos fármacos cuando son aplicados a células no diferenciadas. Adicionalmente, se observa que la psicossina disminuye la viabilidad de las células diferenciadas de manera más drástica que en las células no diferenciadas, lo que sugiere que son las células maduras de oligodendrocitos son las que se ven más afectadas por la acción de psicossina.



**Figura 14.** Neuroprotección conferida por agonistas PPARs e IGF-1 en células MO3.13 diferenciadas (A) y no diferenciadas (B), frente a diferentes dosis de psicossina por 24h. Los valores son presentados como el promedio  $\pm$  EEM de 3 tratamientos independientes.

### *6.2.3. Efecto de la rosiglitazona y el factor de crecimiento IGF-1 sobre la supervivencia de células MO3.13 en el modelo endógeno de enfermedad de Krabbe.*

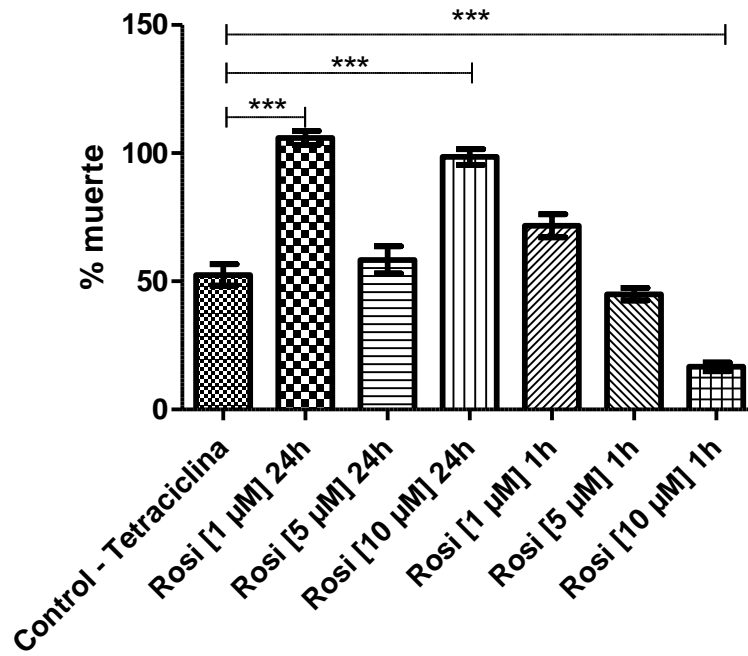
Teniendo en cuenta los resultados mencionados anteriormente, se quiso evaluar el efecto de la rosiglitazona y el factor de crecimiento IGF-1 sobre la supervivencia de las células silenciadas para el gen GALC (modelo endógeno de la enfermedad de Krabbe). Para tal fin, se realizó un experimento en el que se analizó el efecto de los tratamientos con diferentes concentraciones de rosiglitazona e IGF-1 a diferentes tiempos de exposición (Figura 15).

En primer lugar, se trataron las células con dosis ascendentes (1, 5 y 10  $\mu\text{M}$ ) de rosiglitazona por 24 o 1 hora antes de inducir el silenciamiento del gen GALC con tetraciclina (figura 15, A). Se realizaron ensayos de LDH y los resultados indican que el tratamiento con rosiglitazona por 24 horas a concentraciones equivalentes a 1 y 10  $\mu\text{M}$  aumentan significativamente la muerte producida por la acumulación de psicossina (ver control). La dosis de 5  $\mu\text{M}$  por 24 horas, así como las dosis de 1 y 5  $\mu\text{M}$  con el pre-tratamiento de 1 hora no tuvieron efecto alguno en la recuperación de la muerte causada por la psicossina y, en contraste, la dosis de 10  $\mu\text{M}$  por 1 hora aumentó significativamente la viabilidad celular. Esto discrepa un poco los resultados obtenidos con el modelo exógeno, en el cual se observó un efecto positivo con rosiglitazona con una dosis menor (1  $\mu\text{M}$ ) aplicándola por 1 hora antes de la psicossina.

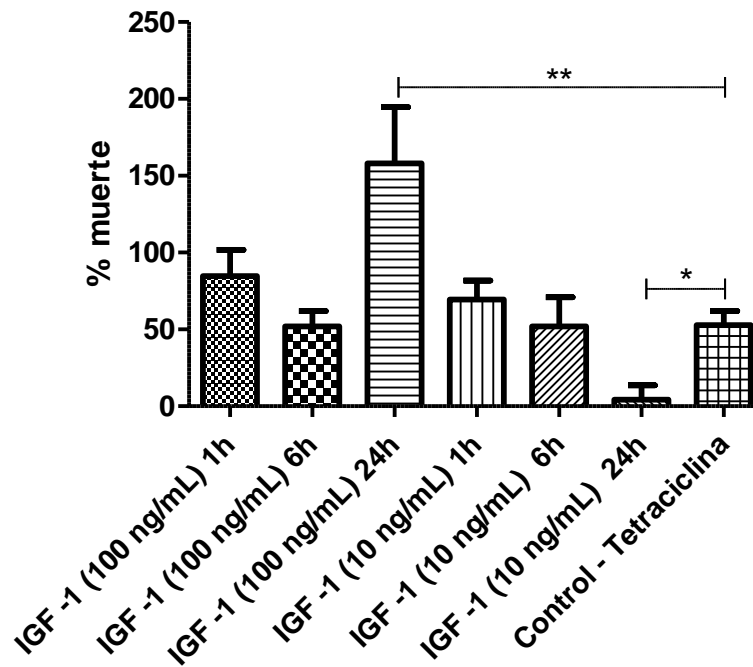
De manera similar, se realizaron ensayos de LDH para determinar el efecto de la aplicación de IGF-1 en el modelo con silenciamiento KD (Figura 15, B)). En este caso, usaron 3 tiempos diferentes de exposición al IGF-1 (1, 6 y 24 h), y se utilizaron 2 concentraciones diferentes, de nuevo, tomadas de la literatura (10 y 100 ng/mL).

En este caso, el resultado más sobresaliente que se obtuvo fue que al tratar por una hora las células, diferenciadas y silenciadas, con una dosis de 10 ng/mL de IGF-1 se logró reducir drástica y estadísticamente significativa la mortalidad causada por la acumulación de psicossina. Por el contrario, el pre-tratamiento de 24 h con 100 ng/mL de IGF-1 tuvo un efecto nocivo para las células, pues aumentó casi tres veces la muerte causada por la acumulación de psicossina por sí misma. En adición, se puede observar que los demás tratamientos, independientemente del tiempo o de la concentración, no tuvieron ningún efecto en la viabilidad celular de la línea MO3.13 silenciada.

A



B



**Figura 15.** Ensayos de LDH que muestran la disminución en el porcentaje de muerte celular producida por los tratamientos de rosiglitazona (10 µM – 1h) y por IGF-1 (10 ng – 24h) en células MO3.13 silenciadas para GALC. ). Los valores son presentados como el promedio ± EEM de 3 tratamientos independientes. \*\*\*P < 0,001; \*\*P<0,01; \*P<0,05.

### 6.3. EFECTO DE LOS AGONISTAS DE PPARs E IGF SOBRE LAS VÍAS DE SUPERVIVENCIA CELULAR PI3K/Akt Y Raf/MEK/ERK.

Una vez se estudió el papel de los agonistas de PPARs y del factor de crecimiento IGF-1 sobre la viabilidad o supervivencia celular, tanto en el modelo exógeno como en el modelo endógeno de KD, se procedió a analizar si dichos efectos se relacionaban directa o indirectamente con la activación de las principales vías pro-supervivencia y proliferación conocidas en este tipo celular (en principio, en todos los tipos celulares del sistema nervioso). Para ello, se analizaron los niveles de fosforilación de intermediarios críticos dentro de las vías PI3K/Akt y Raf/MEK/ERK mediante ensayos de western blot. La finalidad de estos experimentos fue, principalmente, observar si la aplicación de los fármacos estudiados tienen una incidencia en los niveles de fosforilación (estado de activación) de las mencionadas vías moleculares intracelulares, en ambos modelos estandarizados de la enfermedad, y de éste modo, poder discernir sobre posibles mecanismos de acción de los agonistas de PPARs e IGF-1 que permitan interpretar los resultados obtenidos previamente.

#### 6.3.1. *Acción de la rosiglitazona e IGF-1 sobre las vías de supervivencia celular PI3K/Akt y RAF/MEK/ERK en el modelo exógeno de KD.*

Inicialmente se estudiaron los niveles de fosforilación de Akt (Ser 473) en el modelo exógeno de la enfermedad, en estado basal y luego de aplicar diferentes dosis y tiempos de tratamiento de rosiglitazona e IGF-1 (Figura 16). En este sentido, se aplicó una dosis de rosiglitazona de 1  $\mu$ M, pues fue la que mayor efecto tuvo en éste modelo de la enfermedad, a dos tiempos diferentes, a saber, 24 y 1 hora antes de la aplicación de 10  $\mu$ M de psicossina por 24 horas. Adicionalmente, se realizaron ensayos con IGF-1 (100 ng/mL) por una hora previo tratamiento con 10  $\mu$ M de psicossina. Posteriormente se hizo la extracción de proteína de los diferentes ensayos y se analizó por western blot el estado de fosforilación de Akt.

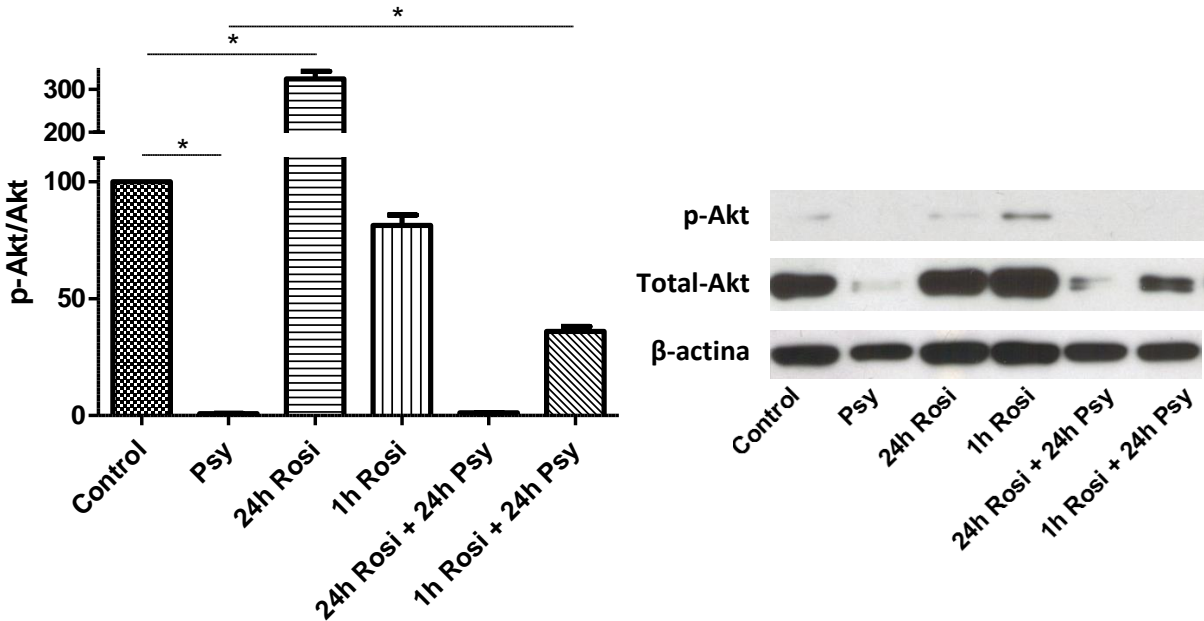
El análisis determinó un aumento significativo en la fosforilación de Akt cuando se aplicó rosiglitazona sola por 24 h, mientras que los ensayos con psicossina la disminuyó drásticamente, observándose una recuperación significativa de la fosforilación de Akt (Ser 473) con el tratamiento de 1h de rosiglitazona más psicossina 10  $\mu$ M. Por último, el

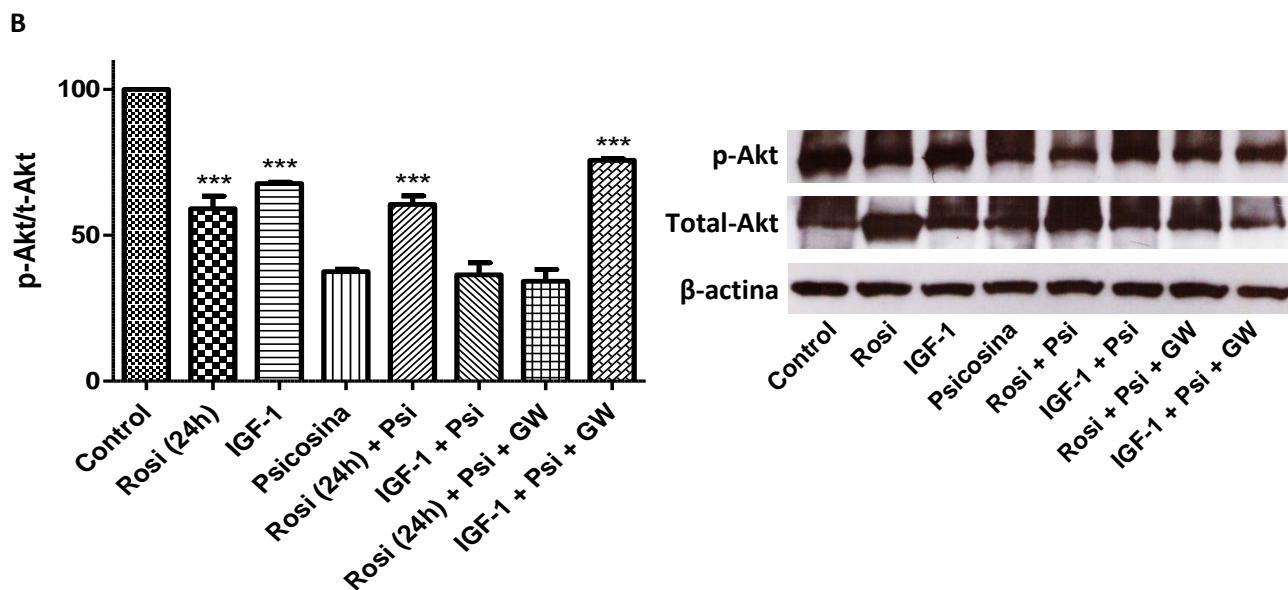
tratamiento de rosiglitazona sola por 1 h no tuvo efecto significativo con respecto al control (Figura 16, A). Los resultados corresponden a tres experimentos independientes.

Asimismo, los resultados obtenidos con los tratamientos con IGF-1 (Figura 16, B) muestran que, al igual que con los ensayos de rosiglitazona, la aplicación de 10  $\mu$ M de psicossina por 24 horas, independientemente de la combinación con cualquier tratamiento, genera una disminución estadísticamente significativa en los niveles de fosforilación de Akt, y el IGF-1 aplicado por sí sólo no parece afectar esta tendencia. Sin embargo, se observa un resultado interesante cuando se combina el tratamiento con IGF-1 y el antagonista de PPAR $\gamma$  (GW9662), pues de este modo se lograron recuperar casi por completo los niveles de fosforilación de Akt, del mismo modo que se había observado con rosiglitazona.

Estos resultados, en conjunto, parecen evidenciar una relación entre la protección conferida por rosiglitazona e IGF-1, y el estado de activación de la vía de supervivencia PI3K/Akt.

A





**Figura 16.** Efecto de rosiglitazona (A) e IGF-1 (B) sobre los niveles de fosforilación de Akt (Ser 473) en células MO3.13 diferenciadas expuestas a psicosisina 10  $\mu$ M por 24h. Los valores son normalizados con respecto al control, y presentados como el promedio  $\pm$  EEM de 3 tratamientos independientes. \*\*\* $P < 0,001$ .

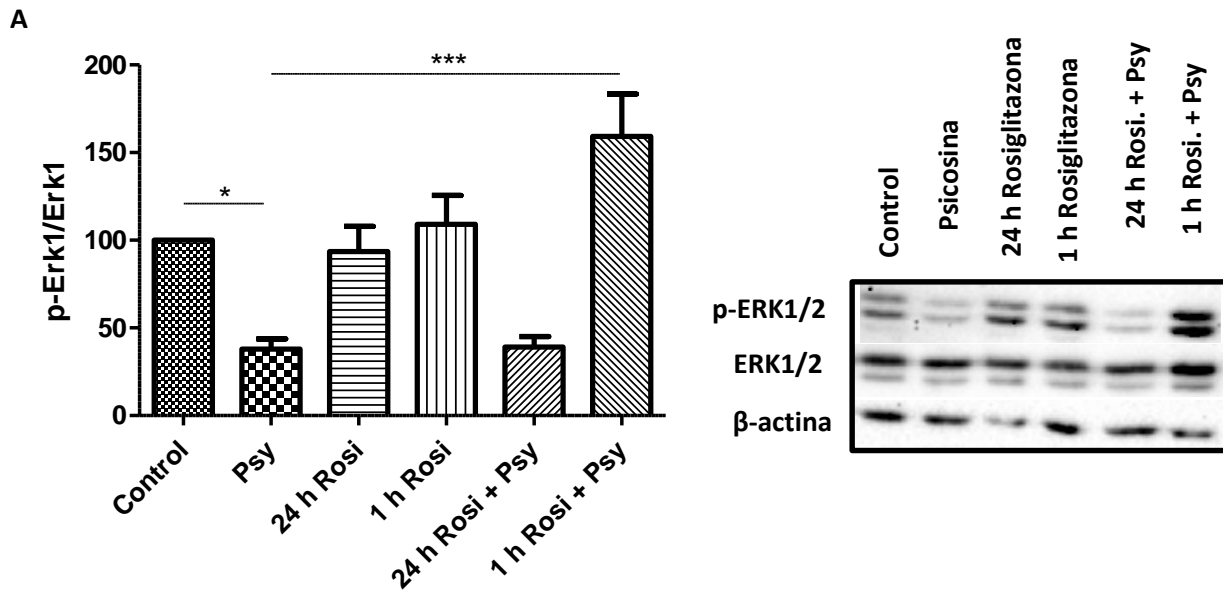
Teniendo en cuenta los resultados anteriores, y de acuerdo con el efecto, principalmente mediado por la rosiglitazona, sobre los niveles de fosforilación de Akt, de la misma manera se evaluó el papel de este fármaco sobre los niveles de fosforilación de otra importante cascada de señalización celular cuyo fin es primordialmente proliferativo, la vía conocida como Raf/MEK/ERK o de las MAP cinasas.

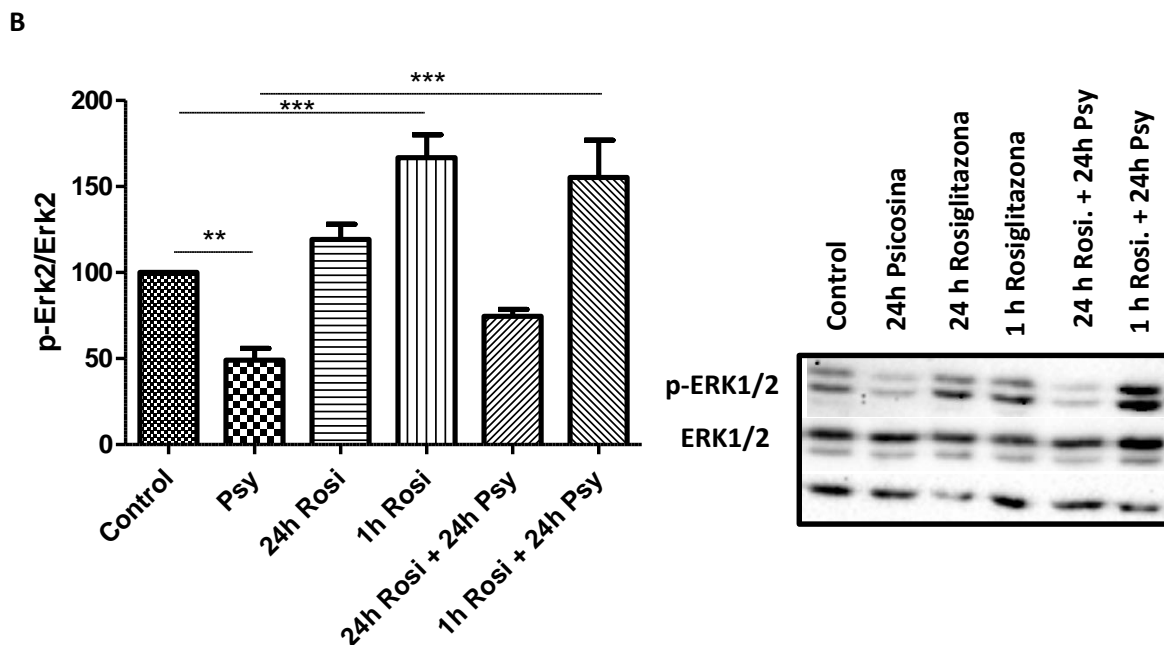
En este caso se probaron diferentes tiempos de tratamiento (1 y 24 h) con 1  $\mu$ M de rosiglitazona con o sin la aplicación de psicosisina (10  $\mu$ M), y posteriormente se estimaron los niveles de fosforilación de ERK1/2 como indicador del estado de activación de la vía Raf/MEK/ERK, todo esto con el fin de explorar una posible conexión entre el efecto observado de este agonista de PPAR $\gamma$  con esta vía de señalización.

La Figura 17 muestra el efecto de psicosisina (10  $\mu$ M), y de los pretratamientos (1h y 24h) con rosiglitazona (1  $\mu$ M), sobre los niveles de p-Erk1 (Figura 17, A). Se observa que la psicosisina disminuye los niveles de p-Erk1, y los tratamientos con rosiglitazona (1h y 24h), y de rosiglitazona (1h) combinada con psicosisina, recuperan los niveles de p-Erk1, respecto al

control y que, de hecho, éste último tratamiento incrementa significativamente los valores de ERK1 fosforilado, resultados que sugieren un posible mecanismo que justifica los resultados obtenidos anteriormente en relación con el aumento en la supervivencia celular por la acción de la rosiglitazona.

A la par, en la Figura 17 B, se observa el efecto de psicossina (10  $\mu$ M), y de los pretratamientos (1h y 24h) con rosiglitazona (1  $\mu$ M), sobre los niveles de p-Erk2. Al igual que en el caso de p-Erk1, se ve que la psicossina disminuye, significativamente, los niveles de p-Erk2, y los tratamientos con rosiglitazona (1h y 24h), y de rosiglitazona (1h) combinada con psicossina, recuperan los niveles de p-Erk2, respecto al control.





**Figura 17.** Western blot que muestra el efecto de rosiglitazona sobre los niveles de fosforilación de ERK1 (A) y ERK2 (B) en células MO3.13 diferenciadas expuestas a psicosisina 10  $\mu$ M por 24h. Los paneles a la derecha presentan imágenes representativas del western blot. Los valores son normalizados con respecto al control, y presentados como el promedio  $\pm$  EEM de 3 tratamientos independientes. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$  \*\*\* $P < 0,001$ .

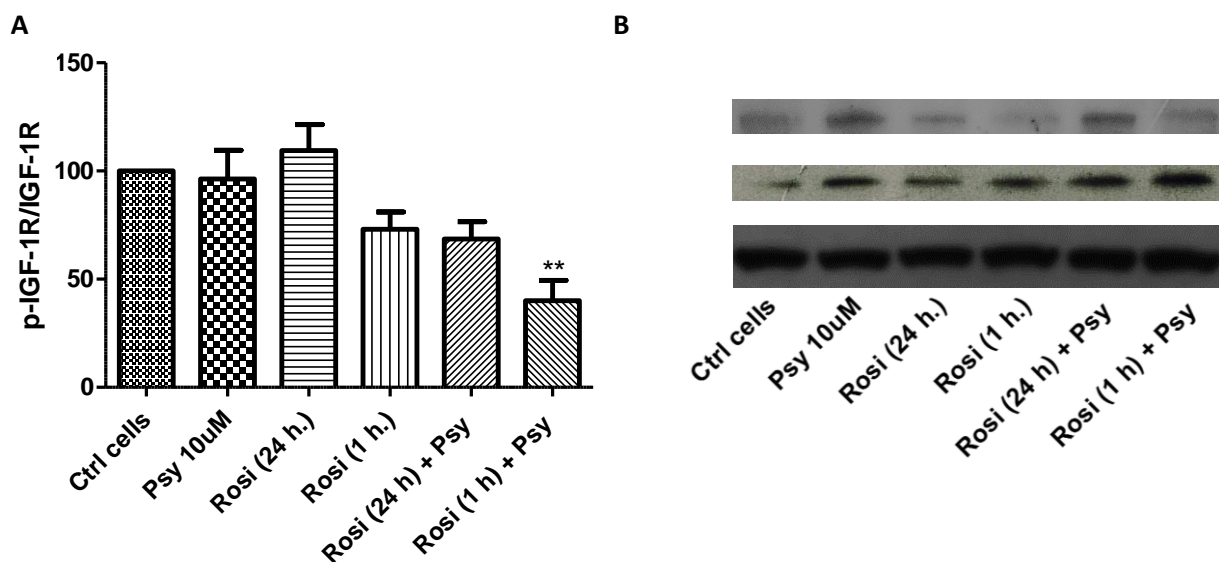
### 6.3.2. Efecto de rosiglitazona sobre la activación del receptor de IGF-1 en células MO3.13.

Previamente, se demostró que el pre-tratamiento con rosiglitazona por 1h evitaba la pérdida drástica de la fosforilación de Akt (Ser 473) causada por la psicosisina. Conjuntamente se observó que hay alguna interacción entre IGF-1 y rosiglitazona, o al menos con las vías relacionadas con ella, pues se encontró que al aplicar el antagonista de PPAR- $\gamma$  se potencia el efecto de IGF-1 sobre la activación de vías de supervivencia y/o proliferación celular. Entonces, el propósito de este experimento es demostrar si este hallazgo está relacionado con la activación del receptor de IGF-1, el cual se encuentra corriente arriba de Akt.

Los resultados derivados sugieren que la regulación positiva de la fosforilación de Akt (Ser473) en presencia de psicosisina por parte de la rosiglitazona puede estar afectada por la activación del receptor IGF-1, de manera que los mecanismos moleculares que generan la respuesta observada parecen estar directamente relacionados (Figura 18). Esta aseveración



se puede realizar gracias a que se observó que la aplicación de rosiglitazona por 1 h pre-tratamiento con psicossina disminuye significativamente los niveles del receptor IGF-1R fosforilado.

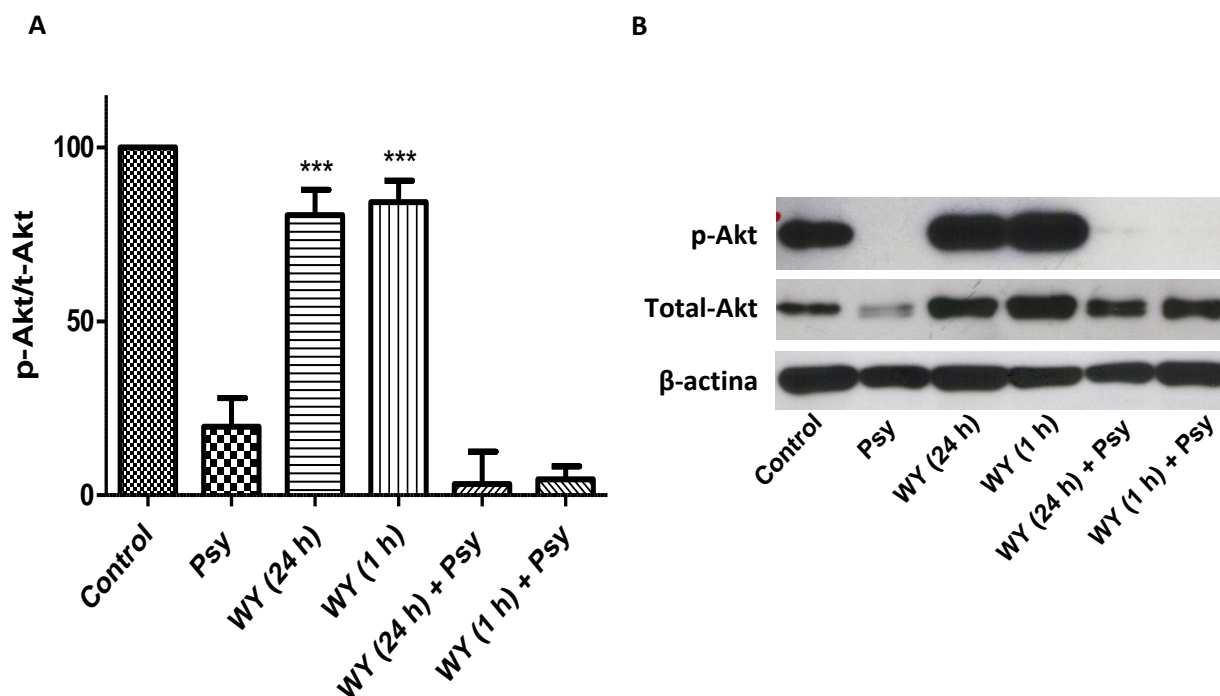


**Figura 18.** Efecto de la rosiglitazona sobre la activación del receptor IGF-1 en células MO3.13 diferenciadas y expuestas a psicossina 10uM por 24h. Los valores son normalizados con respecto al control, y presentados como el promedio  $\pm$  EEM de 3 tratamientos independientes. \*\*P < 0,01.

### 6.3.3. Acción de WY14643 sobre las vías de supervivencia celular PI3K/Akt en el modelo exógeno de KD.

Al igual que en las secciones anteriores, se analizaron los niveles de fosforilación de Akt, pero en este caso en respuesta a los tratamientos con el agonista de PPAR $\alpha$ , WY14643. El procedimiento experimental fue análogo a los mencionados anteriormente, brevemente, se montaron 3 experimentos independientes en los que se ensayaban dos tiempos diferentes de exposición al agonista (20  $\mu$ M) con y sin la aplicación de psicossina (10  $\mu$ M). Subsiguientemente, se analizaron los niveles de p-Akt por medio de western blot y se compararon los diferentes tratamientos con el propósito de encontrar relaciones entre los resultados de supervivencia previamente obtenidos y la activación de la vía de supervivencia respectiva.

La figura 19 muestra que la aplicación de pretratamientos de 1h y 24h del agonista de PPAR $\alpha$ , por sí mismo no tiene ningún efecto sobre los niveles de fosforilación de Akt, por el contrario, al aplicarlos junto con la psicossina, disminuyen aún más los niveles de p-Akt, sugiriendo que no hay una relación directa entre la tenue respuesta pro-supervivencia de este agonista y la activación de la vía de señalización predicha.

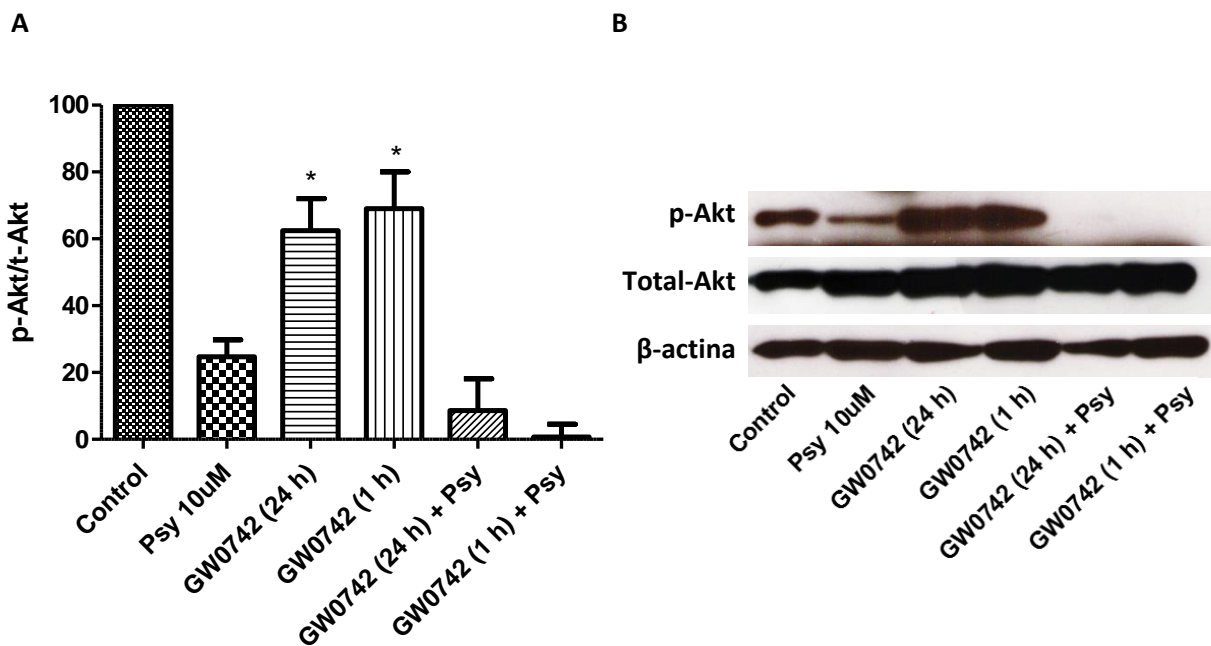


**Figura 19.** Efecto de WY14643 (A) sobre los niveles de fosforilación de Akt (Ser 473) en células MO3.13 diferenciadas expuestas a psicossina 10  $\mu$ M por 24h. (B), imagen representativa del western blot. Los valores son normalizados con respecto al control, y presentados como el promedio  $\pm$  EEM de 3 tratamientos independientes. \*\*\*P < 0,001.

#### 6.3.4. Acción de GW0742 sobre las vías de supervivencia celular PI3K/Akt en el modelo exógeno de KD.

De la misma manera se procedió a analizar el efecto del agonista de PPAR $\beta$ , GW0742 en relación con los niveles de p-Akt. Siguiendo con la metodología propuesta, se verificó por medio de western blot el estado de activación de la vía PI3K/Akt.

En la figura 20 se advierte un efecto similar al observado con el agonista de PPAR $\alpha$ , en el que la aplicación de pre-tratamientos de 1h y 24h del agonista de PPAR $\beta$  disminuye los niveles de fosforilación de Akt y, al aplicarlos junto con la psicossina, disminuyen aún más los niveles de p-Akt, con respecto al control. En este caso es de resaltar que al no evidenciarse ningún efecto positivo en cuanto a viabilidad celular por parte de este agonista, era de esperarse que los niveles de p-Akt no se vieran aumentados como consecuencia de la aplicación de GW0742.



**Figura 20.** Efecto de GW0742 (A) sobre los niveles de fosforilación de Akt (Ser 473) en células MO3.13 diferenciadas expuestas a psicossina 10  $\mu$ M por 24h. (B), imagen representativa del western blot. Los valores son normalizados con respecto al control, y presentados como el promedio  $\pm$  EEM de 3 tratamientos independientes. \*P < 0,05.

### 6.3.5. Acción de la rosiglitazona e IGF-1 sobre las vías de supervivencia celular PI3K/Akt y RAF/MEK/ERK en el modelo endógeno de KD.

Consecuentemente con los experimentos realizados en el modelo exógeno de KD, y de acuerdo con los resultados obtenidos y ressaltados anteriormente, se diseñaron diferentes ensayos en los que se pretendió estudiar la activación de las vías PI3K/Akt y

RAF/MEK/ERK, pero ahora usando el modelo endógeno obtenido con el fin de darle un curso más natural/realista a la serie de eventos asociados con la muerte y eventual neuroprotección conferida por los agonistas de PPAR e IGF-1.

En este sentido, se procedió con los siguientes experimentos:

Primeramente se investigaron los niveles de Akt fosforilado en respuesta a tratamientos con rosiglitazona (1  $\mu$ M, 1 y 24 horas de pre-tratamiento) e IGF-1 (10 ng/mL, 1 hora de pre-tratamiento) en células silenciadas para el gen GALC (shGALC) y en el respectivo control sin silenciamiento (Figura 21). En detalle:

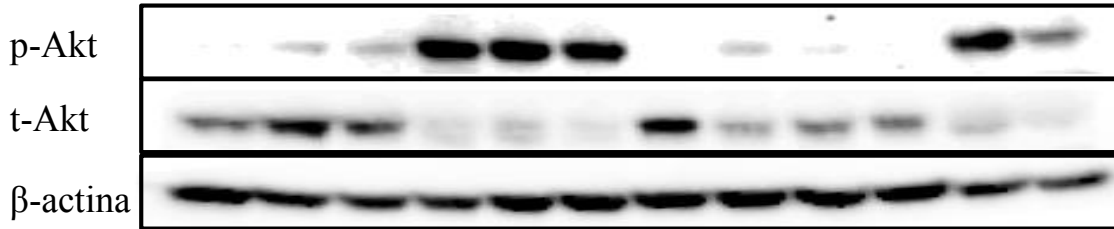
Para cada uno de los agonistas se siembran 3 placas de 6 pozos con células shCtrl y 3 cajas de 6 pozos con células shGALC (500000 células/pozo), en medio de diferenciación. A las 48 horas en medio de diferenciación se induce el silenciamiento con Doxiciclina (0.5  $\mu$ g/mL). A las 72h en medio de diferenciación, es decir, al día siguiente de la inducción, se agrega el pretratamiento de 24h con el agonista. 23h después se ponen los pretratamientos de 1h con agonistas y el IGF-1. Una hora después haces la extracción de proteína y se procede a hacer los experimentos de western blot.

La figura 21 indica los niveles de p-Akt en células MO3.13 diferenciadas por 72 horas y silenciadas para el gen GALC. Allí se pueden observar, al lado izquierdo, los tratamientos con rosiglitazona e IGF-1 en las células control (es decir, transfectadas pero sin silenciamiento de GALC), y en el lado derecho los mismos tratamientos pero con las células silenciadas. Conforme a los experimentos anteriores, la gráfica corresponde a tres repeticiones independientes.

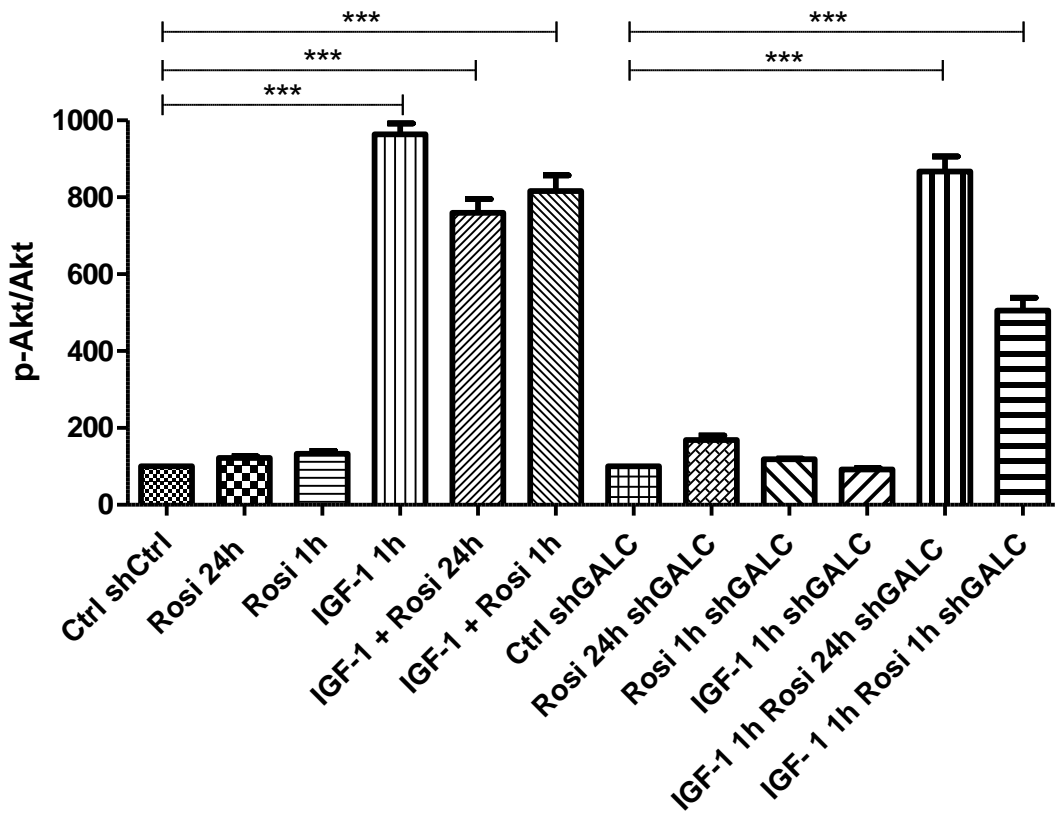
Como se puede observar en esta figura, en las células control los niveles de Akt fosforilado (Ser 473) son elevados ampliamente por todos los tratamientos con IGF-1, incluidos los que son combinados con pretratamientos de 1 y 24 horas de rosiglitazona (1  $\mu$ M), mientras que en las células silenciadas, el p-Akt aumenta significativamente sólo en los tratamientos combinados con ambos fármacos, el IGF.1 por sí mismo no parece tener un efecto en los niveles de fosforilación de esta vía de señalización. También, la rosiglitazona sola, en ambos tiempos de tratamiento, parecen ser inocuas para los niveles de p-Akt en este modelo

endógeno de KD. Esto difiere enormemente de los resultados observados en el modelo exógeno, en el que la psicossina era aplicada directamente sobre el medio de cultivo.

A

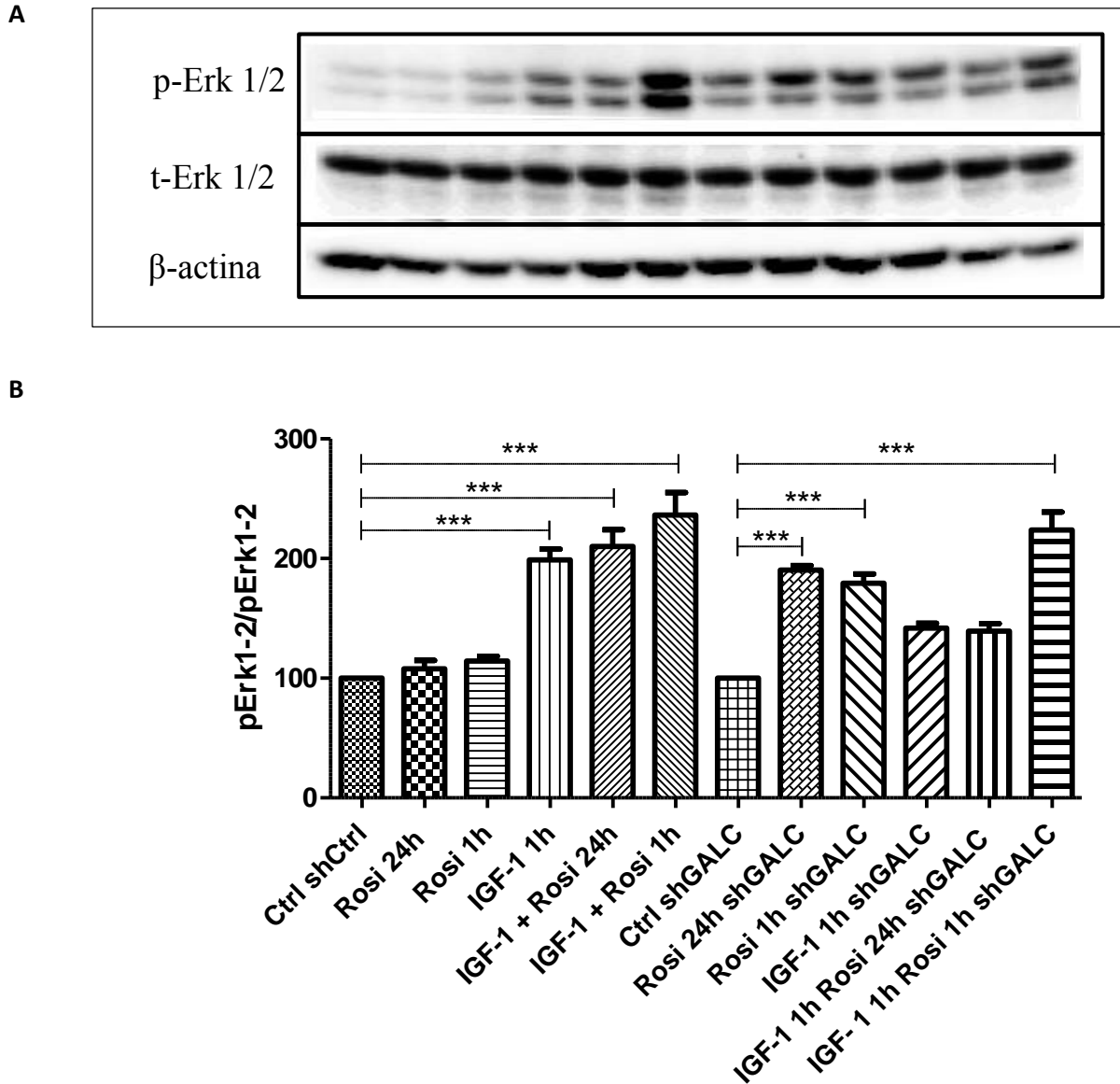


B



**Figura 21.** Efecto de rosiglitazona (1  $\mu$ M) (A) e IGF-1 (100 nM) (B) sobre los niveles de fosforilación de Akt (Ser 473) en células MO3.13 silenciadas para GALC. Los valores son presentados como el promedio  $\pm$  EEM de 3 tratamientos independientes. \*\*\* $P < 0,001$ .

De manera similar a lo anterior, se evaluó el papel del agonista rosiglitazona y el factor de crecimiento IGF-1 sobre la activación de la vía de las MAP cinasas, determinando los niveles de fosforilación de ERK1/2 con el fin de asociarlos a los resultados pro-supervivencia observados preliminarmente (Figura 22).



**Figura 22.** Efecto de rosiglitazona (1  $\mu$ M) (A) e IGF-1 (100 nM) (B) sobre los niveles de fosforilación de ERK1/2 en células MO3.13 silenciadas para GALC. ). Los valores son presentados como el promedio  $\pm$  EEM de 3 tratamientos independientes. \*\*\*P < 0,001.

Como se puede ver en esta figura, como era de esperarse y de manera muy semejante a los resultados con p-Akt, la aplicación de IGF-1 sólo o con rosiglitazona (1 y 24 h) aumenta significativamente los niveles de pERK1/2 en las células control, no obstante, en las células silenciadas se ven evidentes diferencias entre esta vía y la vía de Akt.

En primer lugar, se puede advertir que hay un aumento respecto al control en los niveles de p-ERK1/2 con todos los tratamientos ensayados, incluyendo los tratamientos en solitario de rosiglitazona con ambos tiempos. Además, se destaca que estos valores son muy superiores cuando se hace el tratamiento combinado de IGF-1 (100 ng/mL) con una hora de pre-exposición con rosiglitazona (1  $\mu$ M), lo que sugiere que este mecanismo puede estar asociado con el aumento en la viabilidad celular observado en el capítulo anterior. Es importante destacar, conjuntamente, que los resultados obtenidos con rosiglitazona en el modelo exógeno son muy similares a los obtenidos en este modelo endógeno en cuanto a la respuesta observada en la vía RAF/MEK/ERK, soportando aún más la idea de un mecanismo asociado entre la supervivencia y la activación de esta vía en particular con la aplicación de este agonista y de IGF-1.

#### 6.4. DISTRIBUCIÓN Y MOVILIZACIÓN VESICULAR DE LA PSICOSINA EN EL SISTEMA NERVIOSO

Para hacer una aproximación a la forma como se distribuye la psicosisina en el sistema nervioso, fenómeno que está ampliamente relacionado con la patogenia y progresión de la enfermedad, se utilizó el modelo murino de la enfermedad, el ratón Twitcher. Se tomaron cerebros completos de ratones (Twitcher y wild type (WT)), a diferentes edades y se realizó un procedimiento de fraccionamiento subcelular por medio de centrifugación diferencial y a cada fracción vesicular obtenida se le determinó la cantidad de psicosisina acumulada. Posteriormente se extrajeron nervios periféricos mielinizados (nervio ciático y braquial), y no mielinizados (nervio vago), y se estableció la cantidad de psicosisina presente en cada sección del nervio, ya sea en la parte proximal, medial o distal. Con los resultados obtenidos se propuso un modelo de distribución de la psicosisina en el sistema nervioso central y periférico, y se buscó establecer una conexión con los resultados obtenidos con los modelos celulares.

Esta parte de la investigación fue realizada en el Departamento de Anatomía y Biología Celular del Colegio de Medicina de la Universidad de Illinois en Chicago, bajo la supervisión del Dr. Ernesto Bongarzone, y tuvo la participación de los investigadores: Marta B. Santos, Ludovico Cantuti Castelvetri y Amy Hebert.

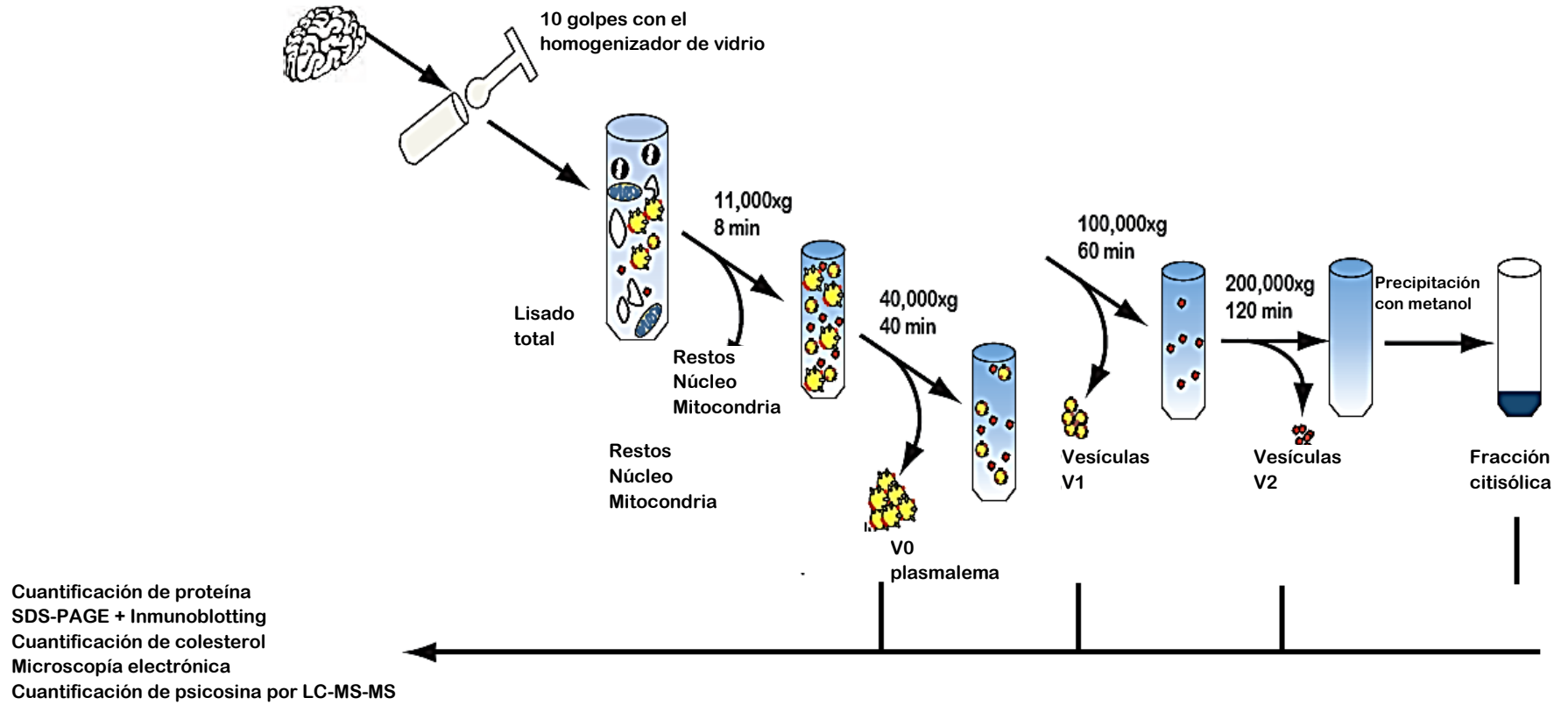
#### *6.4.1. Fraccionamiento subcelular del tejido cerebral de ratones Twitcher y WT*

Se realizó el fraccionamiento vesicular usando el protocolo previamente descrito por Morfini, et al., (2004) (124), de acuerdo a la Figura 23. En detalle, cerebros de ratones Twitcher y WT fueron colectados en los días posnatales 7, 15 y 30 (P7, P15 y P30) (n=4 por grupo) y homogenizados en buffer de lisis con inhibidores de proteasas y fosfatasas. Subsiguientemente, fueron sometidos a ultracentrifugación de pasos sucesivos en la que se obtuvieron las fracciones V0, que corresponde con el plasmalema; V1, correspondiente a vesículas; V2 que está conformada por vesículas más pequeñas que la fracción V1; y citosol. Esta centrifugación siguió el siguiente protocolo:

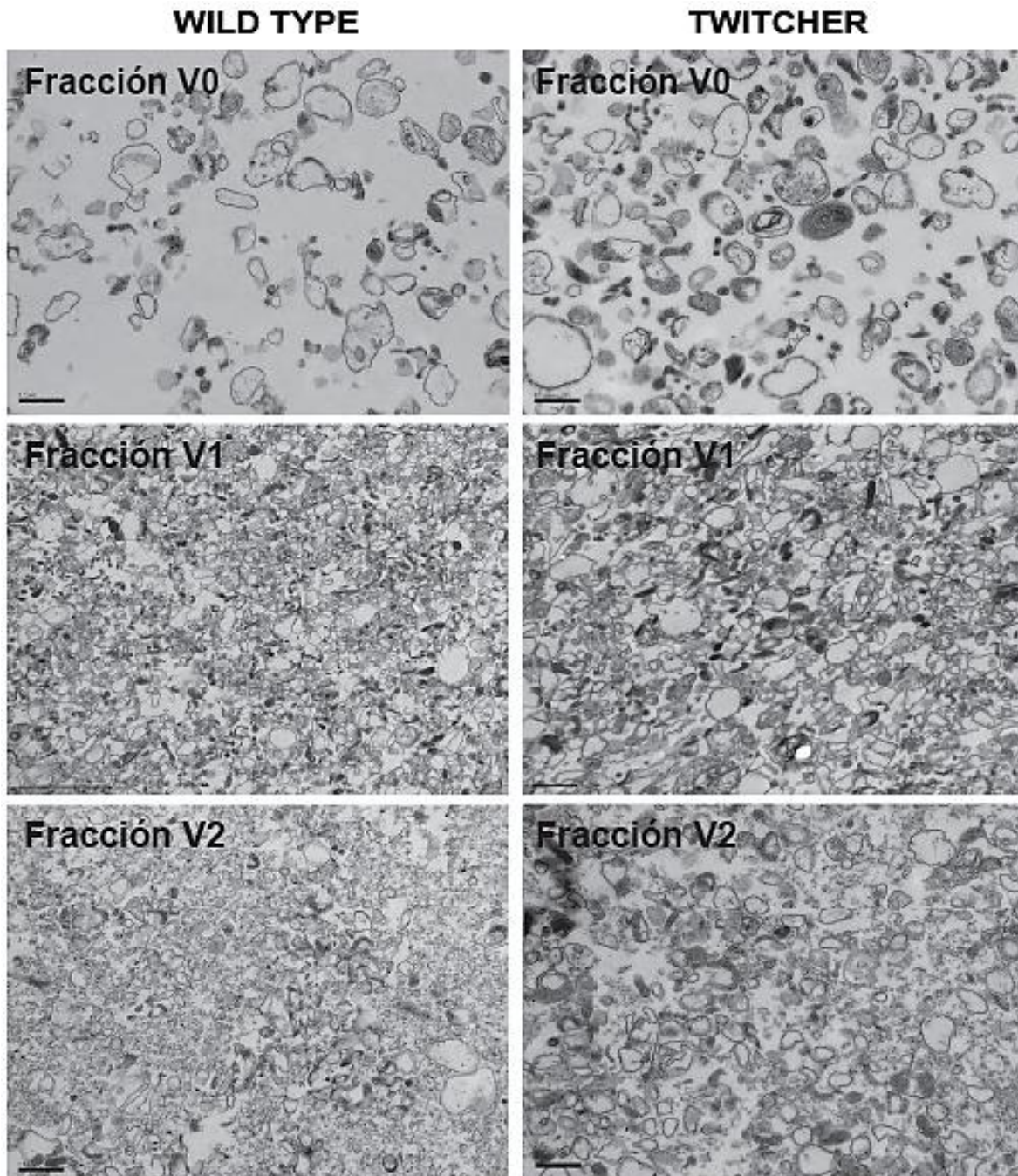
Inicialmente se realizó una centrifugación por 8 minutos a 11000 xg, seguida por una centrifugación de 40 minutos a 40000 xg. El siguiente paso fue por una hora a 100000 xg y, por último, se realizó una centrifugación durante 2 horas a 200000 xg. Finalmente se hizo la centrifugación de las proteínas restantes con metanol y se almacenó la última porción que corresponde a remanentes del citosol.

El control de calidad de cada fracción se realizó mediante microscopía electrónica (Figura 24), analizando las imágenes de las fracciones subcelulares obtenidas de ratones Twitcher (Figura 24, panel derecho) y WT (Figura 24, panel izquierdo). En la fracción V0 se observan grandes porciones irregulares de membrana que pertenecen al plasmalema; la fracción V1 está conformada por porciones vacuolares membranosas de tamaño considerablemente grande similares a los observados en V0, pero con una forma más regular. En la porción V2 se identifican vesículas mucho más pequeñas que las vistas en V1 que representan los pequeños cargos transportados por los motores proteicos axonales y por tipos de cargo, como vesículas recicladas, proteínas y/o metabolitos empaquetados.





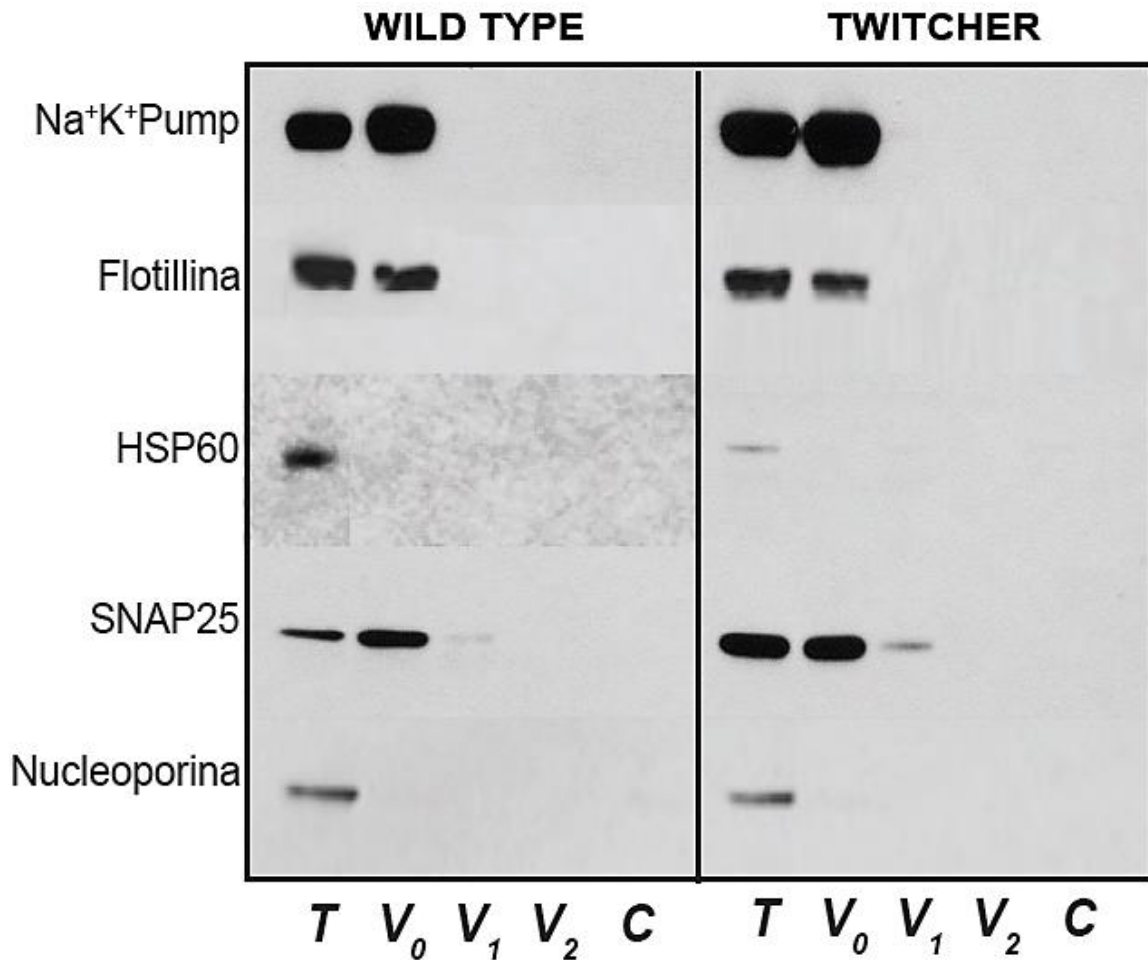
**Figura 23.** Esquema que representa el procedimiento de fraccionamiento celular de tejido cerebral en ratones Twitcher y WT.



**Figura 24.** Control de calidad de las fracciones vesiculares. Microscopía electrónica de transmisión mostrando la ultraestructura de los elementos que componen las fracciones vesiculares V0, V1 y V2.

Una vez separadas cada una de las fracciones vesiculares, estas fueron caracterizadas molecularmente mediante el uso de anticuerpos específicos para componentes de la mitocondria (HSP60), el núcleo (nucleoporina), membrana celular (flotillina) y membrana

vesicular (SNAP25), con el fin de identificar inequívocamente la naturaleza constitutiva de cada fracción. En la figura 25 se muestran imágenes representativas de western blots en el que se observa la diferente composición de cada una de las fracciones. Allí se pueden evidenciar las propiedades vesiculares de V1. Aunque no se identificaron componentes vesiculares en la fracción V2, por la morfología observada en el microscopio electrónico, se asume que es de naturaleza vesicular.

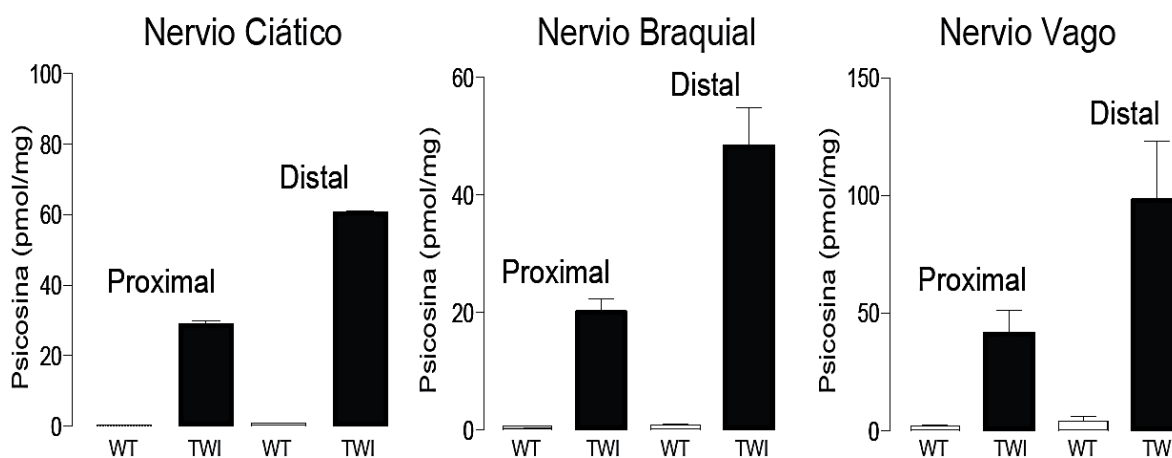


**Figura 25.** Caracterización molecular de las fracciones subcelulares mediante western blot.

#### 6.4.2. Patrón de acumulación de la psicosis en el sistema nervioso de ratones Twitcher y WT

Para determinar el patrón de acumulación de la psicosis en el sistema nervioso de los ratones Twitcher y WT, y así tener una idea sobre su mecanismo de su transporte y distribución, se

disectaron diferentes nervios mielinizados (nervio ciático y nervio braquial) y nervios no mielinizados (nervio vago), de ratones Twitcher y WT P35-40, se dividieron en las regiones proximal (cerca de la médula) y distal (cerca del punto de inervación) y se cuantificaron los niveles de psicovina mediante LC.MS-MS, según como se muestra en la Figura 26.



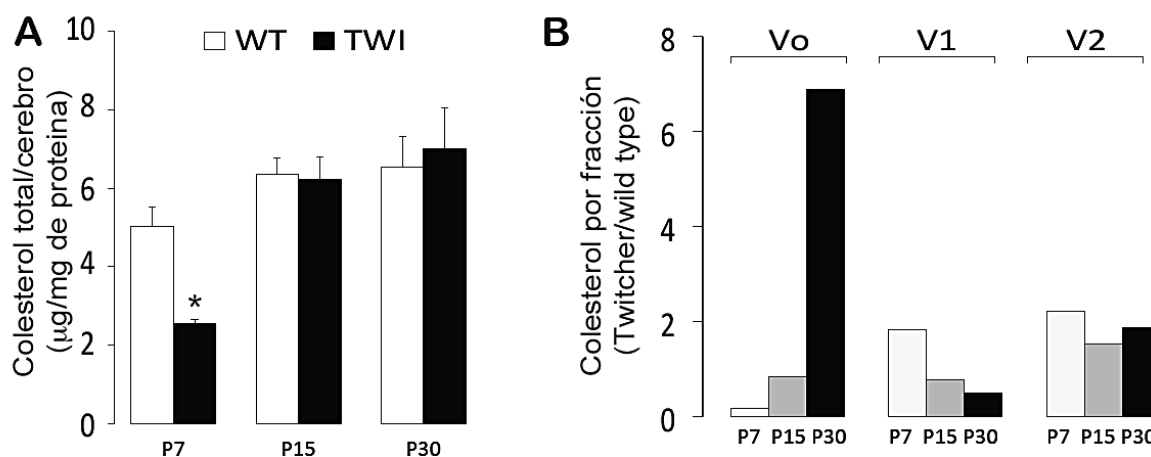
**Figura 26.** Evidencia de la acumulación diferencial de la psicovina en nervios periféricos.

Los resultados muestran que los niveles de psicovina son significativamente mayores en las regiones distales comparadas con las regiones proximales. Esto es un indicativo de que la psicovina está siendo transportada a la periferia de los nervios y, posiblemente, de la mielina. Este fenómeno se observó en los tres diferentes nervios analizados, lo que indica que la vaina de mielina no tiene un papel exclusivo en el transporte de la psicovina a los diferentes sitios de acumulación en las células nerviosas, y en otros tipos celulares. Igualmente, se pudo constatar mediante esta técnica que en los ratones WT no se da la acumulación de este esfingolípidico, en ninguna región de los distintos nervios analizados.

#### 6.4.3. Patrón de acumulación de la psicovina en el sistema nervioso de ratones Twitcher y WT

Las balsas lipídicas son microdominios de la membrana plasmática que se han asociado con el correcto ensamblaje y activación de numerosas vías de señalización intracelular, entre ellas algunas vías proliferativas y pro supervivencia, como PI3K/Akt y Raf/MEK/ERK, entre otras; y están compuestas por altas proporciones de colesterol, caveolinas y flotillinas, entre muchas otras moléculas; por tal razón, es de esperar que una acumulación anormal de psicovina en ellas cause una alteración en la arquitectura y composición de las mismas, y

altere las proporciones normales de sus moléculas constituyentes. Por tal razón, se evaluó la cantidad de colesterol presente en cada una de las fracciones subcelulares obtenidas de ratones Twitcher y WT P7, P15 y P30, como una medida indirecta de los sitios de mayor acumulación e impacto de la psicovina. En la Figura 27 se puede observar que hay una acumulación diferencial del colesterol en los ratones Twitcher a medida que avanza la enfermedad, al mismo tiempo, su distribución es desigual conforme a la fracción subcelular en la que se encuentre. Particularmente, se observa un notorio aumento en los niveles de colesterol en la fracción V0, que corresponde a la fracción plasmática, a medida que progresa la enfermedad. Es muy importante destacar que los niveles totales de colesterol en el sistema nervioso de ratones Twitcher no fueron significativamente diferentes en etapas avanzadas de la enfermedad (P15 y P30) sólo lo fue en periodos iniciales (P7) de la misma (Figura 27, A). Sin embargo, fueron las proporciones, o patrón de distribución lo que cambió drásticamente entre los ratones Twitcher y WT (Figura 27, B).

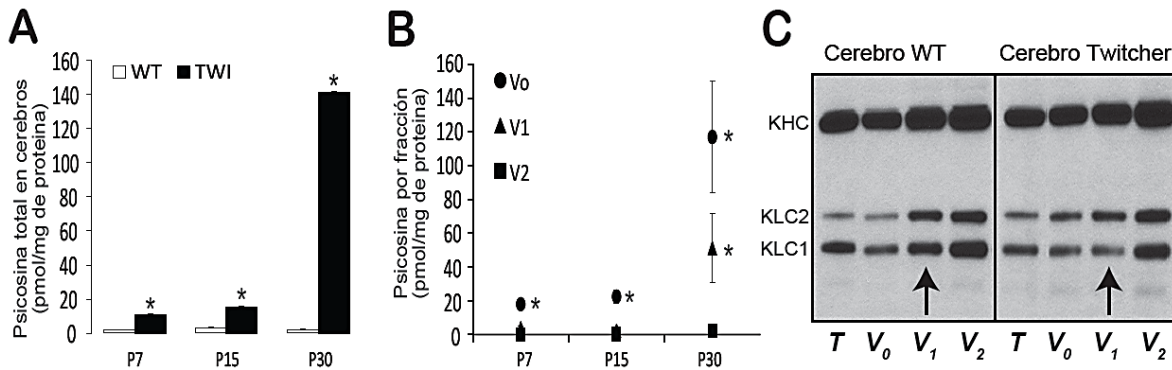


**Figura 27.** Acumulación progresiva del colesterol en el plasmalema de ratones Twitcher y WT. Cambios en los niveles de colesterol en lisados de cerebro total (A) y en cada fracción vesicular (B). Los niveles de colesterol en los lisados totales son expresados como el promedio  $\pm$  el error estándar para 4 cerebros por grupo. \* significancia de  $p < 0.05$ . El colesterol vesicular es expresado como el cambio en número de veces de colesterol para cada fracción mutante, normalizada por los niveles en la correspondiente fracción de los cerebros WT.  $n = 4$  cerebros por grupo.

#### 6.4.4. Niveles de fosforilación de los motores moleculares del transporte axonal en ratones Twitcher y WT.



Por último, se quiso estudiar la asociación entre la acumulación de psicossina y los niveles de fosforilación de los motores moleculares del transporte axonal, en particular de las kinesinas de cadena ligera y pesada. Esto con el fin de determinar si el depósito anormal de este esfingolípido afecta de alguna manera la actividad de cinasas o fosfatasas que, en consecuencia, alteren el funcionamiento de los dichos motores moleculares. La Figura 28 muestra que la acumulación de psicossina es progresiva con el transcurso de la enfermedad, que es diferencial dependiendo de la fracción vesicular (mayor en las fracciones del plasmalema) y adicionalmente está asociada a los niveles de fosforilación de los motores moleculares.



**Figura 28. La acumulación de la psicossina en el plasmalema y en vesículas se asocia a motores moleculares.**

A, B: la psicossina fue medida en lisados totales (A) y en fracciones vesiculares V0, V1 y V2 preparadas de cerebros Twitcher y WT. Los resultados están expresados como el promedio  $\pm$  el error estándar para cuatro cerebros por grupo.  $P < 0.05$ . C: La abundancia de la kinesina de cadena pesada (KHC) y de las kinesinas de cadena ligera, sensibles a GSK3- $\beta$  (de-pKLC1/2) en total y en las fracciones vesiculares V0 y V2 fueron evaluadas por inmunoblotting con los anticuerpos H2 y 63/90.

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1. ESTANDARIZACIÓN DE LA MUERTE DE CÉLULAS MO3.13 EN LOS DOS MODELOS DE KD.

La línea celular MO3.13 ha sido utilizada como una útil herramienta para el estudio de desórdenes asociados a la glía, particularmente a oligodendrocitos y astrocitos, pues dependiendo de las condiciones de cultivo y manipulación, ésta puede expresar marcadores tanto de oligodendrocitos como de astrocitos (122). Previos estudios ya habían usado esta línea celular para evaluar muerte celular y respuestas a distintos fármacos para mejorar las condiciones de supervivencia y de proliferación celular, incluso respuestas a estrés oxidativo y a acumulación de intermediarios metabólicos que eran contrarrestados por diferentes moléculas en prueba (16-19, 25, 31, 32, 125, 126). Sin embargo, esta es la primera investigación conocida en la que se estandarizan dos modelos celulares con el fin de estudiar específicamente el comportamiento y respuesta celular frente a los nocivos y conocidos efectos de la acumulación de psicossina. En este caso, se pudo determinar la dosis letal media necesaria para la muerte de las células MO3.13 (10  $\mu$ M) en el modelo exógeno, y el tiempo necesario para reducir en un 50 % la viabilidad celular en el modelo endógeno (24 h).

La utilidad y favorabilidad de este modelo para este tipo de estudios tiene un gran potencial, sin embargo, la experiencia en el mantenimiento y reproducibilidad de los experimentos adquirida durante la presente investigación, obliga a ser extremadamente cuidadosos con su manipulación, pues por ser una línea celular inmortalizada con rhabdomiosarcoma, sumado a su habilidad para diferenciarse en astrocitos, hace que pueda caerse en errores experimentales que conduzcan a una variabilidad muy amplia en los resultados. En este trabajo se tuvieron muy en cuenta las características morfológicas y los marcadores de oligodendrocitos presentes para validar los resultados.

#### *7.1.1. Muerte celular en el modelo exógeno*

Las características morfológicas, ópticas y de cultivo obtenidas en el presente estudio concuerdan con las descritas anteriormente en la descripción de la línea celular y en estudios realizados con ella (16, 17, 32, 122, 123), esto fue utilizado como base para establecer la confluencia (70%) y demás condiciones de cultivo y manipulación (tiempos y dosis de PMA para la diferenciación) para efectuar todos los experimentos.

De la misma manera, la revisión de literatura preliminar nos permitió establecer los parámetros característicos de las células en estados pre y apoptóticos. En todos los casos, dichos criterios fueron validados con el fin de establecer la muerte celular en cultivo, causada por la psicossina, y comparada con los controles sin el citotóxico.

De cualquier modo, es de tener en cuenta que pese a estas características, y a la repetitividad de las mismas, es de aclarar que el modelo utilizado aquí no puede ser tomado, bajo ninguna circunstancia como un modelo real de la enfermedad por tres razones principalmente: la primera se debe a que la psicossina en el modelo real no es incorporada al las células del medio extracelular, como sí lo es en este caso, la segunda razón es que la línea celular no es de por sí una línea natural de oligodendrocitos, sino una línea artificial creada e inmortalizada, lo que le otorga, eventualmente, otras características fisiológicas y moleculares distintas a los oligodendrocitos propiamente dichos. Y por último, el cultivo celular no está interactuando con otro tipo de células presentes en el sistema nervioso como ocurre naturalmente, a saber, astrocitos, microglía y neuronas, de modo que se debe ser muy cuidadosos a la hora de interpretar los resultados. No obstante, el diseño experimental, el tratamiento de las células y el objetivo del presente trabajo hace del modelo una muy buena aproximación para el estudio de las respuestas celulares a los daños asociados a la presencia desproporcionada del esfingolípido psicossina.

En cuanto a los valores hallados mediante ensayos de WST respecto a la concentración y tiempo de exposición utilizados en el modelo (10  $\mu\text{M}$  por 24 h), estos datos son congruentes con los observados previamente por Giri, et. al., 2008 (32), aunque difieren un poco en el tiempo de exposición, lo cual puede ser atribuido a las condiciones de cultivo y a otras variables como propiedades ambientales que pueden afectar el comportamiento de esta línea celular, que como ya se había mencionado, es muy versátil. Por tal motivo, fue necesaria la estandarización previa del modelo, procedimiento que se realizó hasta que las condiciones de reproducibilidad fueran óptimas. Los resultados de esta estandarización, resaltados en la Figura 7, mostraron que la respuesta a la psicossina es más severa en las células diferenciadas con PMA que en las células indiferenciadas. Esta variación se puede interpretar desde dos puntos de vista: el primero es que, como es de esperarse en células que están en proceso de proliferación, tal como lo son las células MO3.13 no diferenciadas, hay un alto nivel de



expresión de factores de crecimiento y de mitógenos (127) que de por sí le otorgan mayor resistencia a las células ante diferentes tipos de condiciones deletéreas, de hecho, el presente trabajo es basado en la protección conferida por IGF-1, un factor de crecimiento crucial en el desarrollo de este tipo celular. Y el segundo punto de vista es el hecho de que existen fuertes evidencias (22-24, 26, 35-37, 128, 129) de que la psicosisina causa la muerte celular principalmente por el desacople en diferentes vías de señalización asociadas a estructuras membranales conocidas como “lipid rafts” o balsas lipídicas, que se establecen en las células maduras y que, en etapas proliferativas de las células, están apenas en formación.

### *7.1.2. Muerte celular en el modelo endógeno*

Hasta el momento sólo se conoce un antecedente de un modelo celular de Krabbe que incluya transfección de las células MO3.13 y silenciamiento del gen GALC (130), sin embargo, en dicho estudio se evaluó el efecto de la acumulación de la psicosisina en células MO3.13 sobre la diferenciación celular. Los resultados obtenidos por Won, et. al., que el incremento de la psicosisina endógena puede impedir la maduración de oligodendrocitos inhibiendo la síntesis de los componentes de la mielina e incrementa la muerte celular a través de un mecanismo dependiente de la fosfolipasa A<sub>2</sub>, lo que podría explicar la muerte celular observada en nuestros resultados con células indiferenciadas, en donde la psicosisina no actúa de manera tan severa como en células diferenciadas, pero igual reduce significativamente la viabilidad celular. Por el contrario, ningún antecedente se conoce de investigaciones que muestren el efecto que tiene la acumulación endógena de la psicosisina en células maduras de oligodendrocitos, tal y como se estudió en este trabajo.

Nuestros resultados indican, en primer lugar, que el silenciamiento de GALC a través de la transfección lentiviral efectivamente redujo significativamente la producción de la enzima galactosilceramidasa (ver Figura 8), con las consecuentes acumulación de psicosisina y entrada en proceso de apoptosis celular.

Las pruebas de viabilidad celular realizadas con el modelo endógeno de la enfermedad de Krabbe señalan que ya desde el tercer día de silenciamiento celular hay un aumento sustancial (≈25%) en la muerte celular, y que ese porcentaje se aumenta al 50% pasados los 7 días de silenciamiento, razón por la cual se decidió realizar los experimentos subsiguientes con ese

tiempo, de modo que fueran comparables con los resultados obtenidos con el modelo exógeno.

La gran diferencia en términos prácticos entre los resultados obtenidos por Won, et. al., y los nuestros radican primordialmente en que los procesos estudiados por nosotros atañen la desmielinización generalizada que se ve en los pacientes con KD, mientras que los primeros afectan el proceso de remielinización, pues es el proceso de maduración al que se refieren. De cualquier modo, ambas derivaciones son complementarias y representan grandes blancos para futuras investigaciones que amplíen el entendimiento de los mecanismos moleculares subyacentes.

## 7.2. EFECTO DE LOS AGONISTAS DE PPARs E IGF SOBRE LA SUPERVIVENCIA CELULAR.

Como se mencionó previamente, los agonistas de PPARs han sido relacionados con numerosos procesos protectores en diferentes tipos celulares, además de su importante papel en la regulación de la homeostasis lipídica general de todo el cuerpo, razón por la cual ya están siendo utilizados como alternativas terapéuticas para fallas metabólicas asociadas con los lípidos e, incluso, para enfermedades neurológicas y daños del sistema nervioso central (131). Uniendo estas dos condiciones, nuestra hipótesis propone que la activación de estos receptores debe tener un efecto positivo en cuanto a protección del sistema nervioso se refiere, máxime en las células oligodendrogiales cuyo contenido lipídico es altamente constitutivo.

De la misma manera, el papel que cumplen la insulina y el factor de crecimiento derivado de insulina 1 (IGF-1) como agente protector es bastante conocido (20, 79, 101, 103), además de la creciente evidencia de que también tiene una función trascendental en el mantenimiento e integridad del sistema nervioso (95). De modo que este aparte de la investigación se basó en la presunción de que el IGF-1 sólo o combinado con agonistas de PPARs podría tener importante efecto en la viabilidad celular o como amortiguador de los efectos nocivos de la psicosis en los modelos celulares utilizados.

### 7.2.1. Efecto de agonistas de PPARs sobre la supervivencia de células MO3.13.

Los hallazgos realizados hasta el momento al respecto de PPAR $\gamma$  y sus propiedades protectoras han sido de cierta manera contradictorias. Numerosos estudios plantean que la activación de éste receptor puede proteger diferentes tipos celulares bajo condiciones de estrés celular o bajo la acción de diferentes citotóxicos. Small et. al., 2014, por ejemplo, han propuesto que la puede inhibir la apoptosis a través de la modulación del estrés oxidativo y la respuesta inflamatoria en células SH-SY5Y mediante el bloqueo de las vías de p38 y JNK, además de fortalecer la vía de supervivencia de las MAP cinasas y reducir los factores proinflamatorios promovidos por NF- $\kappa$ B (132). Otros autores, incluso formulan que los agonistas de PPAR $\gamma$  pueden promover la diferenciación de oligodendrocitos mediante regulación directa de la expresión de genes relacionados con la maduración y la producción de mielina (133). Por el contrario, otros estudios han mostrado que los agonistas de PPAR $\gamma$  pueden, de hecho, propiciar y promover la muerte celular vía apoptosis por medio de la disminución de las funciones genómicas de PPAR $\gamma$  por MAPK, lo que lo convierte como un potencial blanco terapéutico anti-cáncer (134). Aquí, se mostró que el efecto de la rosiglitazona sobre la supervivencia de las células MO3.13 diferenciadas depende de la dosis y del tiempo de exposición, pues vimos que altas dosis ( $> 5 \mu\text{M}$ ), o exposiciones prolongadas (24 h) actúan de manera deletérea sobre la viabilidad celular, pero por el contrario, se demostró que una dosis de  $1 \mu\text{M}$  por 1 hora de exposición redujo significativamente la muerte celular. Este hecho sugiere que existen diferentes mecanismos de acción de la rosiglitazona, o de la activación de PPAR $\gamma$  sobre las vías de señalización intracelulares. En particular, los mecanismos que posiblemente están asociados a estas respuestas se discutirán más adelante.

Dados los resultados positivos que se obtuvieron con el modelo exógeno de la enfermedad, se repitieron los experimentos en el modelo endógeno con silenciamiento del gen GALC (Figura 15, A). Los resultados muestran de nuevo un aumento en la muerte celular cuando las células MO3.13 silenciadas son expuestas a diferentes dosis de rosiglitazona durante un periodo prolongado (24 h), lo que concuerda con el modelo exógeno de la enfermedad. Igualmente, se observó una disminución en la muerte celular cuando se expusieron las células al agonista de PPAR $\gamma$  durante un periodo de 1 h, sin embargo, la dosis necesaria para que se observara este efecto fue mayor que en el caso de las células no silenciadas a las que se les aplicó la psicovina directamente sobre el medio de cultivo. Este hecho, de nuevo, sugiere diferentes mecanismos mediante los cuales la rosiglitazona puede estar confiriendo

protección a las células expuestas al citotóxico, pero este modelo nos permite inferir que el mecanismo debe estar asociado a la forma en la que la psicosisina se acumula dentro de las células y también a la cantidad de psicosisina incorporada/acumulada. Esta afirmación se puede realizar en vista de que se esperaría una respuesta similar en términos de viabilidad celular si la rosiglitazona actuara indistintamente en las células que han incorporado la psicosisina a través de su membrana celular proveniente del medio extracelular, y en las células que la acumulan por deficiencia de la enzima que la degrada (GALC).

Una posible explicación al aumento de la muerte celular causada por la aplicación de rosiglitazona por periodos prolongados es que la misma exposición de agonistas de PPAR $\gamma$  induzcan apoptosis por sobre estimulación de las vías ERK y PI3K/Akt, proceso que ya ha sido demostrado previamente. Li M, et. al., 2006 demostraron que la exposición prolongada de troglitazona (otro TDZ como la rosiglitazona) induce la apoptosis en células cancerígenas de pulmón, y más aún, que esa apoptosis es dependiente de ERK (134). En consecuencia, los efectos de los tratamientos con agonistas de PPAR $\gamma$  pueden depender de la dosis y del tiempo de exposición, y pueden resultar tanto benéficos como deletéreos para las células.

Por otra parte, el receptor PPAR $\beta$  también ha sido descrito en diferentes investigaciones como un agente neuroprotector y como un modulador del estrés oxidativo en diferentes tipos de tejido (52, 135), lo que lo sitúa como un potencial fármaco para tratar variadas enfermedades. Concretamente en el sistema nervioso, Aleshin y Reiser, 2014 (136) mostraron que PPAR $\beta$  tiene la facultad de proteger astrocitos y neuronas en ratas del daño ocasionado por ceramida. En el presente estudio no se pudo demostrar ningún tipo de protección contra los deletéreos efectos de la psicosisina por parte del agonista GW0742, bajo ninguna dosis probada ni bajo ninguno de los dos tiempo de exposición al agonista. Aunque estos resultados contradicen los propuestos por Aleshin y Reiser, no necesariamente desvirtúan sus hallazgos. En primer lugar, ellos trabajaron sobre cultivos primarios astrocitos y neuronas de rata, no en oligodendrocitos, cuya naturaleza bioquímica es bastante disímil a la neuronal o la de otros tipos de células gliales, sobre todo, en lo que respecta al metabolismo y composición lipídica. En segundo lugar, el agonista usado por ellos fue el fármaco L-165041 y, tal como se mencionó previamente, los diferentes agonistas de un mismo receptor suelen tener efectos diferentes y dependientes del tipo celular (ver tabla 1). Mientras que

GW0742 tiene propiedades principalmente antiinflamatorias, L-165041 a su vez, es usado como tratamiento para la hiperlipidemia, hiperglicemia, aterosclerosis y obesidad. Por último, ellos demostraron que los efectos protectores de L-165041 son debidos a la activación de la ceramida cinasa (CerK), y actúa en particular contra los efectos letales de la ceramida, en nuestro caso, la psicosis necesariamente implica otro mecanismo patogénico que posiblemente está asociado a las vías de supervivencia acoplados a la membrana celular.

Por todo lo anterior, aunque no se pudieron demostrar los efectos protectores de PPAR $\beta$  en las células MO3.13, se plantea la posibilidad de realizar futuros estudios que involucren otros tipos celulares afectados por KD y ensayar otros agonistas con el fin de explorar más a fondo la potencialidad terapéutica de este receptor.

Finalmente, en relación al receptor PPAR $\alpha$ , se demostró un efecto estadísticamente significativo en la supervivencia de las células MO3.13 tratadas con el agonista WY14643 durante 24 h a una concentración de 20  $\mu$ M, que representa una recuperación de casi el 30% de las células afectadas por la acción de psicosis. Estos resultados, aunque están pobremente respaldados por investigaciones precedentes debido a la especificidad en la ubicación de este receptor en el organismo y por la dificultad experimental para activarlo, son robustos y constituyen una interesante alternativa terapéutica explorar. Si bien se indicó que no hay suficiente material bibliográfico que apoye estos resultados, algunos investigadores han probado que el tratamiento con agonistas de PPAR $\alpha$  puede proteger ciertos tipos celulares, particularmente en la retina por sus efectos en la reducción de los niveles de expresión de HIF-1 $\alpha$ /Nox 4, y su consecuente reducción en el estrés oxidativo (137). El efecto de WY14343 en la recuperación de la muerte celular causada por la psicosis puede ser explicado, entonces, por una reducción en el estrés oxidativo producido por KD (138).

#### *7.2.2. Efecto del factor de crecimiento IGF-1 sobre la supervivencia de células MO3.13.*

La razón por la que se utilizó el factor de crecimiento IGF-1 en los experimentos bajo el supuesto de que tiene el potencial para reducir los efectos nocivos de la psicosis y promover la proliferación celular tiene una base bibliográfica sólida. En 2007, Yi Pang, et. al., demostraron que IGF-1 protege las células progenitoras de oligodendrocitos contra el daño producido por TNF $\alpha$  mediante la activación de las vías PI3K/Akt, y la interrupción de la vía apoptótica mitocondrial (103). En adición, Bibollet-Bahena y Almazan, en 2009 mostraron

que la síntesis de proteínas necesaria para la diferenciación de los oligodendrocitos era mediada por IGF-1, de nuevo, a través de las vías PI3K/Akt y ERK (102), resultados que fueron corroborados por Cui, et.al., 2007, quienes adicionalmente incluyeron a las tirosina cinansas del tipo Src como mediadores de la diferenciación de oligodendrocitos mediada por IGF-1.

Los resultados aquí presentados están en concordancia con la información antes descrita, pues se mostró un papel importante de IGF-1 en la protección y proliferación de las células MO3.13 frente al daño ocasionado por psicossina, pero este efecto se hizo mucho más perceptible en las células no diferenciadas. De modo que estos resultados sugieren que el tratamiento con IGF-1 en las células no diferenciadas del modelo exógeno de KD le otorgan mayor resistencia a las células en diferenciación, posiblemente mediante la activación de las vías PI3K/Akt y ERK a través del receptor de insulina tipo I, lo cual activaría los mecanismos antiapoptóticos y proliferativos en estas células.

En las células diferenciadas el proceso es diferente pues ya han culminado el proceso de maduración, lo que apunta a que el efecto observado en los tratamientos con IGF-1 tienen relación con un aumento en el número de células por la activación de vías de proliferación, más que una protección propiamente dicha frente a la acumulación de psicossina. Se podría especular que el tratamiento con factores de crecimiento similares a insulina en pacientes con Krabbe podría mejorar transitoriamente las condiciones de vida, pero no ofrecería una recuperación de las células afectadas.

Teniendo en cuenta que no se conocen en detalle los mecanismos moleculares mediante los cuales el IGF-1 pueda estar ejerciendo su papel en la proliferación celular, ni la manera como puedan estar interactuando los procesos mediados por los agonistas de PPARs y el factor de crecimiento IGF-1 con las vías de supervivencia y proliferación, se evaluó la repuesta de las células MO3.13 diferenciadas y silenciadas a diferentes dosis y periodos de exposición a IGF-1. Los resultados mostraron también una respuesta dependiente del tiempo y la dosis utilizados. Hubo un aumento de casi dos veces en el porcentaje de muerte celular cuando las células silenciadas para el gen GALC fueron tratadas con 100 ng/mL de IGF-1 por 24 horas. Si bien, IGF-1 es bien reconocido por sus propiedades antiapoptóticas, también es sabido que puede, bajo ciertas condiciones desencadenar una respuesta apoptótica. Se presume que al

saturar los receptores membranales de IGF-1 con altas dosis y por periodos prolongados, las células pueden activar también las vías apoptóticas y generar un aumento en la muerte celular, tal como se encontró en el presente estudio (ver Figura 15, B).

### 7.3. EFECTO DE LOS AGONISTAS DE PPARs E IGF SOBRE LAS VÍAS DE SUPERVIVENCIA CELULAR PI3K/Akt Y Raf/MEK/ERK.

Ya se demostró que la supervivencia celular en ambos modelos planteados en el presente estudio puede ser afectada directa o indirectamente por la acción de los agonistas de PPARs y el factor de crecimiento IGF-1. No obstante, el mecanismo mediante el cual actúan y las razones por las cuales el efecto varía dependiendo del modelo utilizado, del estado de diferenciación de los oligodendrocitos y los tiempo y dosis empleados, no están bien establecidos. En principio, teniendo en cuenta lo que se sabe hasta el momento sobre los targets moleculares y las vías relacionadas con estos receptores nucleares y el IGF-1, se plantea la hipótesis de que la acción de los agonistas y el factor de crecimiento pueden estar actuando sobre dos de las principales vías de señalización pro-supervivencia y proliferativas, PI3K/Akt y Raf/MEK/ERK. Por tal razón se determinaron los niveles de fosforilación de componentes importantes de estas vías mediante western blot.

El objetivo y el alcance del presente trabajo es el de contrastar y discutir los efectos de los agonistas de PPARs e IGF-1 en la supervivencia con los estados de activación de las vías de señalización mencionadas, con el fin de atribuir o descartar su influencia directa o indirecta sobre la activación de las mismas. Pese a ello, no se pueden descartar otros mecanismos eventuales que puedan dar explicación a los resultados obtenidos, y que su comprobación no hace parte de los propósitos de este estudio, aunque serán igualmente discutidos y analizados.

#### 7.3.1. *Acción de la rosiglitazona e IGF-1 sobre las vías de supervivencia celular PI3K/Akt y RAF/MEK/ERK.*

Los resultados indican un claro efecto de la rosiglitazona sobre los niveles de fosforilación de Akt, por consiguiente sobre la activación de la vía de señalización. Tanto en el modelo exógeno como en el modelo endógeno se observó un aumento significativo en los niveles de fosforilación de Akt cuando se aplicaba el agonista de PPAR $\gamma$ , efecto contrario al que se encontró con la exposición a psicossina, en donde los niveles de p-Akt disminuyeron dramáticamente. En adición, el efecto de la rosiglitazona fue mucho más evidente en los pre-

tratamientos de 24 horas con el fármaco, y fue muy tenue o nulo en los tratamientos de una hora. Estudios previos han demostrado que la activación de PPAR $\gamma$  puede alterar directamente los niveles de fosforilación de Akt (139), pero más interesante aun resultan los estudios que muestran que esta activación directa de la vía PI3K/Akt por parte de PPARs puede disminuir la apoptosis en diferentes tipos celulares aunque su causa sea diversa (140, 141).

En nuestro caso, la elevación observada en los niveles de p-Akt no necesariamente coincide con el aumento en la viabilidad celular tratada en el capítulo anterior, pues dicha protección conferida por rosiglitazona se daba en los tratamientos de 1 hora de exposición y no se asocian a altos niveles de fosforilación. Esta observación puede sugerir que hay un mecanismo diferente mediante el cual la rosiglitazona pueda estar ejerciendo esta función, por ejemplo la reducción del estrés oxidativo, la modulación de los mecanismo inflamatorios que están elevados en KD o, incluso, existe la posibilidad de que la rosiglitazona ejerza un efecto independiente de la activación de PPAR $\gamma$  y actúe sobre otros blancos moleculares. Lee JE., et. al., mostraron que la rosiglitazona inhibe la apoptosis inducida por clorpirifós a través de la modulación del estrés oxidativo y la respuesta inflamatoria en células SH-SY5Y, y este efecto es mediado por la vía ERK (142). De acuerdo a esto, se puede explorar la posibilidad de que el fármaco esté realizando su efecto neuroprotector a través de la vía de las MAP cinansas (ERK).

Al analizar los resultados de los tratamientos con el agonista de PPAR $\gamma$  sobre los niveles de p-ERK1/2 se puede inferir que hay una relación entre los niveles de fosforilación de ERK 1 y 2 y la recuperación en la viabilidad celular descrita anteriormente. Nuestros resultados indican que hay una disminución en la fosforilación de ERK cuando se aplica la psicossina, lo que podría estar relacionado con los procesos apoptóticos propios de su acumulación. Asimismo, hay un aumento en la activación de la vía ERK1/2 que coincide con el tratamiento de 1h con rosiglitazona en presencia de psicossina. Por el corto tiempo de exposición, se presume que el fármaco actúa directamente activando esta vía de proliferación, y esto conlleva a la expresión de genes y a la activación de mecanismos proliferativos y antiapoptóticos. Kim J., et. al., 2009, demostraron que los agonistas de PPAR $\gamma$  puede mediar directamente la activación de ERK en adipocitos. Adicionalmente, Huang W, et. al., 2011,



indicaron que ERK1/2 está involucrado en los mecanismos regulatorios en la protección mediada por PPAR contra la expresión de la metaloproteasa MMP-9 inducida por VIH-1 en células endoteliales, de modo que la acción de rosiglitazona sobre la viabilidad de las células MO3.13 es probablemente mediada por ERK.

Estos resultados obtenidos en el modelo exógeno de KD se reproducen en el modelo endógeno, reforzando la hipótesis de ERK como mediador de la supervivencia también en las células MO3.13 transfectadas.

Por otro lado, los resultados de los tratamientos con IGF-1 muestran, en conjunto, que hay un aumento considerativo en los niveles de p-Akt cuando se combinan las vías de IGF-1 y de PPAR $\gamma$ , mientras que hay un aumento generalizado en los niveles de p-ERK independientemente de si es combinado con rosiglitazona o si ese aplica en solitario, aunque es potencializado en los tratamientos combinados.

Existe evidencia contradictoria en el sentido de si la interacción entre IGF-1 y PPAR $\gamma$  ejerce un efecto inhibitorio o estimulador sobre la supervivencia celular, y la manera como estas dos vías interactúan entre sí, no es del todo clara. En principio, la aplicación de IGF-1 puede actuar directamente activando ambas vías de supervivencia y proliferación, PI3K/Akt y Raf/MEK/ERK, lo que conllevaría a un aumento en los niveles de fosforilación tanto de AKT como de ERK1/2, lo que concuerda con nuestros resultados. Por otra parte, la aplicación de PPAR puede también activar directamente ambas vías y promover la viabilidad celular, lo que explica los elevadísimos niveles de fosforilación de Akt y ERK observados en los tratamientos combinados de ambos fármacos (ver Figuras 21 y 22). Se ha demostrado que PPAR $\gamma$  también puede actuar de manera inhibitoria sobre estas vías. Burgermeister E., et. al., 2007 mostraron que las vías activadas por IGF-1 y por PPAR $\gamma$  pueden inhibirse mutuamente, causando los efectos contrarios y promoviendo la muerte celular (110). Esto podría explicar por qué al utilizar un antagonista de PPAR $\gamma$  en el modelo exógeno de la enfermedad aumentó drásticamente los niveles de fosforilación de Akt, al mismo nivel que lo hizo el IGF-1 por sí sólo (ver Figura 16). Adicionalmente, se mostró que la aplicación de rosiglitazona por 1 hora antes de la aplicación de la psicósina en el modelo exógeno reduce significativamente los niveles de p-IGF-1R (Figura 18), resultado que robustece la teoría de que la activación de PPAR $\gamma$  puede inhibir esta importante vía.

Es importante recalcar que la disminución en la muerte celular asociada a IGF-1 se observó principalmente en células indiferenciadas, mientras que en células diferenciadas este efecto no se pudo comprobar. Sin embargo, en el modelo endógeno de la enfermedad si se encontró una asociación entre los niveles de fosforilación de Akt y ERK asociados a la aplicación de de IGF-1 y rosiglitazona combinados, por lo cual se plantea que el efecto de la acumulación de la psicosis altera de cierta forma el acoplamiento y funcionamiento de estas vías, y que la aplicación exógena de estos fármacos puede restaurar hasta cierto punto estos mecanismos de defensa. Más adelante se analizará el papel de la acumulación de la psicosis sobre el ensamble y acoplamiento de estas vías de señalización.

### 7.3.2. Acción de WY14643 sobre las vías de supervivencia celular PI3K/Akt.

Hay muy poca evidencia que de la activación de PPAR $\alpha$  esté asociada con las vías de señalización de Akt y ERK, pese a ello, algunos autores han relacionado a esta isoforma de los PPARs con supervivencia o muerte celular mediada por PI3K/Akt. En 2009, Bulhak AA, et. al., demostraron publicaron una investigación en la que demuestran que la activación de PPAR $\alpha$  otorga protección en células cardíacas por medio de mecanismos que envuelven la producción de óxido nítrico (NO) a través de la vía de Akt (143). Por el contrario, Grabacka M, et. al., 2006, mostraron que, de hecho, la activación de PPAR $\alpha$  disminuye la proliferación de células de melanoma a través de la regulación a la baja de Akt (144). A parte de estos dos casos aislados, hay muy poca información que conecte la activación de PPAR $\alpha$  o sus agonistas con la esta vía de supervivencia.

Los resultados aquí presentados no revelan ninguna relación entre estas dos vías, aunque hay una tendencia no significativa a disminuir los niveles de p-Akt en las células MO3.13 que fueron tratadas con WY14643 con respecto al control y con respecto a las células tratadas con psicosis (Figura 19). No obstante, previamente se había demostrado que si hay una recuperación significativa en la viabilidad cuando se trataban las células con un pre-tratamiento de 24 horas con WY14643 (20  $\mu$ M). Estos resultados podrían ser explicados con base en los abundantes trabajos que vinculan la activación de PPAR $\alpha$  con una regulación del metabolismo lipídico, que en oligodendrocitos KD está muy alterado a causa de la acumulación del esfingolípido psicosis y al desbalance que esta acumulación genera en la producción y mantenimiento de la mielina. Por ejemplo, en 1998 se demostró que la

inactivación genética de PPAR $\alpha$  en ratones, resulta en una acumulación masiva de lípidos en el hígado y otros tejidos (145).

### 7.3.3. *Acción de GW0742 sobre las vías de supervivencia celular PI3K/Akt.*

Los resultados obtenidos con el agonista de PPAR $\beta$ , GW0742 son muy semejantes a los mencionados para WY14643. Hay una disminución drástica en los niveles de fosforilación de Akt por acción de la psicossina, sin embargo, no se observa ninguna reacción en dichos niveles con la aplicación de este agonista (figura 20). Tampoco se observó ninguna protección conferida por ninguno de los tratamientos realizados con este agonista. Pese a ello, hay algunas evidencias que relacionan la activación de PPAR $\beta$  con un incremento en la proliferación, supervivencia o diferenciación de oligodendrocitos y otros tipos celulares del sistema nervioso (136, 146, 147).

Aunque en el presente trabajo no se pudo demostrar hay bastantes investigaciones que señalan que la activación de PPAR $\beta$  tiene propiedades protectoras tanto en el sistema nervioso central como en otro tipo de tejidos gracias a sus cualidades antiinflamatorias y antioxidantes. Una posible razón por la cual no se observó ninguna respuesta positiva en nuestros resultados es que el modelo utilizado no brinde las herramientas necesarias para la respuesta documentada de la activación de PPAR $\beta$ . Los estudios realizados hasta el momento con agonistas de PPAR $\beta$  como GW0742 se han hecho en modelos animales, cultivos primarios o cultivos mixtos de células nerviosas. Por ejemplo, Polak PE., et. al., 2005 que el uso de GW0742 en el modelo murino autoinmune de enfermedad desmielinizante (EAE) tiene efectos protectores y reduce los síntomas clínicos en estos ratones, y esa respuesta es atribuida a una reducción en la activación inflamatoria microglial y astrogial y a una disminución en los niveles de IL-1 $\beta$ (148). Así, es muy probable que la protección concedida por este agonista dependa de la acción conjunta de distintos tipos celulares y la interacción de distintos sistemas, situación que dista mucho de los alcances de nuestros modelos celulares.

## 7.4. DISTRIBUCIÓN Y MOVILIZACIÓN VESICULAR DE LA PSICOSINA EN EL SISTEMA NERVIOSO

Además de los deletéreos efectos mencionados de la acumulación anormal de psicovina en oligodendrocitos, en neuronas contribuye a la axonopatía temprana y a la desmielinización por su pérdida de interacción con los oligodendrocitos (35).

Se ha demostrado que la axonopatía ocurre muy temprano en el modelo murino de la enfermedad (ratón Twitcher), pues se ha observado que desde el día postnatal 7 (P7) existen varicosidades e hinchamientos axonales, distrofia axonal y fosforilación axonal de los neurofilamentos que componen su citoesqueleto y que sirven como mecanismo de transporte axonal rápido, tanto retrógrado como anterógrado. Dichos mecanismos de transporte, parecen estar asociados a alteraciones en los niveles de fosforilación de la proteína GSK3- $\beta$  (36, 37).

Es conocido que los esfingolípidos son sintetizados vía Retículo endoplasmático-aparato de Golgi y distribuidos a través de vesículas endosomales, sin embargo, el transporte de la psicovina y cómo ésta puede regular los niveles de fosforilación de GSK3- $\beta$ , permanecen sin entenderse completamente. En este trabajo proponemos que la psicovina es distribuida a las neuronas y oligodendrocitos, y dentro de ellas hacia las sinápsis y balsas lipídicas de la mielina a través de un mecanismo de transporte vesicular asistido por motores proteicos. Asimismo, planteamos que la acumulación de la psicovina en éstas vesículas puede estar alterando el transporte axonal rápido, mediado por motores moleculares, lo que conlleva a su acumulación en las membranas plasmáticas, en particular en las balsas lipídicas, en donde afecta el acople de las vías de señalización pro-supervivencia y proliferativas, lo que conlleva a una rápida progresión en la desmielinización y muerte celular, además de una reducida capacidad de remielinización tanto en el sistema nervioso central como en el sistema nervioso periférico.

#### *7.4.1. Fraccionamiento subcelular del tejido cerebral de ratones Twitcher y WT*

En este trabajo se utilizó un protocolo previamente estandarizado para realizar el fraccionamiento subcelular del tejido cerebral de ratones Twitcher y WT y de este modo obtener las diferentes fracciones vesiculares constituyentes (124). Al igual que Morfini, et. al., 2004, en este caso se adoptó este procedimiento para estudiar la composición y distribución vesicular en los diferentes tipos celulares del sistema nervioso, y analizar los motores moleculares involucrados en su transporte y disposición. Por medio de este

procedimiento logramos separar y, posteriormente identificar por microscopía electrónica, cuatro tipos diferentes de fracciones subcelulares que fueron definidas como V<sub>0</sub>, V<sub>1</sub> y V<sub>2</sub>. La morfología y el análisis ulterior mediante inmunoblotting con anticuerpos específicos para componentes membranales (Bomba de Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>), vesiculares (flotilina, SNAP25), mitocondriales (HSP60) y nucleares (nucleoporina), permitieron caracterizar dichas fracciones como membranales (V<sub>0</sub>), vesiculares (V<sub>1</sub>) y vesiculares menores (V<sub>2</sub>), ésta última, por sus propiedades morfológicas corresponderían con porciones exosomales que podrían estar transportando moléculas de señalización e interacción entre oligodendrocitos y demás clases celulares del sistema nervioso. De hecho, diversos estudios revelan creciente evidencia de este tipo de comunicación que permite a los oligodendrocitos transportar y comunicar molecularmente a sus vecinos celulares señales que promueven la diferenciación, la producción de mielina, la respuesta inflamatoria a través de microglia, e incluso la inducción de la apoptosis (149-152). En consecuencia, uno de los mecanismos que aquí se proponen es que la psicovina pueda estar llegando primero a los axones mielinizados a través de su transporte por medio de exosomas provenientes de oligodendrocitos, y que esto pueda estar causando la axonopatía y la consiguiente muerte neuronal antes de que las neuronas acumulen suficiente psicovina por su propia cuenta.

Esta división en fracciones permite el análisis independiente de la acumulación y distribución de la psicovina dentro de los más probables medios de transporte y depósito celulares conocidos hasta el momento. Más adelante se discutirá más a fondo sobre los patrones de distribución de este esfingolípido, y su relación con los motores moleculares de transporte axonal.

#### *7.4.2. Patrón de acumulación de la psicovina en el sistema nervioso de ratones Twitcher y WT*

Al estudiar los niveles de psicovina en los nervios ciático, braquial y vago de ratones Twitcher y WT se encontró que hay mayor acumulación de psicovina en las porciones distales de los mismos, indicando una progresión “de adelante hacia a tras” de la enfermedad. Estos resultados concuerdan con la teoría planteada por Cantuti-Castelvetri, et. al., 2012 (36), quienes demostraron que la psicovina genera un efecto deletéreo en los axones de los ratones afectados de una forma que regresiva, generando un daño axonal previo a un daño en el soma. Es decir, primero se dañan los axones y las terminaciones dendríticas, y por último el cuerpo

celular entra en apoptosis. Adicionalmente, en 2013 se demostró que los efectos característicos observados en axones enfermos están asociados a alteraciones en los mecanismos de transporte axonal, especialmente el transporte axonal rápido dependiente de las proteínas GSK3- $\beta$  y las kinesinas de cadenas pesadas y ligeras (37).

Teniendo en cuenta los resultados observados en la Figura 26, se propone que la psicosisina está siendo sintetizada normalmente en las células de ratones Twitcher, y al no ser degradada por la ausencia de GALC, es transportada hacia la periferia y depositada en las regiones distales de los axones y de los oligodendrocitos (membranas mielínicas). Una vez allí, empieza a acumularse, presumiblemente en las balsas lipídicas (lipid rafts) y dicha acumulación, cuando es suficientemente alta altera su conformación y posteriormente empieza a deteriorar el transporte axonal mediante la activación de la fosfolipasa 1 (PP1) y de GSK3- $\beta$ . Este proceso continúa con una acumulación cada vez más cercana al soma o cuerpo celular de las células afectadas, hasta que finalmente termina disparando mecanismos apoptóticos que generan una reducción en las poblaciones celulares de oligodendrocitos y neuronas, y las consecuentes desmielinización y neurodegeneración.

#### *7.4.3. Patrón de acumulación del colesterol en el sistema nervioso de ratones Twitcher y WT*

Para apoyar la hipótesis anterior de acumulación inicial de la psicosisina en los lipid rafts, se evaluó la proporción y distribución del colesterol, componente fundamental de estos complejos membranales, y así saber si la abundante presencia de psicosisina, en efecto, modifica su estructura y composición.

Nuestros resultados, sintetizados en la Figura 27, indican que hay una redistribución del colesterol en las membranas plasmáticas de los ratones Twitcher a medida que avanza la enfermedad, siendo mucho más abundante en la fracción vesicular  $V_0$  en etapas avanzadas (finales) de la enfermedad. Al mismo tiempo, se observa que no hay cambios en los niveles totales de colesterol, lo que significa que no se trata de un problema de síntesis o eliminación del mismo, sino que hay es una reacomodación dentro de las células. Toda esta evidencia concuerda con un patrón de acción de la psicosisina concordante con una perturbación en la constitución membranal más que una interacción específica de este esfingolípido con alguna proteína en particular. Esta conclusión es confirmada por Hawkins-Salsbury, et. al., 2013

(23), quienes usaron un enantiómero de psicossina para distinguir entre interacciones psicossina-proteína y psicossina-membrana, obteniendo el mismo resultado.

Hay que destacar que hay una menor cantidad de colesterol total en etapas tempranas de la enfermedad en ratones Twitcher (Figura 27, A), la cual, se presume, es causada por los defectos tempranos observados y demostrados previamente en cuanto a la capacidad de diferenciación y síntesis de componentes celulares en el sistema nervioso de los ratones Twitcher (13). No obstante, tal y como puede observarse en la misma figura, en ratones adultos, los niveles de colesterol son equivalentes entre los ratones Twitcher y los WT, legitimando las observaciones anteriormente discutidas.

#### *7.4.4. Niveles de fosforilación de los motores moleculares del transporte axonal en ratones Twitcher y WT.*

Para continuar validando la hipótesis de deterioro del transporte axonal posterior al desacople de las balsas lipídicas, se evaluaron los niveles de fosforilación de las kinesinas de cadena ligera y pesada (KLC y KHC, respectivamente), y se determinó que en ratones Twitcher hay una desregulación en su actividad, por consiguiente, en transporte axonal rápido alterado podría ser un mecanismo patogénico que promueve la desmielinización y la axonopatía observadas, además de muchos otros defectos advertidos en KD, tales como la disminución en la velocidad de conducción nerviosa, el mantenimiento en las concentraciones iónicas fisiológicas, etc.

Una posibilidad es que la psicossina pueda modificar las actividades de las moléculas GSK3- $\beta$  y/o PP1, mediante la regulación de su interacción con las membranas, que a su vez están siendo afectadas por la acumulación de psicossina en los microdominios estructurales asociados a vías de señalización. Por tanto, dirigir los esfuerzos terapéuticos al restablecimiento o a contrarrestar los efectos de la psicossina sobre las vías de señalización asociadas a las membranas celulares puede ser una alternativa promisoriosa cuya validez está oportada por el presente trabajo.

*7.4.5. Modelo de transporte y acumulación de la psicossina en el sistema nervioso y su asociación con PPARs, IGF-1 y vías de supervivencia y proliferación.*

Reuniendo todos los resultados obtenidos, sugerimos un modelo que estructura los posibles mecanismos de acumulación de la psicossina y de neuroprotección conferida por los agonistas de PPARs e IGF-1.

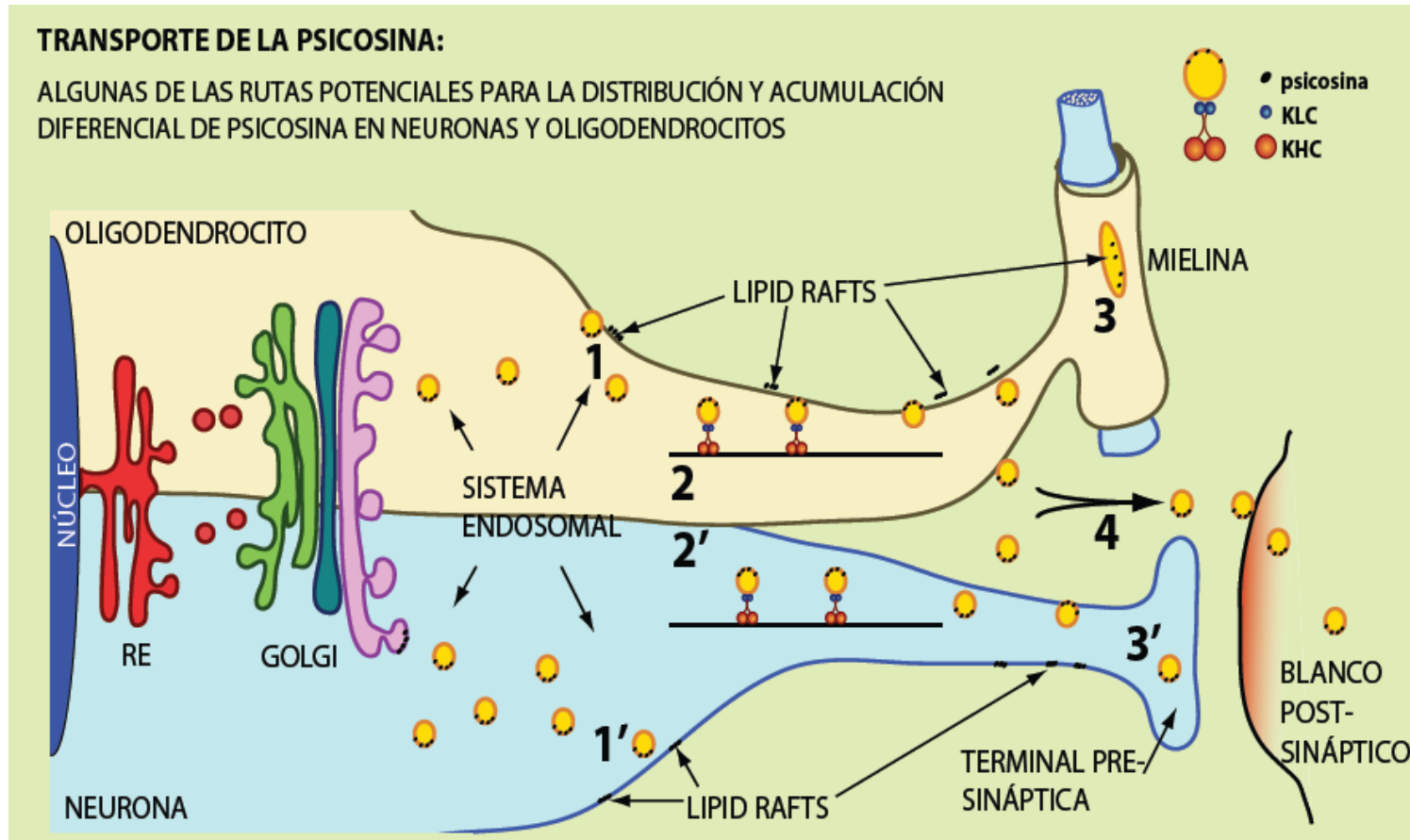
Los niveles más altos de psicossina en las regiones distales de los nervios periféricos estudiados indican diferencias regionales en su síntesis a lo largo de los mismos y/o un transporte axonal anormal de las vesículas que contienen psicossina. Adicionalmente, se puede inferir que durante la enfermedad, la psicossina se acumula primero en el plasmalema (fracción V0) y luego también en las fracciones endosomales (V1), apuntando a un mecanismo de saturación. Por otra parte, la acumulación de la psicossina en las fracciones V1 coincide con una fosforilación marcada de KLC; y que el colesterol parece ser progresivamente acumulado en las fracciones de la membrana plasmática (V0), correlacionándose con incrementos de psicossina. Todos estos resultados muestran que la psicossina parece asociarse en primer lugar con membranas ricas en balsas lipídicas. La psicossina puede ser transportada usando vesículas mediadas por motores moleculares, en donde ésta puede activar directamente un mecanismo patogénico mediado por GSK3- $\beta$  que produce la axonopatía (Figura 29).

Como consecuencia de la disrupción en la arquitectura de los lipid rafts, las vías de señalización de supervivencia quedan desacopladas, lo que conduce a un aumento en la progresión y patogenia de la enfermedad. Esta presunción está soportada por estudios previos que muestran que los lipid rafts están acoplados a las principales vías de proliferación y supervivencia (incluidas las mencionadas Akt y ERK) (153-155), por tal razón es de suponer que estas vías se encuentran alteradas y pueden participar en la rápida evolución de la enfermedad. En contraste, tal y como se demostró en el presente estudio, la aplicación de agonistas de PPAR e IGF-1 pueden contrarrestar estos mecanismos mediante, bien sea la reactivación de las vías de señalización afectadas de manera directa, o indirectamente reconfigurando las balsas lipídicas que están siendo deterioradas. Al respecto, Camacho A., et al., 2013, mostraron que el coactivador de PPAR $\gamma$ , PGC1 $\alpha$ , coordina el metabolismo de los esfingolípidos, la composición de los lipid rafts y la síntesis de mielina en ratones (156),



lo que constituye otra prueba de la acción de los PPAR como posible alternativa para el tratamiento de esta enfermedad.

Ese trabajo brinda herramientas suficientes y contundentes sobre los mecanismos patogénicos de KD, al mismo tiempo que presenta dos nuevos modelos para el estudio de la enfermedad y, por supuesto, propone nuevas estrategias para el futuro tratamiento de esta incurable anomalía genética. Consideramos que éste, junto con otros trabajos que se vienen realizando en el grupo de investigación representa avances ineludibles para el entendimiento de esta y de otras enfermedades relacionadas tanto con la desmielinización asociada a deficiencias enzimáticas, como la leucodistrofia metacromática, sino también a otras patologías que involucran neurodegeneración o muerte celular inducida por mecanismos membranales o desequilibrio en el metabolismo lipídico.



**Figura 29.** Modelo propuesto para el transporte y distribución de la psicosisina en el sistema nervioso. La psicosisina es sintetizada en el complejo RE-Golgi e insertada en microdominios endosomales. Los endosomas que contienen psicosisina pueden fusionarse con membrana plasmática alcanzando los dominios de las balsas lipídicas (1-1') o pueden ser transportados por motores moleculares (2-2') hacia la mielina y los dominios sinápticos (3-3'), e incluso pueden ser secretados al medio extracelular a través de vesículas secretoras o exosomas (4) y ser captados por células vecinas.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Suzuki K. Globoid cell leukodystrophy (Krabbe's disease): update. *Journal of child neurology*. 2003;18(9):595-603.
2. Nagara H, Ogawa H, Sato Y, Kobayashi T, Suzuki K. The twitcher mouse: degeneration of oligodendrocytes in vitro. *Brain research*. 1986;391(1):79-84.
3. Tanaka K, Nagara H, Kobayashi T, Goto I. The twitcher mouse: accumulation of galactosylsphingosine and pathology of the sciatic nerve. *Brain research*. 1988;454(1-2):340-6.
4. Hagberg B. Krabbe's disease: clinical presentation of neurological variants. *Neuropediatrics*. 1984;15 Suppl:11-5.
5. Wenger DA, Rafi MA, Luzi P. Molecular genetics of Krabbe disease (globoid cell leukodystrophy): diagnostic and clinical implications. *Human mutation*. 1997;10(4):268-79.
6. Rafi MA, Luzi P, Zlotogora J, Wenger DA. Two different mutations are responsible for Krabbe disease in the Druze and Moslem Arab populations in Israel. *Human genetics*. 1996;97(3):304-8.
7. McGraw P, Liang L, Escolar M, Mukundan S, Kurtzberg J, Provenzale JM. Krabbe disease treated with hematopoietic stem cell transplantation: serial assessment of anisotropy measurements--initial experience. *Radiology*. 2005;236(1):221-30.
8. Kassmann CM, Nave KA. Oligodendroglial impact on axonal function and survival - a hypothesis. *Current opinion in neurology*. 2008;21(3):235-41.
9. Dubois-Dalcq M, Williams A, Stadelmann C, Stankoff B, Zalc B, Lubetzki C. From fish to man: understanding endogenous remyelination in central nervous system demyelinating diseases. *Brain : a journal of neurology*. 2008;131(Pt 7):1686-700.
10. Hossain MA, Otomo T, Saito S, Ohno K, Sakuraba H, Hamada Y, et al. Late-onset Krabbe disease is predominant in Japan and its mutant precursor protein undergoes more effective processing than the infantile-onset form. *Gene*. 2013.
11. Lee WC, Kang D, Causevic E, Herdt AR, Eckman EA, Eckman CB. Molecular characterization of mutations that cause globoid cell leukodystrophy and pharmacological

rescue using small molecule chemical chaperones. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2010;30(16):5489-97.

12. Suzuki K, Suzuki K. The twitcher mouse. A model of human globoid cell leukodystrophy (krabbe's disease). *The American journal of pathology*. 1983;111(3):394-7.
13. Suzuki K, Taniike M. Murine model of genetic demyelinating disease: the twitcher mouse. *Microscopy research and technique*. 1995;32(3):204-14.
14. Kolodny EH, Raghavan S, Krivit W. Late-onset Krabbe disease (globoid cell leukodystrophy): clinical and biochemical features of 15 cases. *Developmental neuroscience*. 1991;13(4-5):232-9.
15. Loes DJ, Peters C, Krivit W. Globoid cell leukodystrophy: distinguishing early-onset from late-onset disease using a brain MR imaging scoring method. *AJNR American journal of neuroradiology*. 1999;20(2):316-23.
16. Haq E, Giri S, Singh I, Singh AK. Molecular mechanism of psychosine-induced cell death in human oligodendrocyte cell line. *Journal of neurochemistry*. 2003;86(6):1428-40.
17. Giri S, Khan M, Rattan R, Singh I, Singh AK. Krabbe disease: psychosine-mediated activation of phospholipase A2 in oligodendrocyte cell death. *Journal of lipid research*. 2006;47(7):1478-92.
18. Haq E, Contreras MA, Giri S, Singh I, Singh AK. Dysfunction of peroxisomes in twitcher mice brain: a possible mechanism of psychosine-induced disease. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006;343(1):229-38.
19. Khan M, Haq E, Giri S, Singh I, Singh AK. Peroxisomal participation in psychosine-mediated toxicity: implications for Krabbe's disease. *Journal of neuroscience research*. 2005;80(6):845-54.
20. Zaka M, Rafi MA, Rao HZ, Luzzi P, Wenger DA. Insulin-like growth factor-1 provides protection against psychosine-induced apoptosis in cultured mouse oligodendrocyte progenitor cells using primarily the PI3K/Akt pathway. *Molecular and cellular neurosciences*. 2005;30(3):398-407.
21. Kanazawa T, Nakamura S, Momoi M, Yamaji T, Takematsu H, Yano H, et al. Inhibition of cytokinesis by a lipid metabolite, psychosine. *The Journal of cell biology*. 2000;149(4):943-50.

22. White AB, Givogri MI, Lopez-Rosas A, Cao H, van Breemen R, Thinakaran G, et al. Psychosine accumulates in membrane microdomains in the brain of krabbe patients, disrupting the raft architecture. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2009;29(19):6068-77.
23. Hawkins-Salsbury JA, Parameswar AR, Jiang X, Schlesinger PH, Bongarzone E, Ory DS, et al. Psychosine, the cytotoxic sphingolipid that accumulates in globoid cell leukodystrophy, alters membrane architecture. *Journal of lipid research*. 2013;54(12):3303-11.
24. White AB, Galbiati F, Givogri MI, Lopez Rosas A, Qiu X, van Breemen R, et al. Persistence of psychosine in brain lipid rafts is a limiting factor in the therapeutic recovery of a mouse model for Krabbe disease. *Journal of neuroscience research*. 2011;89(3):352-64.
25. Jatana M, Giri S, Singh AK. Apoptotic positive cells in Krabbe brain and induction of apoptosis in rat C6 glial cells by psychosine. *Neuroscience letters*. 2002;330(2):183-7.
26. Smith B, Galbiati F, Castelvetti LC, Givogri MI, Lopez-Rosas A, Bongarzone ER. Peripheral neuropathy in the Twitcher mouse involves the activation of axonal caspase 3. *ASN neuro*. 2011;3(4).
27. Meyer zu Heringdorf D, Jakobs KH. Lysophospholipid receptors: signalling, pharmacology and regulation by lysophospholipid metabolism. *Biochimica et biophysica acta*. 2007;1768(4):923-40.
28. Seuwen K, Ludwig MG, Wolf RM. Receptors for protons or lipid messengers or both? *Journal of receptor and signal transduction research*. 2006;26(5-6):599-610.
29. Ihara Y, Kihara Y, Hamano F, Yanagida K, Morishita Y, Kunita A, et al. The G protein-coupled receptor T-cell death-associated gene 8 (TDAG8) facilitates tumor development by serving as an extracellular pH sensor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(40):17309-14.
30. Wang JQ, Kon J, Mogi C, Tobo M, Damirin A, Sato K, et al. TDAG8 is a proton-sensing and psychosine-sensitive G-protein-coupled receptor. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(44):45626-33.
31. Giri S, Jatana M, Rattan R, Won JS, Singh I, Singh AK. Galactosylsphingosine (psychosine)-induced expression of cytokine-mediated inducible nitric oxide synthases via

AP-1 and C/EBP: implications for Krabbe disease. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2002;16(7):661-72.

32. Giri S, Khan M, Nath N, Singh I, Singh AK. The role of AMPK in psychosine mediated effects on oligodendrocytes and astrocytes: implication for Krabbe disease. *Journal of neurochemistry*. 2008;105(5):1820-33.
33. Snook ER, Fisher-Perkins JM, Sansing HA, Lee KM, Alvarez X, Maclean AG, et al. Innate Immune Activation in the Pathogenesis of a Murine Model of Globoid Cell Leukodystrophy. *The American journal of pathology*. 2013.
34. Tan NS, Michalik L, Desvergne B, Wahli W. Multiple expression control mechanisms of peroxisome proliferator-activated receptors and their target genes. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2005;93(2-5):99-105.
35. Castelvetti LC, Givogri MI, Zhu H, Smith B, Lopez-Rosas A, Qiu X, et al. Axonopathy is a compounding factor in the pathogenesis of Krabbe disease. *Acta neuropathologica*. 2011;122(1):35-48.
36. Cantuti-Castelvetti L, Zhu H, Givogri MI, Chidavaenzi RL, Lopez-Rosas A, Bongarzone ER. Psychosine induces the dephosphorylation of neurofilaments by deregulation of PP1 and PP2A phosphatases. *Neurobiology of disease*. 2012;46(2):325-35.
37. Cantuti Castelvetti L, Givogri MI, Hebert A, Smith B, Song Y, Kaminska A, et al. The sphingolipid psychosine inhibits fast axonal transport in Krabbe disease by activation of GSK3beta and deregulation of molecular motors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2013;33(24):10048-56.
38. Mitsuo K, Kobayashi T, Shinnoh N, Goto I. Biosynthesis of galactosylsphingosine (psychosine) in the twitcher mouse. *Neurochemical research*. 1989;14(9):899-903.
39. Luzzi P, Rafi MA, Wenger DA. Structure and organization of the human galactocerebrosidase (GALC) gene. *Genomics*. 1995;26(2):407-9.
40. Zlotogora J, Chakraborty S, Knowlton RG, Wenger DA. Krabbe disease locus mapped to chromosome 14 by genetic linkage. *American journal of human genetics*. 1990;47(1):37-44.
41. Escher P, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions. *Mutation research*. 2000;448(2):121-38.

42. Monsalve FA, Pyarasani RD, Delgado-Lopez F, Moore-Carrasco R. Peroxisome proliferator-activated receptor targets for the treatment of metabolic diseases. *Mediators of inflammation*. 2013;2013:549627.
43. Lemberger T, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: a nuclear receptor signaling pathway in lipid physiology. *Annual review of cell and developmental biology*. 1996;12:335-63.
44. Papaetis GS, Orphanidou D, Panagiotou TN. Thiazolidinediones and type 2 diabetes: from cellular targets to cardiovascular benefit. *Current drug targets*. 2011;12(10):1498-512.
45. Etgen GJ, Mantlo N. PPAR ligands for metabolic disorders. *Current topics in medicinal chemistry*. 2003;3(14):1649-61.
46. Hondares E, Mora O, Yubero P, Rodriguez de la Concepcion M, Iglesias R, Giralt M, et al. Thiazolidinediones and rexinoids induce peroxisome proliferator-activated receptor-coactivator (PGC)-1alpha gene transcription: an autoregulatory loop controls PGC-1alpha expression in adipocytes via peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivation. *Endocrinology*. 2006;147(6):2829-38.
47. Shao D, Liu Y, Liu X, Zhu L, Cui Y, Cui A, et al. PGC-1 beta-regulated mitochondrial biogenesis and function in myotubes is mediated by NRF-1 and ERR alpha. *Mitochondrion*. 2010;10(5):516-27.
48. Spiegelman BM. Transcriptional control of energy homeostasis through the PGC1 coactivators. *Novartis Foundation symposium*. 2007;286:3-6; discussion -12, 162-3, 96-203.
49. Rohas LM, St-Pierre J, Uldry M, Jager S, Handschin C, Spiegelman BM. A fundamental system of cellular energy homeostasis regulated by PGC-1alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(19):7933-8.
50. Wu JS, Lin TN, Wu KK. Rosiglitazone and PPAR-gamma overexpression protect mitochondrial membrane potential and prevent apoptosis by upregulating anti-apoptotic Bcl-2 family proteins. *Journal of cellular physiology*. 2009;220(1):58-71.

51. Ding G, Cheng L, Qin Q, Frontin S, Yang Q. PPARdelta modulates lipopolysaccharide-induced TNFalpha inflammation signaling in cultured cardiomyocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2006;40(6):821-8.
52. Schnegg CI, Robbins ME. Neuroprotective Mechanisms of PPARdelta: Modulation of Oxidative Stress and Inflammatory Processes. *PPAR research*. 2011;2011:373560.
53. Fajas L, Debril MB, Auwerx J. PPAR gamma: an essential role in metabolic control. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD*. 2001;11(1):64-9.
54. Barbier O, Torra IP, Duguay Y, Blanquart C, Fruchart JC, Glineur C, et al. Pleiotropic actions of peroxisome proliferator-activated receptors in lipid metabolism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2002;22(5):717-26.
55. Heneka MT, Landreth GE. PPARs in the brain. *Biochimica et biophysica acta*. 2007;1771(8):1031-45.
56. Saluja I, Granneman JG, Skoff RP. PPAR delta agonists stimulate oligodendrocyte differentiation in tissue culture. *Glia*. 2001;33(3):191-204.
57. Roth AD, Leisewitz AV, Jung JE, Cassina P, Barbeito L, Inestrosa NC, et al. PPAR gamma activators induce growth arrest and process extension in B12 oligodendrocyte-like cells and terminal differentiation of cultured oligodendrocytes. *Journal of neuroscience research*. 2003;72(4):425-35.
58. Bernardo A, Bianchi D, Magnaghi V, Minghetti L. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists promote differentiation and antioxidant defenses of oligodendrocyte progenitor cells. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2009;68(7):797-808.
59. De Nuccio C, Bernardo A, De Simone R, Mancuso E, Magnaghi V, Visentin S, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists accelerate oligodendrocyte maturation and influence mitochondrial functions and oscillatory Ca(2+) waves. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2011;70(10):900-12.
60. Zhou H, Summers SA, Birnbaum MJ, Pittman RN. Inhibition of Akt kinase by cell-permeable ceramide and its implications for ceramide-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(26):16568-75.
61. Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annual review of neuroscience*. 2001;24:677-736.



62. Kandel ES, Hay N. The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Experimental cell research*. 1999;253(1):210-29.
63. Kaplan DR, Cooper E. PI-3 kinase and IP3: partners in NT3-induced synaptic transmission. *Nature neuroscience*. 2001;4(1):5-7.
64. Kaplan DR, Miller FD. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Current opinion in neurobiology*. 2000;10(3):381-91.
65. Huang EJ, Reichardt LF. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annual review of biochemistry*. 2003;72:609-42.
66. Chao MV. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nature reviews Neuroscience*. 2003;4(4):299-309.
67. Bibel M, Barde YA. Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes & development*. 2000;14(23):2919-37.
68. Dudek H, Datta SR, Franke TF, Birnbaum MJ, Yao R, Cooper GM, et al. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science (New York, NY)*. 1997;275(5300):661-5.
69. Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell*. 1997;88(4):435-7.
70. Kennedy SG, Wagner AJ, Conzen SD, Jordan J, Bellacosa A, Tsichlis PN, et al. The PI 3-kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal. *Genes & development*. 1997;11(6):701-13.
71. Tanti JF, Grillo S, Gremeaux T, Coffier PJ, Van Obberghen E, Le Marchand-Brustel Y. Potential role of protein kinase B in glucose transporter 4 translocation in adipocytes. *Endocrinology*. 1997;138(5):2005-10.
72. Marte BM, Downward J. PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond. *Trends in biochemical sciences*. 1997;22(9):355-8.
73. Zheng WH, Kar S, Quirion R. Insulin-like growth factor-1-induced phosphorylation of transcription factor FKHRL1 is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase/Akt kinase and role of this pathway in insulin-like growth factor-1-induced survival of cultured hippocampal neurons. *Molecular pharmacology*. 2002;62(2):225-33.

74. Kennedy SG, Kandel ES, Cross TK, Hay N. Akt/Protein kinase B inhibits cell death by preventing the release of cytochrome c from mitochondria. *Molecular and cellular biology*. 1999;19(8):5800-10.
75. Gao N, Zhang Z, Jiang BH, Shi X. Role of PI3K/AKT/mTOR signaling in the cell cycle progression of human prostate cancer. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003;310(4):1124-32.
76. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*. 1997;91(2):231-41.
77. Brunet A, Datta SR, Greenberg ME. Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Current opinion in neurobiology*. 2001;11(3):297-305.
78. Rokudai S, Fujita N, Hashimoto Y, Tsuruo T. Cleavage and inactivation of antiapoptotic Akt/PKB by caspases during apoptosis. *Journal of cellular physiology*. 2000;182(2):290-6.
79. Zheng WH, Kar S, Dore S, Quirion R. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1): a neuroprotective trophic factor acting via the Akt kinase pathway. *Journal of neural transmission Supplementum*. 2000(60):261-72.
80. Vander Heiden MG, Plas DR, Rathmell JC, Fox CJ, Harris MH, Thompson CB. Growth factors can influence cell growth and survival through effects on glucose metabolism. *Molecular and cellular biology*. 2001;21(17):5899-912.
81. Plas DR, Talapatra S, Edinger AL, Rathmell JC, Thompson CB. Akt and Bcl-xL promote growth factor-independent survival through distinct effects on mitochondrial physiology. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(15):12041-8.
82. Hajduch E, Alessi DR, Hemmings BA, Hundal HS. Constitutive activation of protein kinase B alpha by membrane targeting promotes glucose and system A amino acid transport, protein synthesis, and inactivation of glycogen synthase kinase 3 in L6 muscle cells. *Diabetes*. 1998;47(7):1006-13.
83. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*. 1995;378(6559):785-9.

84. Hajduch E, Litherland GJ, Hundal HS. Protein kinase B (PKB/Akt)--a key regulator of glucose transport? *FEBS letters*. 2001;492(3):199-203.
85. Coffey PJ, Jin J, Woodgett JR. Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *The Biochemical journal*. 1998;335 ( Pt 1):1-13.
86. Vander Heiden MG, Chandel NS, Schumacker PT, Thompson CB. Bcl-xL prevents cell death following growth factor withdrawal by facilitating mitochondrial ATP/ADP exchange. *Molecular cell*. 1999;3(2):159-67.
87. Vander Heiden MG, Chandel NS, Li XX, Schumacker PT, Colombini M, Thompson CB. Outer mitochondrial membrane permeability can regulate coupled respiration and cell survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(9):4666-71.
88. Rathmell JC, Vander Heiden MG, Harris MH, Frauwirth KA, Thompson CB. In the absence of extrinsic signals, nutrient utilization by lymphocytes is insufficient to maintain either cell size or viability. *Molecular cell*. 2000;6(3):683-92.
89. Moley KH, Mueckler MM. Glucose transport and apoptosis. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. 2000;5(2):99-105.
90. Gottlob K, Majewski N, Kennedy S, Kandel E, Robey RB, Hay N. Inhibition of early apoptotic events by Akt/PKB is dependent on the first committed step of glycolysis and mitochondrial hexokinase. *Genes & development*. 2001;15(11):1406-18.
91. Arai K, Lo EH. Astrocytes protect oligodendrocyte precursor cells via MEK/ERK and PI3K/Akt signaling. *Journal of neuroscience research*. 2010;88(4):758-63.
92. Narayanan SP, Flores AI, Wang F, Macklin WB. Akt signals through the mammalian target of rapamycin pathway to regulate CNS myelination. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2009;29(21):6860-70.
93. Flores AI, Narayanan SP, Morse EN, Shick HE, Yin X, Kidd G, et al. Constitutively active Akt induces enhanced myelination in the CNS. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2008;28(28):7174-83.
94. Arboleda G, Morales LC, Benitez B, Arboleda H. Regulation of ceramide-induced neuronal death: cell metabolism meets neurodegeneration. *Brain research reviews*. 2009;59(2):333-46.

95. Benarroch EE. Insulin-like growth factors in the brain and their potential clinical implications. *Neurology*. 2012;79(21):2148-53.
96. van der Heide LP, Ramakers GM, Smidt MP. Insulin signaling in the central nervous system: learning to survive. *Progress in neurobiology*. 2006;79(4):205-21.
97. Fernandez AM, Torres-Aleman I. The many faces of insulin-like peptide signalling in the brain. *Nature reviews Neuroscience*. 2012;13(4):225-39.
98. Russo VC, Gluckman PD, Feldman EL, Werther GA. The insulin-like growth factor system and its pleiotropic functions in brain. *Endocrine reviews*. 2005;26(7):916-43.
99. D'Ercole AJ, Ye P, Calikoglu AS, Gutierrez-Ospina G. The role of the insulin-like growth factors in the central nervous system. *Molecular neurobiology*. 1996;13(3):227-55.
100. Belfiore A, Genua M, Malaguarnera R. PPAR-gamma agonists and their effects on IGF-I receptor signaling: Implications for cancer. *PPAR research*. 2009;2009:830501.
101. Cui QL, Almazan G. IGF-I-induced oligodendrocyte progenitor proliferation requires PI3K/Akt, MEK/ERK, and Src-like tyrosine kinases. *Journal of neurochemistry*. 2007;100(6):1480-93.
102. Bibollet-Bahena O, Almazan G. IGF-1-stimulated protein synthesis in oligodendrocyte progenitors requires PI3K/mTOR/Akt and MEK/ERK pathways. *Journal of neurochemistry*. 2009;109(5):1440-51.
103. Pang Y, Zheng B, Fan LW, Rhodes PG, Cai Z. IGF-1 protects oligodendrocyte progenitors against TNFalpha-induced damage by activation of PI3K/Akt and interruption of the mitochondrial apoptotic pathway. *Glia*. 2007;55(11):1099-107.
104. Motomura W, Okumura T, Takahashi N, Obara T, Kohgo Y. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by troglitazone inhibits cell growth through the increase of p27Kip1 in human. Pancreatic carcinoma cells. *Cancer research*. 2000;60(19):5558-64.
105. Hashimoto K, Farrow BJ, Evers BM. Activation and role of MAP kinases in 15d-PGJ2-induced apoptosis in the human pancreatic cancer cell line MIA PaCa-2. *Pancreas*. 2004;28(2):153-9.
106. Lennon AM, Ramauge M, Dessouroux A, Pierre M. MAP kinase cascades are activated in astrocytes and preadipocytes by 15-deoxy-Delta(12-14)-prostaglandin J(2) and the thiazolidinedione ciglitazone through peroxisome proliferator activator receptor

gamma-independent mechanisms involving reactive oxygenated species. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(33):29681-5.

107. Zhang B, Berger J, Zhou G, Elbrecht A, Biswas S, White-Carrington S, et al. Insulin- and mitogen-activated protein kinase-mediated phosphorylation and activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(50):31771-4.

108. Adams M, Reginato MJ, Shao D, Lazar MA, Chatterjee VK. Transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma is inhibited by phosphorylation at a consensus mitogen-activated protein kinase site. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(8):5128-32.

109. Hu E, Kim JB, Sarraf P, Spiegelman BM. Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPARgamma. *Science (New York, NY)*. 1996;274(5295):2100-3.

110. Burgermeister E, Chuderland D, Hanoch T, Meyer M, Liscovitch M, Seger R. Interaction with MEK causes nuclear export and downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Molecular and cellular biology*. 2007;27(3):803-17.

111. Aiello A, Pandini G, Frasca F, Conte E, Murabito A, Sacco A, et al. Peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma agonists induce partial reversion of epithelial-mesenchymal transition in anaplastic thyroid cancer cells. *Endocrinology*. 2006;147(9):4463-75.

112. Cao LQ, Chen XL, Wang Q, Huang XH, Zhen MC, Zhang LJ, et al. Upregulation of PTEN involved in rosiglitazone-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *Acta pharmacologica Sinica*. 2007;28(6):879-87.

113. Zhang W, Wu N, Li Z, Wang L, Jin J, Zha XL. PPARgamma activator rosiglitazone inhibits cell migration via upregulation of PTEN in human hepatocarcinoma cell line BEL-7404. *Cancer biology & therapy*. 2006;5(8):1008-14.

114. Patel L, Pass I, Coxon P, Downes CP, Smith SA, Macphee CH. Tumor suppressor and anti-inflammatory actions of PPARgamma agonists are mediated via upregulation of PTEN. *Current biology : CB*. 2001;11(10):764-8.

115. Han S, Roman J. Rosiglitazone suppresses human lung carcinoma cell growth through PPARgamma-dependent and PPARgamma-independent signal pathways. *Molecular cancer therapeutics*. 2006;5(2):430-7.
116. Lee SY, Hur GY, Jung KH, Jung HC, Lee SY, Kim JH, et al. PPAR-gamma agonist increase gefitinib's antitumor activity through PTEN expression. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*. 2006;51(3):297-301.
117. Cho DH, Choi YJ, Jo SA, Ryou J, Kim JY, Chung J, et al. Troglitazone acutely inhibits protein synthesis in endothelial cells via a novel mechanism involving protein phosphatase 2A-dependent p70 S6 kinase inhibition. *American journal of physiology Cell physiology*. 2006;291(2):C317-26.
118. He G, Sung YM, Digiovanni J, Fischer SM. Thiazolidinediones inhibit insulin-like growth factor-i-induced activation of p70S6 kinase and suppress insulin-like growth factor-I tumor-promoting activity. *Cancer research*. 2006;66(3):1873-8.
119. Lecka-Czernik B, Ackert-Bicknell C, Adamo ML, Marmolejos V, Churchill GA, Shockley KR, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) by rosiglitazone suppresses components of the insulin-like growth factor regulatory system in vitro and in vivo. *Endocrinology*. 2007;148(2):903-11.
120. Theocharis S, Margeli A, Vielh P, Kouraklis G. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands as cell-cycle modulators. *Cancer treatment reviews*. 2004;30(6):545-54.
121. Freudlsperger C, Moll I, Schumacher U, Thies A. Anti-proliferative effect of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists on human malignant melanoma cells in vitro. *Anti-cancer drugs*. 2006;17(3):325-32.
122. McLaurin J, Trudel GC, Shaw IT, Antel JP, Cashman NR. A human glial hybrid cell line differentially expressing genes subserving oligodendrocyte and astrocyte phenotype. *Journal of neurobiology*. 1995;26(2):283-93.
123. Buntinx M, Vanderlocht J, Hellings N, Vandenabeele F, Lambrichts I, Raus J, et al. Characterization of three human oligodendroglial cell lines as a model to study oligodendrocyte injury: morphology and oligodendrocyte-specific gene expression. *Journal of neurocytology*. 2003;32(1):25-38.

124. Morfini G, Szebenyi G, Brown H, Pant HC, Pigo G, DeBoer S, et al. A novel CDK5-dependent pathway for regulating GSK3 activity and kinesin-driven motility in neurons. *The EMBO journal*. 2004;23(11):2235-45.
125. Contreras MA, Ries WL, Shanmugarajan S, Arboleda G, Singh I, Singh AK. Factors that affect postnatal bone growth retardation in the twitcher murine model of Krabbe disease. *Biochimica et biophysica acta*. 2010;1802(7-8):601-8.
126. Contreras MA, Haq E, Uto T, Singh I, Singh AK. Psychosine-induced alterations in peroxisomes of twitcher mouse liver. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2008;477(2):211-8.
127. Guardiola-Diaz HM, Ishii A, Bansal R. Erk1/2 MAPK and mTOR signaling sequentially regulates progression through distinct stages of oligodendrocyte differentiation. *Glia*. 2012;60(3):476-86.
128. Galbiati F, Basso V, Cantuti L, Givogri MI, Lopez-Rosas A, Perez N, et al. Autonomic denervation of lymphoid organs leads to epigenetic immune atrophy in a mouse model of Krabbe disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2007;27(50):13730-8.
129. Belleri M, Ronca R, Coltrini D, Nico B, Ribatti D, Poliani PL, et al. Inhibition of angiogenesis by beta-galactosylceramidase deficiency in globoid cell leukodystrophy. *Brain : a journal of neurology*. 2013;136(Pt 9):2859-75.
130. Won JS, Kim J, Paintlia MK, Singh I, Singh AK. Role of endogenous psychosine accumulation in oligodendrocyte differentiation and survival: implication for Krabbe disease. *Brain research*. 2013;1508:44-52.
131. Mandrekar-Colucci S, Sauerbeck A, Popovich PG, McTigue DM. PPAR agonists as therapeutics for CNS trauma and neurological diseases. *ASN neuro*. 2013;5(5):e00129.
132. Small DM, Morais C, Coombes JS, Bennett NC, Johnson DW, Gobe GC. Oxidative stress-induced alterations in PPAR-gamma and associated mitochondrial destabilization contribute to kidney cell apoptosis. *American journal of physiology Renal physiology*. 2014;307(7):F814-22.
133. Kanakasabai S, Pestereva E, Chearwae W, Gupta SK, Ansari S, Bright JJ. PPARgamma agonists promote oligodendrocyte differentiation of neural stem cells by modulating stemness and differentiation genes. *PloS one*. 2012;7(11):e50500.

134. Li M, Lee TW, Yim AP, Mok TS, Chen GG. Apoptosis induced by troglitazone is both peroxisome proliferator-activated receptor-gamma- and ERK-dependent in human non-small lung cancer cells. *Journal of cellular physiology*. 2006;209(2):428-38.
135. Aleshin S, Strokin M, Sergeeva M, Reiser G. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)beta/delta, a possible nexus of PPARalpha- and PPARgamma-dependent molecular pathways in neurodegenerative diseases: Review and novel hypotheses. *Neurochemistry international*. 2013;63(4):322-30.
136. Aleshin S, Reiser G. Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta (PPARbeta/delta) protects against ceramide-induced cellular toxicity in rat brain astrocytes and neurons by activation of ceramide kinase. *Molecular and cellular neurosciences*. 2014;59:127-34.
137. Moran E, Ding L, Wang Z, Cheng R, Chen Q, Moore R, et al. Protective and antioxidant effects of PPARalpha in the ischemic retina. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2014;55(7):4568-76.
138. Hawkins-Salsbury JA, Qin EY, Reddy AS, Vogler CA, Sands MS. Oxidative stress as a therapeutic target in globoid cell leukodystrophy. *Experimental neurology*. 2012;237(2):444-52.
139. Sun Y, Zheng B, Zhang XH, He M, Guo ZW, Wen JK. PPAR-gamma agonist stabilizes KLF4 protein via activating Akt signaling and reducing KLF4 ubiquitination. *Biochemical and biophysical research communications*. 2014;443(2):382-8.
140. Kilter H, Werner M, Roggia C, Reil JC, Schafers HJ, Kintscher U, et al. The PPAR-gamma agonist rosiglitazone facilitates Akt rephosphorylation and inhibits apoptosis in cardiomyocytes during hypoxia/reoxygenation. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2009;11(11):1060-7.
141. Huang W, Andras IE, Rha GB, Hennig B, Toborek M. PPARalpha and PPARgamma protect against HIV-1-induced MMP-9 overexpression via caveolae-associated ERK and Akt signaling. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2011;25(11):3979-88.
142. Lee JE, Park JH, Jang SJ, Koh HC. Rosiglitazone inhibits chlorpyrifos-induced apoptosis via modulation of the oxidative stress and inflammatory response in SH-SY5Y cells. *Toxicology and applied pharmacology*. 2014;278(2):159-71.



143. Bulhak AA, Jung C, Ostenson CG, Lundberg JO, Sjoquist PO, Pernow J. PPAR-alpha activation protects the type 2 diabetic myocardium against ischemia-reperfusion injury: involvement of the PI3-Kinase/Akt and NO pathway. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2009;296(3):H719-27.
144. Grabacka M, Plonka PM, Urbanska K, Reiss K. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation decreases metastatic potential of melanoma cells in vitro via down-regulation of Akt. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2006;12(10):3028-36.
145. Djouadi F, Weinheimer CJ, Saffitz JE, Pitchford C, Bastin J, Gonzalez FJ, et al. A gender-related defect in lipid metabolism and glucose homeostasis in peroxisome proliferator- activated receptor alpha- deficient mice. *The Journal of clinical investigation*. 1998;102(6):1083-91.
146. Esposito E, Paterniti I, Meli R, Bramanti P, Cuzzocrea S. GW0742, a high-affinity PPAR-delta agonist, mediates protection in an organotypic model of spinal cord damage. *Spine*. 2012;37(2):E73-8.
147. Jana M, Mondal S, Gonzalez FJ, Pahan K. Gemfibrozil, a lipid-lowering drug, increases myelin genes in human oligodendrocytes via peroxisome proliferator-activated receptor-beta. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(41):34134-48.
148. Polak PE, Kalinin S, Dello Russo C, Gavrilyuk V, Sharp A, Peters JM, et al. Protective effects of a peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta agonist in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroimmunology*. 2005;168(1-2):65-75.
149. Lewis S. Glia: Transporting cargo from A to B. *Nature reviews Neuroscience*. 2013;14(9):589.
150. Fruhbeis C, Frohlich D, Kuo WP, Amphornrat J, Thilemann S, Saab AS, et al. Neurotransmitter-triggered transfer of exosomes mediates oligodendrocyte-neuron communication. *PLoS biology*. 2013;11(7):e1001604.
151. Fitzner D, Schnaars M, van Rossum D, Krishnamoorthy G, Dibaj P, Bakhti M, et al. Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis. *Journal of cell science*. 2011;124(Pt 3):447-58.

152. Kramer-Albers EM, Bretz N, Tenzer S, Winterstein C, Mobius W, Berger H, et al. Oligodendrocytes secrete exosomes containing major myelin and stress-protective proteins: Trophic support for axons? *Proteomics Clinical applications*. 2007;1(11):1446-61.
153. Reis-Sobreiro M, Roue G, Moros A, Gajate C, de la Iglesia-Vicente J, Colomer D, et al. Lipid raft-mediated Akt signaling as a therapeutic target in mantle cell lymphoma. *Blood cancer journal*. 2013;3:e118.
154. Romanelli RJ, Mahajan KR, Fulmer CG, Wood TL. Insulin-like growth factor-I-stimulated Akt phosphorylation and oligodendrocyte progenitor cell survival require cholesterol-enriched membranes. *Journal of neuroscience research*. 2009;87(15):3369-77.
155. Decker L, French-Constant C. Lipid rafts and integrin activation regulate oligodendrocyte survival. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2004;24(15):3816-25.
156. Camacho A, Huang JK, Delint-Ramirez I, Yew Tan C, Fuller M, Lelliott CJ, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-coactivator-1 alpha coordinates sphingolipid metabolism, lipid raft composition and myelin protein synthesis. *The European journal of neuroscience*. 2013;38(5):2672-83.

## **ANEXO 1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El análisis de resultados se realizó mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido por una prueba de comparación múltiple de Dunnett para comparar los diferentes tratamientos contra el control, por una prueba de Bonferroni cuando se quiso comparar entre pares de tratamientos seleccionados, una prueba de Tukey-Kramer cuando se compararon todos los pares de tratamientos, o una prueba de tendencia lineal para determinar los efectos dosis o tiempo-dependientes. Para tales análisis se usó el software GraphPadPrism Demo 5. Todos los datos se presentan como promedio  $\pm$  desviación estándar (DE).

### **1.1.EFECTO EN DE LA PSICOSINA EXÓGENA SOBRE LA MUERTE DE LAS CÉLULAS MO3.13 LUEGO DE 72 HORAS DE DIFERENCIACIÓN.**

#### **WST - 6h de tratamiento**

<b>ANOVA de una vía</b>	
<b>Valor P</b>	< 0,0001
<b>Resumen del valor P</b>	***
<b>Promedios diferentes? (P &lt; 0.05)</b>	Si
<b>Número de grupos</b>	6
<b>F</b>	7548
<b>R cuadrado</b>	0,9997

<b>Tabla ANOVA</b>	<b>DE</b>	<b>GL</b>	<b>ECM</b>
Tratamiento (entre columnas)	25161	5	5032
Residual (dentro de las columnas)	8	12	0,6667
<b>Total</b>	<b>25169</b>	<b>17</b>	

<b>Prueba de tendencia lineal</b>	
Pendiente	-9,973
R cuadrado	0,8298
Valor P	< 0,0001
P value summary	***
Tendencia significativa? (P < 0.05)?	Si

### **WST - 24 de tratamiento**

<b>ANOVA de una vía</b>	
<b>Valor P</b>	< 0,0001
<b>Resumen del valor P</b>	***
<b>Promedios diferentes? (P &lt; 0.05)</b>	Si
<b>Número de grupos</b>	6
<b>F</b>	9765
<b>R cuadrado</b>	0,9998

<b>Tabla ANOVA</b>	<b>DE</b>	<b>GL</b>	<b>ECM</b>
--------------------	-----------	-----------	------------

Tratamiento (entre columnas)	24412	5	4882
Residual (dentro de las columnas)	6,000	12	0,5000
Total	24418	17	

**Prueba de tendencia lineal**

Pendiente	-10,26
R cuadrado	0,9059
Valor P	< 0,0001
	***
P value summary	
Tendencia significativa? (P < 0.05)?	Si

**1.2.EFECTO TIEMPO DEPENDIENTE DE LA PSICOSINA 10 µM SOBRE LA MUERTE DE LAS CÉLULAS MO3.13.**

**LDH – No diferenciadas**

<b>ANOVA de una vía</b>	
Valor P	< 0,0001
Resumen del valor P	***
Promedios diferentes? (P < 0.05)	Si
Número de grupos	6
F	149,8
R cuadrado	0,9921

<b>Tabla ANOVA</b>	<b>DE</b>	<b>GL</b>	<b>ECM</b>
--------------------	-----------	-----------	------------

Tratamiento (entre columnas)	13958	5	2792
Residual (dentro de las columnas)	111,8	6	18,64
<b>Total</b>	<b>14070</b>	<b>11</b>	

**Prueba de tendencia lineal**

Pendiente	7,579
R cuadrado	0,5715
Valor P	< 0,0001
P value summary	***
Tendencia significativa? (P < 0.05)?	Si

**LDH – Diferenciadas**

ANOVA de una vía (sin psicossina)		ANOVA de una vía (con psicossina)	
Valor P	< 0,0001	Valor P	0,0002
Resumen del valor P	***	Resumen del valor P	***
Promedios diferentes? (P < 0.05)	Si	Promedios diferentes? (P < 0.05)	Si
Número de grupos	5	Número de grupos	5
F	92,76	F	59,59
R cuadrado	0,9867	R cuadrado	0,9795

Tabla ANOVA (sin psicossina)	DE	GL	ECM
Tratamiento (entre columnas)	214,8	4	53,69
Residual (dentro de las columnas)	2,894	5	0,5788
<b>Total</b>	<b>217,7</b>	<b>9</b>	

Tabla ANOVA (con psicossina)	DE	GL	ECM
Tratamiento (entre columnas)	2799	4	699,8
Residual (dentro de las columnas)	58,72	5	11,74
<b>Total</b>	<b>2858</b>	<b>9</b>	

**Prueba de tendencia lineal (sin psicossina)**

		<b>Prueba de tendencia linear (con psicossina)</b>	
Pendiente	2,956	Pendiente	11,35
R cuadrado	0,8031	R cuadrado	0,9020
Valor P	< 0,0001	Valor P	< 0,0001
P value summary	***	P value summary	***
Tendencia significativa? (P < 0.05)?	Si	Tendencia significativa? (P < 0.05)?	Si

<b>ANOVA de una vía</b>	
Valor P	< 0,0001
Resumen del valor P	***
Promedios diferentes? (P < 0.05)	Si
Número de grupos	8
F	63,40
R cuadrado	0,9823

<b>Tabla ANOVA</b>	<b>DE</b>	<b>GL</b>	<b>ECM</b>
Tratamiento (entre columnas)	3418	7	488,3
Residual (dentro de las columnas)	61,61	8	7,702
Total	3480	15	

<b>Prueba de Tukey</b>	<b>DM</b>	<b>q</b>	<b>P &lt; 0,001?</b>	<b>Resumen</b>	<b>99,9% IC de la dif.</b>
3 vs 3 + Psi	-3,916	1,995	No	ns	-24,80 a 16,96
3 vs 6	-0,7316	0,3728	No	ns	-21,61 a 20,15

3 vs 6 + Psi	-9,855	5,022	No	ns	-30,73 a 11,02
3 vs 12	-7,048	3,592	No	ns	-27,93 a 13,83
3 vs 12 + Psi	-31,26	15,93	Si	***	-52,14 a -10,38
3 vs 24	-11,63	5,929	No	*	-32,51 a 9,245
3 vs 24 + Psi	-43,47	22,15	Si	***	-64,35 a -22,59
3 + Psi vs 6	3,184	1,622	No	ns	-17,70 a 24,06
3 + Psi vs 6 + Psi	-5,939	3,027	No	ns	-26,82 a 14,94
3 + Psi vs 12	-3,133	1,596	No	ns	-24,01 a 17,75
3 + Psi vs 12 + Psi	-27,35	13,94	Si	***	-48,23 a -6,469
3 + Psi vs 24	-7,719	3,934	No	ns	-28,60 a 13,16
3 + Psi vs 24 + Psi	-39,55	20,16	Si	***	-60,43 a -18,67
6 vs 6 + Psi	-9,123	4,649	Si	*	-30,00 a 11,76
6 vs 12	-6,316	3,219	No	ns	-27,20 a 14,56
6 vs 12 + Psi	-30,53	15,56	Si	***	-51,41 a -9,653
6 vs 24	-10,90	5,556	No	ns	-31,78 a 9,976
6 vs 24 + Psi	-42,74	21,78	Si	***	-63,62 a -21,86
6 + Psi vs 12	2,807	1,430	No	ns	-18,07 a 23,69
6 + Psi vs 12 + Psi	-21,41	10,91	Si	***	-42,29 a -0,5296
6 + Psi vs 24	-1,780	0,9071	No	ns	-22,66 a 19,10
6 + Psi vs 24 + Psi	-33,61	17,13	Si	***	-54,49 a -12,73
12 vs 12 + Psi	-24,22	12,34	Si	***	-45,10 a -3,336
12 vs 24	-4,587	2,337	No	ns	-25,47 a 16,29
12 vs 24 + Psi	-36,42	18,56	Si	***	-57,30 a -15,54

12 + Psi vs 24	19,63	10,00	No	**	-1,250 a 40,51
12 + Psi vs 24 + Psi	-12,20	6,219	No	*	-33,08 a 8,676
24 vs 24 + Psi	-31,83	16,22	Si	***	-52,71 a -10,95

### 1.3.EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE GALC SOBRE LA MUERTE CELULAR.

#### LDH - 3 días del silenciamiento

ANOVA de una vía	
Valor P	0,0001
Resumen del valor P	***
Promedios diferentes? (P < 0.05)	Si
Número de grupos	4
F	28,96
R cuadrado	0,9157

Tabla ANOVA	DE	GL	ECM
Tratamiento (entre columnas)	456,2	3	152,1
Residual (dentro de las columnas)	42,01	8	5,251
Total	498,2	11	

Prueba de Tukey	DM	q	P < 0,01?	Resumen	99% IC de la dif.
shCtrl vs shCtrl + TTC	-3,257	2,462	No	ns	-11,47 a 4,950
shCtrl vs shGALC	-5,409	4,089	No	ns	-13,62 a 2,798
shCtrl vs shGALC + TTC	-16,42	12,41	Si	***	-24,62 a -8,208
shCtrl + TTC vs shGALC	-2,152	1,627	No	ns	-10,36 a 6,056
shCtrl + TTC vs shGALC + TTC	-13,16	9,946	Si	***	-21,37 a -4,950



shGALC vs shGALC + TTC                      -11,01      8,319              Si              \*\*              -19,21 a -2,798

### LDH - 7 días del silenciamiento

ANOVA de una vía	
Valor P	< 0,0001
Resumen del valor P	***
Promedios diferentes? (P < 0.05)	Si
Número de grupos	4
F	169,8
R cuadrado	0,9845

Tabla ANOVA	DE	GL	ECM
Tratamiento (entre columnas)	2277	3	758,9
Residual (dentro de las columnas)	35,76	8	4,470
Total	2312	11	

Prueba de Tukey	DM	q	P < 0,001?	Resumen	99,9% IC de la dif.
shCtrl vs shCtrl + TTC	1,339	1,097	No	ns	-9,620 a 12,30
shCtrl vs shGALC	3,138	2,571	No	ns	-7,821 a 14,10
shCtrl vs shGALC + TTC	-30,21	24,75	Si	***	-41,17 a -19,25
shCtrl + TTC vs shGALC	1,799	1,474	No	ns	-9,160 a 12,76
shCtrl + TTC vs shGALC + TTC	-31,55	25,85	Si	***	-42,51 a -20,59
shGALC vs shGALC + TTC	-33,35	27,32	Si	***	-44,31 a -22,39

### MTT - 3 días del silenciamiento

ANOVA de una vía	
Valor P	< 0,0001
Resumen del valor P	***

<b>Promedios diferentes? (P &lt; 0.05)</b>	Si
<b>Número de grupos</b>	4
<b>F</b>	300,5
<b>R cuadrado</b>	0,9912

<b>Tabla ANOVA</b>	<b>DE</b>	<b>GL</b>	<b>ECM</b>
Tratamiento (entre columnas)	4457	3	1486
Residual (dentro de las columnas)	39,55	8	4,943
Total	4497	11	

<b>Prueba de Tukey</b>	<b>DM</b>	<b>q</b>	<b>P &lt; 0,001?</b>	<b>Resumen</b>	<b>99,9% IC de la dif.</b>
shCtrl vs shCtrl + TTC	9,183	7,153	No	**	-2,342 a 20,71
shCtrl vs shGALC	0,0	0,0	No	ns	-11,52 a 11,52
shCtrl vs shGALC + TTC	46,72	36,39	Si	***	35,19 a 58,24
shCtrl + TTC vs shGALC	-9,183	7,153	No	**	-20,71 a 2,342
shCtrl + TTC vs shGALC + TTC	37,54	29,24	Si	***	26,01 a 49,06
shGALC vs shGALC + TTC	46,72	36,39	Si	***	35,19 a 58,24

### MTT - 7 días del silenciamiento

<b>ANOVA de una vía</b>	
<b>Valor P</b>	< 0,0001
<b>Resumen del valor P</b>	***
<b>Promedios diferentes? (P &lt; 0.05)</b>	Si
<b>Número de grupos</b>	4
<b>F</b>	166,5
<b>R cuadrado</b>	0,9842

<b>Tabla ANOVA</b>	<b>DE</b>	<b>GL</b>	<b>ECM</b>
Tratamiento (entre columnas)	9435	3	3145
Residual (dentro de las columnas)	151,1	8	18,88
<b>Total</b>	<b>9586</b>	<b>11</b>	

<b>Prueba de Tukey</b>	<b>DM</b>	<b>q</b>	<b>P &lt; 0,001?</b>	<b>Resumen</b>	<b>99,9% IC de la dif.</b>
shCtrl vs shCtrl + TTC	8,667	3,455	No	ns	-13,86 a 31,19
shCtrl vs shGALC	0,0	0,0	No	ns	-22,53 a 22,53
shCtrl vs shGALC + TTC	67,13	26,75	Si	***	44,60 a 89,65
shCtrl + TTC vs shGALC	-8,667	3,455	No	ns	-31,19 a 13,86
shCtrl + TTC vs shGALC + TTC	58,46	23,30	Si	***	35,93 a 80,98
shGALC vs shGALC + TTC	67,13	26,75	Si	***	44,60 a 89,65

## 1.4.EFECTO DE AGONISTAS DE PPARs SOBRE LA SUPERVIVENCIA CELULAR.

### 1.4.1. Modelo exógeno

#### Rosiglitazona – 24h pretratamiento

<b>ANOVA de una vía</b>	
<b>Valor P</b>	< 0,0001
<b>Resumen del valor P</b>	***
<b>Promedios diferentes? (P &lt; 0.05)</b>	Si
<b>Número de grupos</b>	6
<b>F</b>	205,0
<b>R cuadrado</b>	0,9942

<b>Tabla ANOVA</b>	<b>DE</b>	<b>GL</b>	<b>ECM</b>
Tratamiento (entre columnas)	28056	5	5611

Residual (dentro de las columnas)	164,2	6	27,37
<b>Total</b>	<b>28220</b>	<b>11</b>	

<b>Prueba de Dunnett</b>	<b>DM</b>	<b>q</b>	<b>P &lt; 0,001?</b>	<b>Resumen</b>	<b>99,9% IC de la dif.</b>
Psy vs Control	100,0	19,11	Si	***	60,28 a 139,7
Psy vs Rosi	98,55	18,84	Si	***	58,83 a 138,3
Psy vs GW	96,26	18,40	Si	***	56,54 a 136,0
Psy vs Psy + Rosi	2,458	0,4699	No	ns	-37,26 a 42,18
Psy vs Psy + Rosi + GW	2,349	0,4490	No	ns	-37,37 a 42,07

### Rosiglitazona – 1h pretratamiento

<b>ANOVA de una vía</b>	
<b>Valor P</b>	< 0,0001
<b>Resumen del valor P</b>	***
<b>Promedios diferentes? (P &lt; 0.05)</b>	Si
<b>Número de grupos</b>	6
<b>F</b>	1091
<b>R cuadrado</b>	0,9989

<b>Tabla ANOVA</b>	<b>DE</b>	<b>GL</b>	<b>ECM</b>
Tratamiento (entre columnas)	25923	5	5185
Residual (dentro de las columnas)	28,51	6	4,752
<b>Total</b>	<b>25951</b>	<b>11</b>	

<b>Prueba de Dunnett</b>	<b>DM</b>	<b>q</b>	<b>P &lt; 0,001?</b>	<b>Resumen</b>	<b>99,9% IC de la dif.</b>
Psy vs Control	100,0	45,87	Si	***	83,45 a 116,6
Psy vs Rosi	96,93	44,47	Si	***	80,38 a 113,5

Psy vs GW	97,84	44,89	Si	***	81,29 a 114,4
Psy vs Psy + Rosi	83,09	38,12	Si	***	66,54 a 99,64
Psy vs Psy + Rosi + GW	-6,729	3,087	No	ns	-23,28 a 9,821

### GW0742 – 24h pretratamiento

ANOVA de una vía	
Valor P	0,0019
Resumen del valor P	**
Promedios diferentes? (P < 0.05)	Si
Número de grupos	8
F	5,724
R cuadrado	0,7146

Tabla ANOVA	DE	GL	ECM
Tratamiento (entre columnas)	10645	7	1521
Residual (dentro de las columnas)	4251	16	265,7
Total	14896	23	

Prueba de Dunnett	DM	q	P < 0,05?	Resumen	99,9% IC de la dif.
Psy vs Cells (DMSO)	-47,73	3,587	Si	*	-86,65 a -8,821
Psy vs GW (0,1 µM)	-40,22	3,022	Si	*	-79,13 a -1,307
Psy vs GW (1 µM)	-29,67	2,230	Si	*	-68,59 a 9,239
Psy vs GW (5 µM)	-28,79	2,164	No	ns	-67,71 a 10,12
Psy vs GW (0,1 µM) + Psy	2,676	0,2011	No	ns	-36,24 a 41,59
Psy vs GW (1 µM) + Psy	6,216	0,4671	No	ns	-32,70 a 45,13
Psy vs GW (5 µM) + Psy	6,510	0,4891	No	ns	-32,40 a 45,42

**GW0742 – 1h pretratamiento**

ANOVA de una vía	
Valor P	0,0004
Resumen del valor P	***
Promedios diferentes? (P < 0.05)	Si
Número de grupos	8
F	7,778
R cuadrado	0,7729

Tabla ANOVA	DE	GL	ECM
Tratamiento (entre columnas)	18887	7	2698
Residual (dentro de las columnas)	5550	16	346,9
Total	24437	23	

Prueba de Dunnett	DM	q	P < 0,05?	Resumen	99,9% IC de la dif.
Psy vs Cells (DMSO)	-67,50	4,439	Si	**	-112,0 a -23,04
Psy vs GW (0,1 µM)	-59,58	3,918	Si	**	-104,0 a -15,12
Psy vs GW (1 µM)	-47,34	3,113	Si	*	-91,81 a -2,880
Psy vs GW (5 µM)	-59,32	3,901	Si	**	-103,8 a -14,85
Psy vs GW (0,1 µM) + Psy	-6,818	0,4483	No	ns	-51,28 a 37,65
Psy vs GW (1 µM) + Psy	1,084	0,07127	No	ns	-43,38 a 45,55
Psy vs GW (5 µM) + Psy	-8,602	0,5657	No	ns	-53,07 a 35,86

**WY14643 – 24h pretratamiento**

ANOVA de una vía	
Valor P	0,1100
Resumen del valor P	ns

<b>Promedios diferentes? (P &lt; 0.05)</b>	No
<b>Número de grupos</b>	8
<b>F</b>	2,514
<b>R cuadrado</b>	0,6875

<b>Tabla ANOVA</b>	<b>DE</b>	<b>GL</b>	<b>ECM</b>
Tratamiento (entre columnas)	8738	7	1248
Residual (dentro de las columnas)	3972	8	496,5
Total	12710	15	

<b>Prueba de Dunnett</b>	<b>DM</b>	<b>q</b>	<b>P &lt; 0,05?</b>	<b>Resumen</b>	<b>99,9% IC de la dif.</b>
Psy vs Control	-66,77	2,997	No	ns	-140,1 a 6,577
Psy vs WY 1uM	-36,06	1,618	No	ns	-109,4 a 37,29
Psy vs WY 20 µM	-23,34	1,048	No	ns	-96,69 a 50,00
Psy vs WY 100 µM	2,515	0,1129	No	ns	-70,83 a 75,86
Psy vs WY 1uM + Psi	-3,503	0,1572	No	ns	-76,85 a 69,84
Psy vs WY 20uM + Psi	-27,98	1,256	Si	**	-101,3 a 45,36
Psy vs WY 100uM + Psi	6,170	0,2769	No	ns	-67,18 a 79,52

### WY14643 – 1h pretratamiento

<b>ANOVA de una vía</b>	
<b>Valor P</b>	0,4060
<b>Resumen del valor P</b>	ns
<b>Promedios diferentes? (P &lt; 0.05)</b>	No
<b>Número de grupos</b>	8
<b>F</b>	1,182
<b>R cuadrado</b>	0,5085

<b>Tabla ANOVA</b>	<b>DE</b>	<b>GL</b>	<b>ECM</b>
Tratamiento (entre columnas)	5281	7	754,4
Residual (dentro de las columnas)	5106	8	638,2
<b>Total</b>	<b>10387</b>	<b>15</b>	

<b>Prueba de Dunnett</b>	<b>DM</b>	<b>q</b>	<b>P &lt; 0,05?</b>	<b>Resumen</b>	<b>99,9% IC de la dif.</b>
Psy vs Control	-56,23	2,226	No	ns	-139,4 a 26,93
Psy vs WY 1uM	-8,714	0,3449	No	ns	-91,87 a 74,44
Psy vs WY 20 µM	-10,56	0,4180	No	ns	-93,72 a 72,60
Psy vs WY 100 µM	-26,44	1,047	No	ns	-109,6 a 56,71
Psy vs WY 1uM + Psi	5,248	0,2077	No	ns	-77,91 a 88,40
Psy vs WY 20uM + Psi	-10,91	0,4317	No	ns	-94,06 a 72,25
Psy vs WY 100uM + Psi	-4,695	0,1859	No	ns	-87,85 a 78,46

#### 1.4.2. Modelo endógeno

### Rosiglitazona

<b>ANOVA de una vía</b>	
<b>Valor P</b>	< 0,0001
<b>Resumen del valor P</b>	***
<b>Promedios diferentes? (P &lt; 0.05)</b>	Si
<b>Número de grupos</b>	7
<b>F</b>	73,42
<b>R cuadrado</b>	0,9692

<b>Tabla ANOVA</b>	<b>DE</b>	<b>GL</b>	<b>ECM</b>
Tratamiento (entre columnas)	17326	6	2888



Residual (dentro de las columnas)	550,7	14	39,33
<b>Total</b>	<b>17877</b>	<b>20</b>	

<b>Prueba de Dunnett</b>	<b>DM</b>	<b>q</b>	<b>P &lt; 0,05?</b>	<b>Resumen</b>	<b>99,9% IC de la dif.</b>
Control - Tetraciclina vs Rosi [1 µM] 24h	-53,43	10,43	Si	***	-68,35 a -38,52
Control - Tetraciclina vs Rosi [5 µM] 24h	-5,869	1,146	No	ns	-20,78 a 9,045
Control - Tetraciclina vs Rosi [10 µM] 24h	-46,05	8,993	Si	***	-60,96 a -31,14
Control - Tetraciclina vs Rosi [1 µM] 1h	-19,21	3,752	Si	*	-34,13 a -4,299
Control - Tetraciclina vs Rosi [5 µM] 1h	7,495	1,464	No	ns	-7,420 a 22,41
Control - Tetraciclina vs Rosi [10 µM] 1h	35,82	6,995	Si	***	20,90 a 50,73

### IGF-1

<b>ANOVA de una vía</b>	
<b>Valor P</b>	0,0021
<b>Resumen del valor P</b>	**
<b>Promedios diferentes? (P &lt; 0.05)</b>	Si
<b>Número de grupos</b>	7
<b>F</b>	6,359
<b>R cuadrado</b>	0,7316

<b>Tabla ANOVA</b>	<b>DE</b>	<b>GL</b>	<b>ECM</b>
Tratamiento (entre columnas)	39522	6	6587
Residual (dentro de las columnas)	14501	14	1036
<b>Total</b>	<b>54023</b>	<b>20</b>	

Prueba de Dunnett	DM	q	P < 0,05?	Resumen	99,9% IC de la dif.
Control - Tetraciclina vs IGF -1 (100 ng/mL) 1h	-31,79	1,210	No	ns	-108,3 a 44,74
Control - Tetraciclina vs IGF -1 (100 ng/mL) 6h	0,8605	0,03275	No	ns	-75,67 a 77,39
Control - Tetraciclina vs IGF -1 (100 ng/mL) 24h	-105,1	3,998	Si	**	-181,6 a -28,53
Control - Tetraciclina vs IGF -1 (10 ng/mL) 1h	-16,62	0,6326	No	ns	-93,16 a 59,91
Control - Tetraciclina vs IGF -1 (10 ng/mL) 6h	0,9877	0,03759	No	ns	-75,55 a 77,52
Control - Tetraciclina vs IGF -1 (10 ng/mL) 24h	48,61	1,850	Si	*	-27,92 a 125,1

### 1.5.EFECTO DE LOS AGONISTAS DE PPAR<sub>s</sub> E IGF SOBRE LAS VÍAS DE SUPERVIVENCIA CELULAR PI3K/Akt Y Raf/MEK/ERK.

#### Rosiglitazona - Akt

ANOVA de una vía	
Valor P	< 0,0001
Resumen del valor P	***
Promedios diferentes? (P < 0.05)	Si
Número de grupos	6
F	946,6
R cuadrado	0,9975

Tabla ANOVA	DE	GL	ECM
Tratamiento (entre columnas)	112841	5	22568
Residual (dentro de las columnas)	286,1	12	23,84
Total	113127	17	

Prueba de Dunnett	DM	q	P < 0,001?	Resumen	99,9% IC de la dif.
Control vs Psy	2,182	0,5473	No	ns	-18,40 a 22,76
Control vs Rosi (24h pret.)	38,99	9,780	Si	***	18,41 a 59,57
Control vs Rosi (1h pret.)	-167,3	41,97	Si	***	-187,9 a -146,7
Control vs Rosi (24h pret.) + Psy	45,71	11,46	Si	***	25,13 a 66,29
Control vs Rosi (1h pret.) + Psy	77,48	19,43	Si	***	56,90 a 98,06

### IGF-1 – Akt

ANOVA de una vía	
Valor P	< 0,0001
Resumen del valor P	***
Promedios diferentes? (P < 0.05)	Si
Número de grupos	7
F	31,81
R cuadrado	0,9317

Tabla ANOVA	DE	GL	ECM
Tratamiento (entre columnas)	5065	6	844,1
Residual (dentro de las columnas)	371,5	14	26,54
Total	5436	20	

Prueba de Dunnett	DM	q	P < 0,001?	Resumen	99,9% IC de la dif.
Psicosina vs Rosi	-21,53	5,119	Si	***	-42,51 a -0,5519
Psicosina vs IGF-1	-30,17	7,173	Si	***	-51,15 a -9,192
Psicosina vs Rosi + Psi	-23,05	5,480	Si	***	-44,03 a -2,072

Psicosina vs IGF-1 + Psi	1,088	0,2587	No	ns	-19,89 a 22,07
Psicosina vs Rosi + Psi + GW	3,258	0,7747	No	ns	-17,72 a 24,24
Psicosina vs IGF-1 + Psi + GW	-38,14	9,067	Si	***	-59,11 a -17,16

### Rosiglitazona – ERK1

ANOVA de una vía	
Valor P	0,0009
Resumen del valor P	***
Promedios diferentes? (P < 0.05)	Yes
Número de grupos	5
F	11,57
R cuadrado	0,8223

Tabla ANOVA	DE	GL	ECM
Tratamiento (entre columnas)	31332	4	7833
Residual (dentro de las columnas)	6771	10	677,1
Total	38103	14	

Prueba de Dunnett	DM	q	P < 0,05?	Resumen	99,9% IC de la dif.
Psy vs 24 h Rosi	-55,69	2,621	No	ns	-117,1 to 5,717
Psy vs 1 h Rosi	-71,05	3,344	Yes	*	-132,5 to -9,642
Psy vs 24 h Rosi + Psy	-1,129	0,05316	No	ns	-62,54 to 60,28
Psy vs 1 h Rosi + Psy	-121,3	5,708	Yes	***	-182,7 to -59,86

### Rosiglitazona – ERK2

ANOVA de una vía	
Valor P	0,0002
Resumen del valor P	***
Promedios diferentes? (P < 0.05)	Yes
Número de grupos	5
F	16,36
R cuadrado	0,8674

Tabla ANOVA	DE	GL	ECM
Tratamiento (entre columnas)	30836	4	7709
Residual (dentro de las columnas)	4713	10	471,3
Total	35549	14	

Prueba de Dunnett	DM	q	P < 0,05?	Resumen	99,9% IC de la dif.
Psy vs 24h Rosi	-70,15	3,958	Yes	**	-121,4 to -18,92
Psy vs 1h Rosi	-117,7	6,638	Yes	***	-168,9 to -66,43
Psy vs 24h Rosi + 24h Psy	-25,37	1,431	No	ns	-76,61 to 25,86
Psy vs 1h Rosi + 24h Psy	-106,1	5,986	Yes	***	-157,3 to -54,87

### Rosiglitazona – IGF-1R

ANOVA de una vía	
Valor P	0,0022
Resumen del valor P	**
Promedios diferentes? (P < 0.05)	Si
Número de grupos	6
F	7,426

<b>R cuadrado</b>	0,7558
-------------------	--------

<b>Tabla ANOVA</b>	<b>DE</b>	<b>GL</b>	<b>ECM</b>
Tratamiento (entre columnas)	9895	5	1979
Residual (dentro de las columnas)	3198	12	266,5
<b>Total</b>	<b>13093</b>	<b>17</b>	

<b>Prueba de Dunnett</b>	<b>DM</b>	<b>q</b>	<b>P &lt; 0,05?</b>	<b>Resumen</b>	<b>99,9% IC de la dif.</b>
Psy 10uM vs Ctrl cells	-3,704	0,2779	No	ns	-42,38 a 34,97
Psy 10uM vs Rosi (24h pret.)	-13,14	0,9861	No	ns	-51,82 a 25,53
Psy 10uM vs Rosi (1h pret.)	23,29	1,747	No	ns	-15,39 a 61,96
Psy 10uM vs Rosi + Psy (24h pret.)	27,69	2,077	No	ns	-10,98 a 66,36
Psy 10uM vs Rosi + Psy (1h pret.)	56,25	4,220	Si	**	17,58 a 94,92

### WY14643 – Akt

<b>ANOVA de una vía</b>	
<b>Valor P</b>	< 0,0001
<b>Resumen del valor P</b>	***
<b>Promedios diferentes? (P &lt; 0.05)</b>	Yes
<b>Número de grupos</b>	5
<b>F</b>	31,87
<b>R cuadrado</b>	0,9273

<b>Tabla ANOVA</b>	<b>DE</b>	<b>GL</b>	<b>ECM</b>
Tratamiento (entre columnas)	19856	4	4964
Residual (dentro de las columnas)	1558	10	155,8

Total	21414	14
-------	-------	----

Prueba de Dunnett	DM	q	P < 0,001?	Resumen	99,9% IC de la dif.
Psy vs WY (24 h)	-60,89	5,975	Yes	***	-116,1 to -5,674
Psy vs WY (1 h)	-64,64	6,344	Yes	***	-119,9 to -9,431
Psy vs WY (24 h) + Psy	16,44	1,613	No	ns	-38,78 to 71,65
Psy vs WY (1 h) + Psy	15,12	1,484	No	ns	-40,09 to 70,33

### GW0742 – Akt

ANOVA de una vía	
Valor P	0,0004
Resumen del valor P	***
Promedios diferentes? (P < 0.05)	Yes
Número de grupos	5
F	14,02
R cuadrado	0,8487

Tabla ANOVA	DE	GL	ECM
Tratamiento (entre columnas)	11608	4	2902
Residual (dentro de las columnas)	2069	10	206,9
Total	13677	14	

Prueba de Dunnett	DM	q	P < 0,05?	Resumen	99,9% IC de la dif.
Psy 10uM vs GW0742 (24 h)	-37,75	3,214	Yes	*	-71,70 to -3,803
Psy 10uM vs GW0742 (1 h)	-44,32	3,774	Yes	*	-78,27 to -10,37
Psy 10uM vs GW0742 (24 h) + Psy	16,07	1,368	No	ns	-17,88 to 50,02

Psy 10uM vs GW0742 (1 h) + Psy      23,97    2,041      No      ns      -9,978 to 57,92

### Rosiglitazona e IGF-1 – Akt (modelo endógeno)

ANOVA de una vía	
Valor P	< 0,0001
Resumen del valor P	***
Promedios diferentes? (P < 0.05)	Yes
Número de grupos	12
F	232,8
R cuadrado	0,9907

Tabla ANOVA	DE	GL	ECM
Tratamiento (entre columnas)	4,215e+006	11	383200
Residual (dentro de las columnas)	39512	24	1646
Total	4,255e+006	35	

Prueba de Dunnett	DM	q	P < 0,001?	Resumen	99,9% IC de la dif.
Ctrl shCtrl vs Rosi 24h	-22,28	0,6724	No	ns	-175,3 to 130,7
Ctrl shCtrl vs Rosi 1h	-32,84	0,9913	No	ns	-185,8 to 120,2
Ctrl shCtrl vs IGF-1 1h	-863,5	26,06	Yes	***	-1017 to -710,5
Ctrl shCtrl vs IGF-1 + Rosi 24h	-659,8	19,92	Yes	***	-812,8 to -506,8
Ctrl shCtrl vs IGF-1 + Rosi 1h	-716,3	21,62	Yes	***	-869,4 to -563,3
Ctrl shCtrl vs Ctrl shGALC	0,0	0,0	No	ns	-153,0 to 153,0
Ctrl shCtrl vs Rosi 24h shGALC	-68,74	2,075	No	ns	-221,7 to 84,27
Ctrl shCtrl vs Rosi 1h shGALC	-18,45	0,5569	No	ns	-171,5 to 134,6
Ctrl shCtrl vs IGF-1 1h shGALC	7,543	0,2277	No	ns	-145,5 to 160,5



Ctrl shCtrl vs IGF-1 1h Rosi 24h shGALC	-766,9	23,15	Yes	***	-919,9 to -613,9
Ctrl shCtrl vs IGF- 1 1h Rosi 1h shGALC	-405,6	12,24	Yes	***	-558,6 to -252,6

### Rosiglitazona e IGF-1 – ERK1/2 (modelo endógeno)

ANOVA de una vía	
Valor P	< 0,0001
Resumen del valor P	***
Promedios diferentes? (P < 0.05)	Yes
Número de grupos	12
F	29,05
R cuadrado	0,9301

Tabla ANOVA	DE	GL	ECM
Tratamiento (entre columnas)	83738	11	7613
Residual (dentro de las columnas)	6290	24	262,1
Total	90027	35	

Prueba de Dunnett	DM	q	P < 0,001?	Resumen	99,9% IC de la dif.
Ctrl shCtrl vs Rosi 24h	-7,888	0,5968	No	ns	-68,93 to 53,16
Ctrl shCtrl vs Rosi 1h	-14,49	1,096	No	ns	-75,54 to 46,55
Ctrl shCtrl vs IGF-1 1h	-98,82	7,476	Yes	***	-159,9 to -37,78
Ctrl shCtrl vs IGF-1 + Rosi 24h	-110,2	8,334	Yes	***	-171,2 to -49,11
Ctrl shCtrl vs IGF-1 + Rosi 1h	-136,3	10,31	Yes	***	-197,3 to -75,21
Ctrl shCtrl vs Ctrl shGALC	0,0	0,0	No	ns	-61,04 to 61,04
Ctrl shCtrl vs Rosi 24h shGALC	-90,31	6,833	Yes	***	-151,4 to -29,27
Ctrl shCtrl vs Rosi 1h shGALC	-79,27	5,997	Yes	***	-140,3 to -18,23

Ctrl shCtrl vs IGF-1 1h shGALC	-41,96	3,174	No	*	-103,0 to 19,09
Ctrl shCtrl vs IGF-1 1h Rosi 24h shGALC	-39,45	2,984	No	*	-100,5 to 21,60
Ctrl shCtrl vs IGF- 1 1h Rosi 1h shGALC	-124,0	9,379	Yes	***	-185,0 to -62,93

**Convenciones**

DE	Desviación estándar
GL	Grados de libertad
ECM	Error cuadrático medio
DM	Diferencia de la media
IC	Intervalo de confianza