

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Biología Celular



**MUERTE NEURONAL EXCITOTÓXICA: INTERACCIÓN
ENTRE LAS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN DEL IGF-I Y EL
GLUTAMATO**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Eva García Galloway

Bajo la dirección de los doctores

Ignacio Torres Alemán

Sebastián Pons Fuxá

Madrid, 2003

ISBN: 84-669-1864-7

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Biología Celular

**MUERTE NEURONAL EXCITOTÓXICA: INTERACCIÓN
ENTRE LAS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN DEL IGF-I Y EL
GLUTAMATO.**

TESIS DOCTORAL

Eva García Galloway
Madrid 2003

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Biología Celular

**MUERTE NEURONAL EXCITOTÓXICA: INTERACCIÓN
ENTRE LAS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN DEL IGF-I Y EL
GLUTAMATO**

**Memoria que para optar al grado de Doctor en Ciencias
Biológicas presenta**

EVA GARCÍA GALLOWAY

**Realizada en el Instituto Cajal (CSIC) bajo la dirección del Dr
Ignacio Torres Alemán y el Dr Sebastián Pons Fuxá**

VºBº de los directores de la Tesis

Ignacio Torres Alemán

Sebastián Pons Fuxá

VºBº del Tutor

La Interesada

Margarita Muñoz

Eva García Galloway

INTRODUCCIÓN

1. El factor de crecimiento tipo 1	1
1.2 Rutas de señalización del IGF-IR	4
1.3 El IGF-I en el sistema nervioso central	8
1.4 El IGF-I y la muerte neuronal	10
2. Excitotoxicidad en el SNC	14
2.1 Excitotoxicidad y el IGF-I	17
3. El glutamato y sus receptores	19
3.1 Receptores de glutamato y excitotoxicidad	20
4. La Proteína quinasa C	24
4.1 Las PKCs y la muerte neuronal	27
4.2 Las PKCs y el glutamato	30
4.3 Las PKCs y los factores tróficos	31
5. Daño isquémico en el SNC	34
5.1 La Isquemia y los factores tróficos	35

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales	38
Métodos	
1. Cultivo de células granulares de cerebelo	43

2. Ensayo de excitotoxicidad in vitro	44
2.1 Primer protocolo para determinar la excitotoxicidad por el glutamato	44
2.2 Segundo protocolo para determinar la excitotoxicidad por el glutamato	45
2.3 Tercer protocolo para determinar la protección por IGF-I	46
3. Preparación y procesamiento de muestras	47
4. Inmunoprecipitación de proteínas	47
5. Electroforesis y Westernblot	48
6. Experimentos in vivo	48
6.1 Inyección cerebroventricular	48
6.2 Implantación de bombas osmóticas para la administración cerebroventricular	50
6.2.1 Isquemia por oclusión de la arteria cerebral media	50
6.2.2 Sacrificio y procesamiento de muestras	51
6.2.3 Cálculo del volumen de infarto isquémico	51
7. Densitometría	51
8. Análisis estadístico	52

OBJETIVOS

Objetivos	53
-----------	----

RESULTADOS

1. Efectos antagónicos del glutamato y el IGF-I sobre la supervivencia neuronal	54
2. El IGF-I no es capaz de reducir la toxicidad del glutamato	55
3. Regulación opuesta de la fosforilación de la Akt por el glutamato y el IGF-I	56
4. Ruta por la que el glutamato ejerce su efecto antagonista sobre la señalización del IGF-I	59
5. Interacción entre el glutamato y el IGF-I sobre la ruta de PI 3 quinasa	61
6. El glutamato inhibe la señalización del IGF-I a través de la actividad de la proteína quinasa A y la proteína quinasa C	65
7. La fosforilación del IRS-I inducida por el glutamato es producida por PKC épsilon	71
8. La activación de PKC por el glutamato interviene en la muerte neuronal excitotóxica	76
9. El glutamato reduce la fosforilación de la Akt inducida por el IGF-I in vivo	78
10. La inhibición por el glutamato de la Akt in vivo es dependiente de la PKA y la PKC	79

11. Reducción del volumen de infarto isquémico en animales tratados con el inhibidor R0 32-0432	82
--	-----------

DISCUSIÓN

1. Vías de interacción entre el glutamato y el IGF-I	87
2. Las proteínas quinasas PKA y PKC están implicadas en la fosforilación en serina de el IRS-I	89
3. La PKC épsilon fosforila a el IRS-I tras la activación por el glutamato	91
4. Significado patológico de la inhibición por el IGF-I	97

CONCLUSIONES

Conclusiones	100
---------------------	------------

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía	101
---------------------	------------

1. EL FACTOR DE CRECIMIENTO TIPO INSULINA:

La existencia de factores de crecimiento tipo insulina (IGFs) fue postulado por primera vez en los años 50 cuando Salmon y Daughaday (Salmon y Daughaday, 1957) demostraron la existencia de un factor de sulfatación dependiente de GH. En la mitad de los años 70, se purificaron dos posibles somatomedinas (Hall et.al, 1975; Van Wyk et. Al. 1974). Mas tarde, descubrieron su parecido con la proinsulina y se acuñó entonces el término de factores parecidos a insulina (IGFs) (Rinderknecht et.al.,1978). El IGF-I es un péptido de 70 aminoácidos con un 50% de homología en su secuencia con la insulina y un 70% con el IGF-II (Rinderknecht et.al.,1978). Ambos están codificados por genes grandes y simples, el IGF-I en el brazo largo del cromosoma 12, y el IGF-II en el brazo corto del cromosoma 11. Al igual que la insulina, ambos IGFs tienen cadena A y cadena B, unidas entre sí por puentes disulfuro. El hígado es la mayor fuente de IGFs, existiendo gran variabilidad de expresión según el tejido y el estadio de desarrollo; por ejemplo, durante el desarrollo del sistema nervioso los niveles de IGF-I y sus receptores de IGFs (IGFRs) son más elevados que durante otros periodos (Andersson et al.,1988; Rotwein et al., 1988; Werner et al.,1989; Bondy., 1991, 1992), Sin embargo, su prevalencia en el tejido adulto, así como su localización anatómica específica, sugiere que están cumpliendo un papel en el cerebro adulto (Barlett et al.,1991; García-Segura et al., 1992; Aguado et al.,1992;Bondy et al., 1993). Existen dos receptores de membrana para IGFS: IGF-IR y el IGF-IIR/manosa-6-fosfato. La mayor parte, sino todas las acciones producidas por el IGF-I e IGF-II están mediadas por el receptor tipo 1 (IGF-IR) (LeRoith et al, 1995). Como el receptor de la insulina, con el que tiene gran homología, el IGF-IR es un miembro de la familia de los receptores tirosina quinasa de membrana celular (Ullrich et al.,

1986). Está compuesto por dos heterodímeros $\alpha\beta$; las subunidades α están unidas entre si por puentes disulfuro; así forman el holoreceptor heterodímero maduro $\alpha_2\beta_2$. La subunidad α contiene regiones ricas en cisteína, y el sitio de unión al IGF-I, mientras que la región intracelular de la subunidad β contiene la actividad tirosina quinasa. Han sido descritas formas distintas de subunidades α y β en varios tejidos y líneas celulares, de las cuales, su etiología y función se desconoce (LeRoith et al, 1995). El IGF-IR une insulina con una afinidad de 100 a 1000 veces menor al IGF-I y también puede unir IGF-II con una afinidad de 2 a 50 veces menor al IGF-I.

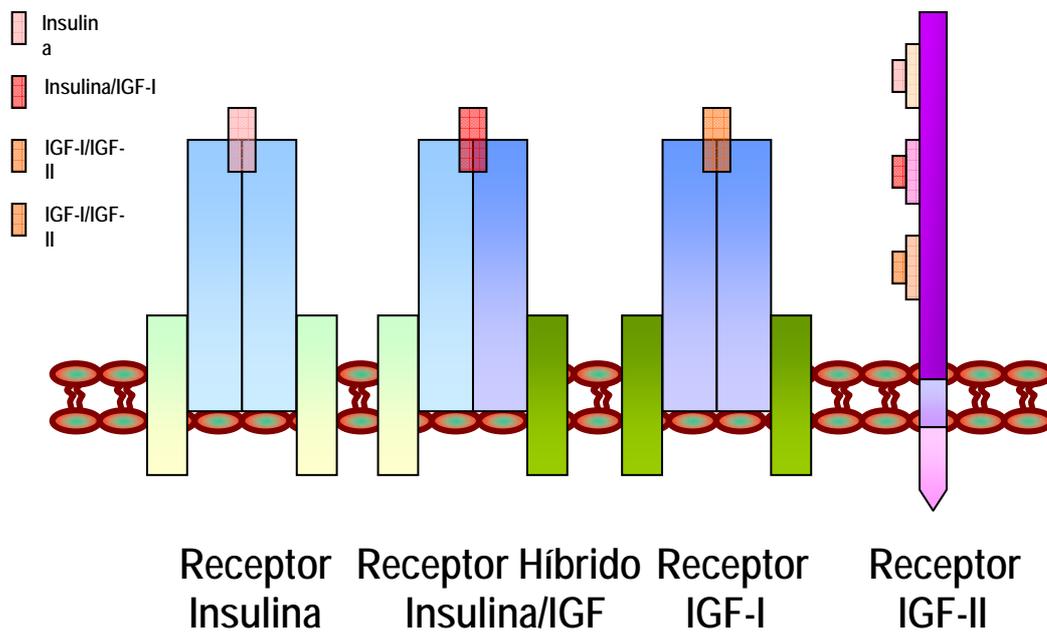


Fig 1. Familia de receptores IGF (modificado de Ferry et al., 1999)

El tercer elemento del sistema de los factores de crecimiento tipo insulina son las proteínas de unión a IGF, las IGFBPs, formado al menos por 6 proteínas transportadoras de alta afinidad y 4 de baja afinidad, que constituyen los moduladores más importantes de la función y disponibilidad de los IGFs (Jones et al., 1995). Los IGFs en plasma forman complejos con las IGFBPs, que los transportan así hasta sus células diana, (Rosenfel et al., 1990; Lamson et al., 1991; Rechler., 1993) potenciando la unión (Jones et al., 1995; 1993) o inhibiendo su acción (LaTour et al., 1990). Hasta el momento se conoce el cDNA de seis IGFBPs (Lamson et al., 1991; Rechler, 1993) y se ha caracterizado una séptima, que aún está por describir (Oh et al., 1996). Todas las IGFBPs descritas tienen una secuencia significativamente homóloga (Drop et al., 1992). Las proteínas transportadoras se protegen de la degradación al unirse al IGF-I, prolongando su vida media desde 10 minutos, en forma libre, hasta unas 5-6 horas en forma unida al IGF-I. El 90% del IGF-I que circula en suero sanguíneo lo hace unido a la IGFBP-3, y a otra proteína denominada subunidad ácido lábil, formando un complejo trimérico de alto peso molecular (unos 150 kDa) que no puede abandonar el torrente circulatorio. Muchos estudios han demostrado que los niveles de IGFBP-3 son dependientes de GH (Baxter et al., 1986; McCusker et al., 1988). El resto del IGF-I circula unido a otras IGFBPs, principalmente IGFBP-1, 2 y 4, formando complejos más pequeños capaces de atravesar el endotelio capilar (Bar et al., 1990). Dentro del sistema nervioso adulto la proteína más abundante es la IGFBP-2 (Ocrant et al., 1990). Al margen de su función protectora, estas proteínas modulan también la interacción del IGF-I con su receptor e incluso hay datos que sugieren que las IGFBPs producen efectos directos independientes de su unión a los IGFs. Se ha visto, por ejemplo, que tanto la IGFBP-1 como la BP-2 poseen secuencias de interacción con integrinas (Jones et al., 1993b).

1.2 RUTAS DE SEÑALIZACIÓN DEL IGF-IR:

Los IGFs ejercen sus efectos biológicos uniéndose y activando el receptor de IGF-I (IGF IR). Este receptor pertenece a la familia de los receptores tirosina quinasa, y su señalización intracelular está mediada al menos por dos vías, la vía MAPK (proteína quinasa activada por mitógeno) y la vía PI-3K (fosfatidil 3 quinasa inositol (LeRoith et al.,1998; 2000). La respuesta inicial del receptor tras la unión de ligando es la autofosforilación en tirosina de la parte citoplasmática de la subunidad β , seguida de la fosforilación también en tirosina de los principales sustratos del receptor, los “insulin receptor substrate” (IRS) 1-4. Esta fosforilación en tirosina de los IRS hace que interaccionen con gran cantidad de proteínas que contienen el dominio 2 de homología a src (SH2). Estas incluyen a la p85, subunidad reguladora de la PI3K; la tirosina fosfatasa PTP1D (o Syp), la “guanin-nucleotide exchange protein GRB2 o la “Ras-binding protein GAP (LeRoith et al.,1995; Baker et al.,1992) . SHC es también fosforilada directamente por el IGFIR y se une al complejo GRB2/Sos. Tanto el IRS-1 como la proteína SHC inician varias cascadas de señalización intracelular que pueden ser agrupadas en dos vías principales:

Vía PI3 quinasa:

Esta ruta está implicada, principalmente, en procesos metabólicos, de crecimiento celular y antiapoptóticos (Avruch., 1998; Combettes-Souverain et al., 1998; Peruzzi et al., 1999). La fosforilación en varios residuos de tirosina de IRS-1 crea un complejo de señalización activo por unión de varias proteínas, incluyendo a las dos isoformas de regulación de la PI-3 quinasa ($p85\alpha$ $p85\beta$), Grb2, Nck, Crk, Fyn, Shp2 y

posiblemente otras (Lee et al., 1993, White et al., 1994 ; Myers et al., 1996). IRS-1 tiene al menos 20 sitios potenciales de fosforilación en tirosina (Sun et al., 1991); la tirosina 608 parece ser el sitio principal de interacción con el dominio SHC de la PI-3K, mientras otras 3 (tirosina 460, 939, 987) juegan otros papeles (Rocchi et al., 1995). El IRS-1 también posee una gran cantidad de sitios de fosforilación en serina/treonina. Se ha visto que también son modulados por ejemplo por la Proteína-quinasa C, que provoca un aumento en la fosforilación Serina/ treonina del IRS-1 (Sun et al., 1991; Chin et al., 1994) inhibiendo su capacidad de fosforilación en tirosina. Mas recientemente se ha comprobado que una fosforilación excesiva en serina/treonina del IRS-1 puede ser uno de los mecanismo por los que el factor de necrosis tumoral (TNF) provoca resistencia a insulina (Feinstein et al.,1993; Hotamisligil et al., 1996; Kanety et al., 1995; Paz et al., 1997; Rui et al., 2001). La fosforilación serina/treonina del IRS-1 disminuye la capacidad de la insulina y el IGF-I para estimular la fosforilación del IRS-1 en tirosina, por lo que no se puede asociar con la PI3 quinasa (Pons et al., 1995; De Fea et al., 1997). También se ha comprobado en cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo que el TNF- α suprime la fosforilación en tirosina del IRS-2 inducida por IGF-I e inhibe la activación de la PI3 quinasa por IRS-2 (Verters et al., 1999). La interacción entre IRS-1 y la subunidad reguladora de la PI3K p85 hace que se active la subunidad catalítica de la PI3K p110; queda así activada la PI3 quinasa; esta quinasa fosforila fosfoinosítidos produciendo PI-3-fosfato, PI-3,4-bifosfato y PI-3,4,5-trifosfato (Kapeller et al.,1994). Los PIP3 se unen a dominios homólogos plequestrina de al menos dos proteínas, la serina/treonina quinasa Akt/PKB y la quinasa dependiente de fosfoinosítidos-1 (PDK-1), que fosforila al Akt en un residuo de treonina (Thr 308). PDK-1 también fosforila a otras proteínas, incluida la p70 proteína ribosomal s6 quinasa, proteína quinasa C (PKC) y

proteína quinasa A (PKA).

Estos pasos posteriores podrían tener un papel en la protección contra la apoptosis. La activación de Akt/PKB juega un papel fundamental en prevenir la muerte celular por apoptosis, ya que fosforila e inactiva muchas proteínas implicadas en apoptosis (Vincent et al, 2002). Una de sus dianas es el miembro de la familia Bcl-2 Bad (Bai et al., 1999). Akt/PKB fosforila también a algunos de los miembros de la familia pro-apoptótica del factor de transcripción Forkhead lo que provoca su inactivación parcial devolviéndolo al citoplasma (Brunet et al., 1999; Kops et al., 2000). Esta acción provocada por Akt/PKB disminuye la expresión de los genes diana de Forkhead, incluyendo el ligando Fas, disminuyendo así la apoptosis mediada por Fas. Además de la inhibición de factores de transcripción proapoptóticos, la actividad de Akt/PKB aumenta los niveles de proteínas anti-apoptóticas incluidas Bcl-2 y Bcl-x y un número de moléculas de adhesión a matriz (Chrysis et al., 2001; Leverrier et al., 1999). La actividad inducida por Akt/PKB también se ha visto unida a la expresión del factor de transcripción anti-apoptótico NF- κ B (Hecks et al., 1999).

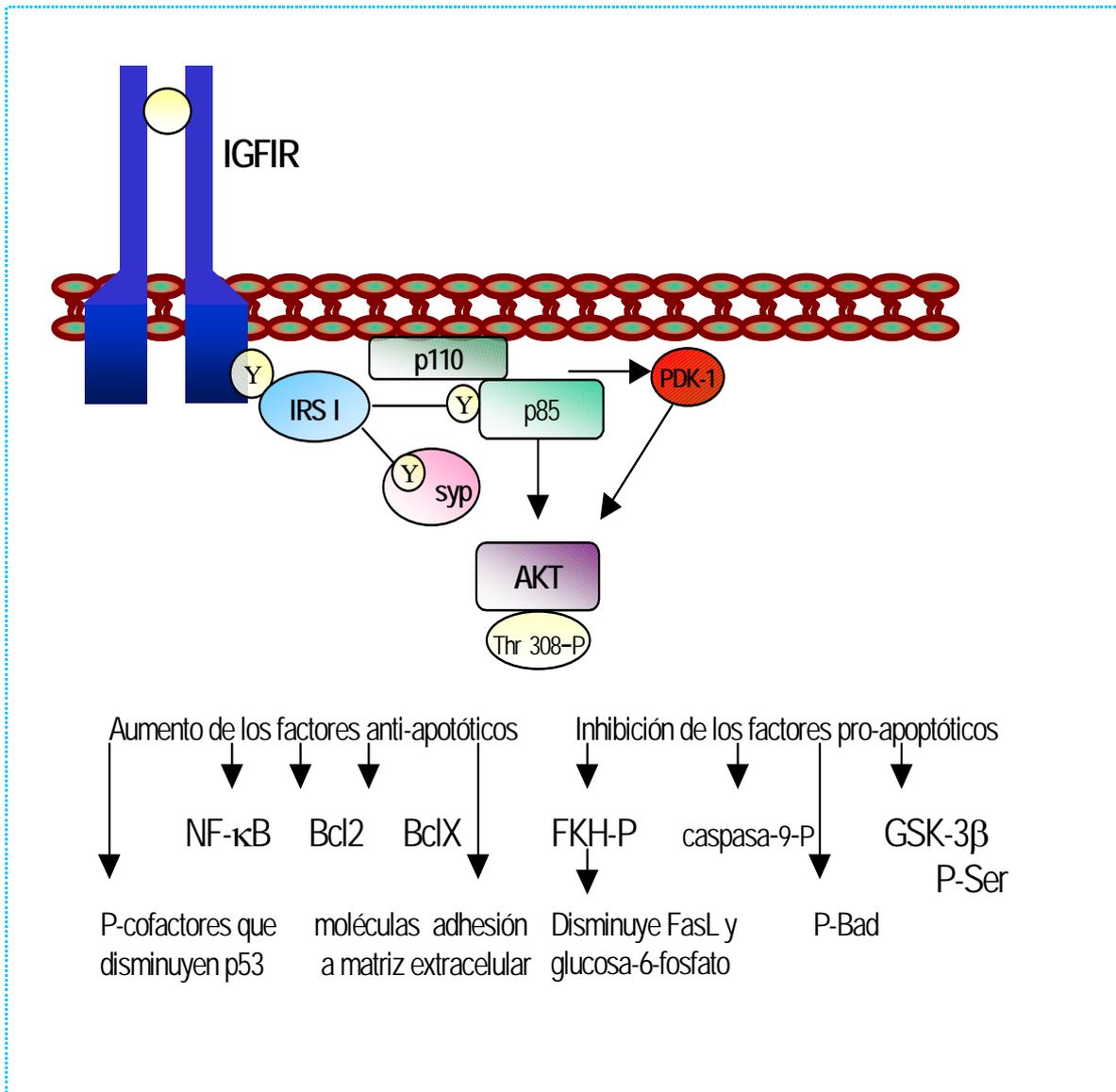


Figura 2: Ruta intracelular de PI3 quinasa IGF-IR. Diagrama de dianas celulares del IGFIR que previenen de la muerte celular por apoptosis (Vicent et al, 2002. Modificado)

Ruta de la MAP quinasa:

Las proteínas activadas por mitógeno (MAP) pertenecen a la familia de las serina/treonina quinastas que son activadas por multitud de estímulos incluido el IGF-IR y juegan distintos papeles en regulación de muerte por apoptosis en diferentes tipos celulares (Cobb et al., 1995; Dews et al., 2000). La autofosforilación del receptor de IGF-I provoca la fosforilación en un residuo de tirosina de la proteína Shc (Kim et al., 1998). Shc activada se une al adaptador Grb2 de una manera independiente de IRS-1, al mismo tiempo, se produce la activación de la vía Ras-ERK (Kim et al., 1998). Esta vía de señalización del IGF-IR ha sido relacionada con diferenciación celular y migración (Avruch et al., 1998; Cobb. et al., 1995), pero en algunos casos puede regular la maquinaria de apoptosis (Valentinis et al., 1999).

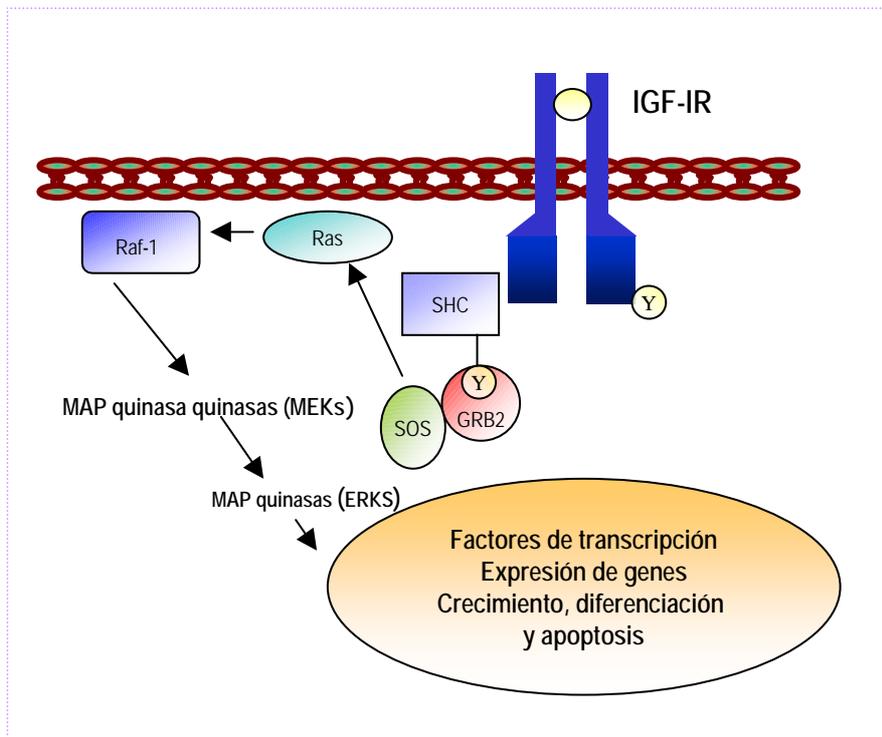


Figura 3: Ruta Map quinasa del IGF-IR (Le Roith et al., 1998; modificada).

1.3 EL IGF-I EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL:

El IGF-I es un péptido trófico para la mayoría de tipos celulares en el sistema nervioso, incluyendo diferentes tipos de neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Baskin et al., 1988; Conover et al., 1989; Daughaday et al., 1989; Birren et al., 1990; Calissano et al., 1993; Cross et al., 1994; Davies et al., 1994; De Pablo et al., 1995; Beck et al., 1995). En el sistema nervioso central adulto, el IGF-I actúa como neuromodulador y regulador de la plasticidad neuronal (Torres-Alemán., 1999).

Durante el desarrollo del sistema nervioso, el IGF-I tiene efectos neurotróficos muy importantes, estimulando la diferenciación y la supervivencia de poblaciones neuronales específicas (Beck et al., 1995; De Pablo et al., 1995; Torres-Alemán et al., 1990; 1994). La expresión de IGF-I disminuye en el roedor adulto; pero de todas formas, se sigue encontrando IGF-I inmunorreactivo en el sistema nervioso central, en neuronas y células de Schwann de los sistemas nervioso autónomo y periférico (Hansson et al., 1986; Haselbacher et al., 1985; Rotwein et al., 1988). En humanos, el ARN mensajero del IGF-I y su proteína están presentes en el cerebro fetal y adulto, y la proteína IGF-I está también presente en el fluido cerebroespinal (Haselbacher et al., 1985; Han et al., 1988; Backstrom et al., 1984). Un ejemplo es en el cerebelo, donde se detecta IGF-I desde estadios muy tempranos del desarrollo, hasta la vida adulta, tanto el receptor de IGF-I como al menos dos de sus proteínas transportadoras; manteniendo sus niveles más elevados en las primeras etapas del desarrollo postnatal (Aguado et al., 1992; Barlett et al., 1991; Bondy., 1991; García-Segura et al., 1991; Komoly et al., 1992; Lee et al., 1992; Torres-Alemán et al., 1992; Bondy et al., 1993; Torres-Alemán et al., 1994). Este sistema trófico juega un papel fundamental en el crecimiento y

diferenciación cerebelar (Torres-Alemán et al., 1994).

El IGF-I no es solo requerido por las neuronas, las células de Schwann lo necesitan para su mitogénesis y diferenciación (Cheng et al., 1996; 1997) y en el desarrollo de los progenitores de oligodendrocitos el IGF-I es necesario en el proceso de maduración y de formación de mielina (McMorris et al., 1988).

Como el IGF-I, existe una expresión del ARN mensajero y la proteína del IGF-IR durante el desarrollo en el cerebro fetal, la médula espinal y los ganglios espinales (Bondy et al., 1990, 1992; MacDonald et al., 1991; Gammeltoft et al., 1985; Sklar et al., 1989, 1992). La expresión de IGF-IR es máxima durante el desarrollo embrionario tardío y comienza a descender hasta los niveles de adulto desde el nacimiento (Van Evercooren et al., 1991; Kar et al., 1993). La distribución anatómica del IGF-IR está relacionada con la distribución del IGF-I e incluye la expresión en el bulbo olfatorio, cerebelo, córtex, plexo coroideo e hipocampo (Lesniak et al., 1988; Araujo et al., 1989; Kar et al., 1993).

1.4 IGF-I Y MUERTE NEURONAL:

Como se ha descrito anteriormente, la administración de factores tróficos como el IGF-I promueve el crecimiento de neuritas, neurogénesis y la supervivencia neuronal en diferentes áreas del cerebro (Torres-Alemán et al., 1990; Bozyczko-Coyne et al., 1994; Recio-Pinto et al., 1986; Zackenfels et al., 1995). El IGF-I es capaz de proteger a las neuronas contra daños importantes y condiciones patológicas.

Cuando se produce daño en el cerebro, se dispara la expresión de IGF-I, de su receptor y se incrementa la expresión de sus proteínas de unión (IGFBPs) (Bergstedt et al., 1993; Breese et al., 1996). El IGF-I es capaz de proteger cultivos embriónicos o postnatales de neuronas hipocampales, cerebelares,

septales, corticales e hipotalámicas de diferentes agresiones como: privación de glucosa, daño inducido por calcio, por estrés oxidativo o por β amiloide (Cheng et al., 1992; Dore et al., 1997; Galli et al., 1995; Kar et al., 1994; Sortino et al., 1996; Tagami et al., 1997)

El IGF-I está implicado en la respuesta neuronal contra daño tisular (Beilharz et al., 1998; Breese et al., 1996; García-Estrada et al., 1992; Kar et al., 1997; Lee et al., 1996; Sandberg et al., 1996; Walter et al., 1997; Yamaguchi et al., 1991) y protege a las neuronas contra diferentes estímulos neurodegenerativos. Por ejemplo, el IGF-I es un factor neurotrófico para las motoneuronas (Lewis et al., 1993; Giulio et al., 2000), protegiéndolas de la muerte inducida por axotomía. El IGF-I es también protector contra la hipoxia-isquemia (Gluckman et al., 1992; Guan et al., 1996, 2000; Tagami et al., 1997; Wang et al., 2000) y protege a gran cantidad de neuronas de daños neurotóxicos, como a células granulares de cerebelo (Leski et al., 2000) y neuronas del hilus hipocampal (Azcoitia et al., 1999) de toxicidad por ácido kaínico, neuronas hipocampales de toxicidad por β amiloide (Dore et al., 1997) y hierro (Zhang et al., 1993), neuronas del núcleo de la oliva inferior contra 3-acetil piridina (Fernandez et al., 1999); neuronas estriatales contra ácido quinolínico (Alexi et al., 1999) y neuronas dopaminérgicas de sustancia nigra contra 6-hidroxidopamina (Guan et al., 2000). Además de proteger a las neuronas contra la muerte, el IGF-I es capaz de inducir recuperación de funciones después de diferentes formas de daño cerebral (Fernández et al., 1998; Saatman et al., 1997).

En experimentos *in vivo* se han descrito los efectos protectores del IGF-I en telencéfalo y en neuronas espinales motoras contra isquemia-hipóxica y axotomía (Gluckman et al., 1992; Neff et al., 1993; Li et al., 1994; Zhu et al., 1994).

En la supervivencia promovida por IGF-I, la activación de la vía PI3 quinasa es

esencial (Ryu et al., 1999). Experimentos con inhibidores farmacológicos, así como la expresión de formas normales e inhibidoras de Akt han demostrado que esta quinasa es la responsable de mediar la supervivencia dependiente de la PI3 quinasa. Este y otros descubrimientos sugieren que en el sistema nervioso en desarrollo, Akt es un mediador crítico de la supervivencia neuronal inducida por factores tróficos (Dudek et al., 1997).

Un ejemplo de protección por IGF-I frente a apoptosis se da en las neuronas granulares de cerebelo en cultivo, estas neuronas pueden ser protegidas añadiendo al medio una concentración alta de K^+ (25 mM), si esta concentración de K^+ se sustituye por una más fisiológica (5mM) las células diferenciadas degeneran (D'Mello et al., 1993). Esta muerte se puede prevenir añadiendo al medio IGF-I, pero no sirven otros factores neurotróficos (D'Mello et al., 1997). Los efectos de supervivencia promovidos por el alto K^+ y el IGF-I en las células granulares de cerebelo pueden ser abolidos por inhibidores de la PI3 quinasa como LY294002 (30 μ M) o wortmannin (1 μ M) (Miller et al., 1997; Leski et al., 2000).

El IGF-I es también capaz de proteger a las neuronas contra una gran cantidad de mecanismos patológicos asociados con la sobreproducción glial de citoquinas proinflamatorias (Dore et al., 1997; Feldman et al., 1997). En cultivos de astrocitos el IGF-I es capaz de regular $NF\kappa B$, un factor de transcripción que juega un papel fundamental en la reacción inflamatoria (Baeuerle et al., 1999). El IGF-I induce una desfosforilación específica de $NF\kappa$ (fosfoserina³²) en astrocitos, esta fosforilación protege al $NF\kappa$ de la degradación inducida por el factor de necrosis tumoral ($TNF\alpha$) (Pons et al., 2000).

Como se ha podido comprobar con los distintos ejemplos, los niveles de IGF-I aumentan tras lesiones cerebrales, independientemente de su tipo (Torres-Aleman, 1999) sugiriendo que este factor trófico podría ejercer un papel de

amplio espectro en protección neuronal. Es posible que el IGF-I interactúe en todos los procesos neurodegenerativos modulando vías comunes de muerte, como la muerte celular programada (Singleton et al., 1996; Torres-Aleman et al., 1992) o desequilibrios energéticos (Heck et al., 1999). Otra alternativa, sería que el IGF-I ejerciera una protección tónica en neuronas y su pérdida estuviera unida al daño celular. (Saltiel, 2001).

A pesar de que el IGF-I es capaz de rescatar a las neuronas de muchos tipos de agresiones, la excitotoxicidad parece resistirse a esta capacidad de supervivencia inducida por el IGF-I, por ello son muchos los trabajos que intentan describir el efecto que esta agresión produce sobre los diferentes factores tróficos.

2. EXCITOTOXICIDAD EN EL SNC:

La excitotoxicidad se refiere a la muerte neuronal provocada por la activación sostenida de receptores de aminoácidos. El neurotransmisor excitatorio principal en el cerebro y la médula espinal es el ácido glutámico. Un trauma en el sistema nervioso central causa una elevación en los niveles locales de glutamato extracelular hasta ocho veces la concentración normal. Concentraciones de glutamato elevadas, mantenidas por periodos de tiempo superiores a unos minutos, tienen como resultado la muerte neuronal. La acción excitotóxica del glutamato puede reproducirse *in vitro*, en cultivos de neuronas dissociadas o en cultivos organotípicos (rodajas de tejido cerebral), donde las condiciones experimentales pueden ser controladas con precisión. Cuando estos cultivos son mantenidos en un medio similar a las condiciones de penumbra isquémica (anoxia parcial e hipoglucemia) y son expuestos a glutamato, se observa muerte neuronal. Así, algunas de las causas fundamentales de muerte neuronal se derivan de la elevación en la concentración de calcio intracelular, que ocurre tras la interacción del glutamato con sus diversos receptores, tanto neuronales como gliales. Muchas evidencias han hecho pensar que la excitotoxicidad está implicada como mecanismo de muerte celular tanto en enfermedades neurológicas agudas como crónicas. Esta posibilidad fue sugerida originalmente en un trabajo de Lucas y Newhouse (Lucas et al., 1957) en el que mostraban que la administración sistémica de glutamato en ratones provocaba degeneración en la retina. En estudios posteriores de Onley (Onley et al., 1969) se ligó la neurotoxicidad a la activación de receptores de aminoácidos excitatorios, y se acuñó el término "excitotoxina". Un gran paso fue la observación de Rothman (Rothman et al, 1984) que relacionó a los aminoácidos excitatorios con la muerte celular

mediada por anoxia en los cultivos de hipocampo, y la demostración de que los antagonistas de NMDA podían disminuir el daño isquémico en el hipocampo. Trabajos posteriores han aportado muchos datos sobre el papel de los aminoácidos excitatorios en enfermedades neurológicas agudas como apoplejías, traumas e hipoglicemias (Beal., 1992). Un avance importante en dilucidar el mecanismo de excitotoxicidad *in vitro* surgió de la observación por parte de Choi (Choi., 1987) de que la neurotoxicidad provocada por el glutamato podía ser dependiente de calcio. En los años 90, Randall y Theayer (Randall et al., 1992) describieron en tres fases los cambios del calcio intracelular antes de la muerte celular tras excitotoxicidad por glutamato en cultivos de neuronas hipocampales de rata; 5 minutos de exposición a glutamato provoca una fase inicial en el que se incrementa la concentración de calcio intracelular que dura unos 5-10 minutos, seguida de una fase de latencia de unas 2 horas en la que el calcio vuelve a sus niveles normales. En la tercera fase se produce una subida gradual del calcio intracelular asociada con la muerte celular. La posterior muerte celular depende según los autores de la presencia de calcio extracelular. La excitotoxicidad por glutamato mediada por los receptores de AMPA/kainato daña no solo a las neuronas, sino a las células productoras de mielina del sistema nervioso central, los oligodendrocitos (McDonald et al., 1998). En la esclerosis múltiple, la mielina, los oligodendrocitos y algunos axones se pierden como resultado de un ataque inflamatorio en el SNC (Prineas et al., 1998). Ya que el glutamato es liberado en grandes cantidades por activación de células inmunes (Piani et al., 1991), se comprobó que durante la inflamación producida en la esclerosis múltiple la excitotoxicidad por glutamato contribuía a la lesión en roedores. Utilizando el antagonista de receptores de glutamato AMPA/kainato, NBQX se demostró que había un alivio sustancial de la enfermedad, una mayor supervivencia de

oligodendrocitos y una disminución en la defosforilación del neurofilamento H, un indicador de daño neuronal (Trapp et al., 1998). La excitotoxicidad por glutamato parece ser un mecanismo importante en la desmielinización autoinmune, y su prevención con antagonistas AMPA/kainato puede ser una terapia efectiva para el tratamiento de la esclerosis múltiple (Pitt et al., 2000).

Los gliomas son los tumores más comunes en el SNC. El glioblastoma multiforme es altamente maligno, y casi siempre resulta en un tumor de consecuencias fatales. Se basa en la transformación cancerosa de astrocitos. Trabajos con líneas celulares de glioblastoma C6 y RG2 han demostrado una relación entre el crecimiento de estos tumores y un exceso de glutamato, haciendo pensar que este glutamato provoca un proceso excitotóxico que se traduce en la destrucción de tejido cerebral y crecimiento del tumor, explicando así la particular naturaleza invasiva y destructiva de los gliomas (Ye et al., 1999; Takahiro et al., 2001). Estudios *in vitro* han informado de la capacidad de astrocitos normales de liberar glutamato mediante un proceso dependiente de la activación de la prostaglandina E₂ (Bezzi et al., 1998; 2001). Las terapias de lucha contra estos tumores se están basando por tanto, en conseguir un nivel normal del glutamato en el sistema nervioso central (Rzeski et al., 2001). La liberación de glutamato durante anoxia cerebral o isquemia produce muerte neuronal (Choi et al., 1990), provocando daños tanto físicos como mentales. El mecanismo por el que se libera glutamato en estas enfermedades no está claro, se han postulado cuatro mecanismos de liberación: liberación vesicular dependiente de calcio externo (Drejer et al., 1985) o liberación de calcio desde reservorios intracelulares (Katchman et al., 1993); liberación desde canales aniónicos activados por inflamación (Bednar et al., 1995; Bezzi et al., 1998); o un funcionamiento dependiente de los transportadores de glutamato (Szatkoski et al., 1990, 1991). Trabajos con rodajas de hipocampo han demostrado que la

homeostasis del glutamato mediada por su transportador falla de manera drástica durante los procesos isquémicos , impidiendo la recaptación del glutamato extracelular y provocando la muerte neuronal (Rossi et al., 2000).

2.1 EXCITOTOXICIDAD E IGF-I:

Los factores neurotróficos son necesarios en la supervivencia, desarrollo y vida adulta de las neuronas del sistema nervioso central (Oppenheim., 1989; Davies., 1994). Datos obtenidos de sistemas *in vitro* sugieren que los factores neurotróficos (NTFs) protegen a las neuronas (1) reduciendo el exceso en la concentración de calcio intracelular inducida por la activación de receptores ionotrópicos de glutamato, (2) reduciendo la expresión en la superficie celular de receptores ionotrópicos de glutamato, (3) modulando proteínas que tamponan la subida de calcio o (4) reduciendo la acumulación de superóxidos intracelulares que provocan una subida sustancial en la concentración intracelular de calcio (Mattson et al., 1993, 1995; Brandoli et al., 1998; Klocker et al., 1998). Por el contrario, Algunos factores neurotróficos son capaces de hacer que las neuronas sean más sensibles a la excitotoxicidad. En un modelo hipóxico/isquémico, en el que la muerte de las neuronas corticales es producida por excitotoxicidad, la incubación de las células con el factor neurotrófico BDNF y la neurotrofina (NT) 3 y 4/5 aumenta la muerte neuronal (Koh et al., 1995). Los factores neurotróficos potencian también la excitotoxicidad en otros tipos de cultivos celulares (Pret., 1996; Morrison et al., 1998).

Los cultivos postnatales de neuronas tienen un mayor porcentaje de muerte inducida por excitotoxicidad que las neuronas en desarrollo, se ha hipotetizado que los factores neurotróficos pueden tener un papel en el aumento de la

vulnerabilidad a la excitotoxicidad acelerando su maduración (Samdani et al., 1997). El factor neurotrófico BDNF puede actuar directamente sobre neuronas induciendo susceptibilidad a la muerte excitotóxica mediada por receptores ionotrópicos de glutamato. En este proceso parece estar implicada la activación de TrkB y la señalización a través de la vía de la PI3 quinasa (Hugh et al., 2000).

El IGF-I es capaz de modular la plasticidad neuronal mediante múltiples procesos incluyendo la regulación de diversos tipos de canales iónicos, los niveles de Ca^{2+} , la respuesta de neurotransmisores, la remodelación sináptica o la arborización neuronal (Torres-Alemán et al., 1999). Un ejemplo de esta capacidad del IGF-I se ha comprobado sobre la plasticidad sináptica, el IGF-I modula la actividad de los receptores ionotrópicos de glutamato deprimiendo a los receptores AMPA, potenciando los Kainato y sin afectar a los NMDA (González de la Vega et al., 1998, 2001; Man et al., 2000; Wang et al., 2000). Otro ejemplo se da en cultivos maduros de neuronas granulares de cerebelo donde se produce una mayor sensibilidad a kainato (Kato et al., 1991). Esta sensibilidad aumenta notablemente cuando se retira el suero del cultivo. Si se añade el GF-I a un cultivo sin suero, éste previene el desarrollo de sensibilidad a kainato (Leski et al., 2000).

3. EL GLUTAMATO Y SUS RECEPTORES:

Dentro del sistema nervioso central el glutamato no se limita a mediar la neurotransmisión excitatoria, sino que presenta gran número de funciones adicionales (Michaelis., 1998): 1. Actúa como neurotransmisor excitador de acción rápida; 2. Participa en la inducción y mantenimiento de cambios a medio y largo plazo en la excitabilidad neuronal (plasticidad sináptica), asociados a procesos de memoria y aprendizaje. Actúa como estímulo quimiotáctico durante la sinaptogénesis y el desarrollo embrionario. 3. Actúa como desencadenante de procesos de migración neuronal. 4. Modula el crecimiento axonal y la formación de sinapsis. 5. Promueve la supervivencia de ciertas poblaciones neuronales. 6. Produce cambios en la actividad metabólica, la expresión génica y la síntesis de proteínas. 7. Presenta un papel destacado en procesos neurodegenerativos.

El glutamato ejerce sus acciones a través de varias clases de receptores que pueden ser diferenciados no solo molecularmente, sino también en función de sus características farmacológicas y electrofisiológicas (Michaelis, 1998; Ozawa et al., 1998). De forma general los receptores de glutamato se clasifican en :

Receptores ionotrópicos: forman un canal iónico activado por ligando. Su activación conlleva un incremento en la permeabilidad de la membrana celular a Na^+ , K^+ y Ca^{2+} , fundamentalmente. En base a sus propiedades farmacológicas, se pueden dividir en tres clases:

Receptores tipo AMPA (ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico)

Receptores tipo Kainato (ácido kaínico)

Receptores tipo NMDA (N-metil-D-aspartato)

Receptores metabotrópicos: están acoplados, a través de la activación de proteínas G, a sistemas de segundos mensajeros con efectos funcionales diversos.

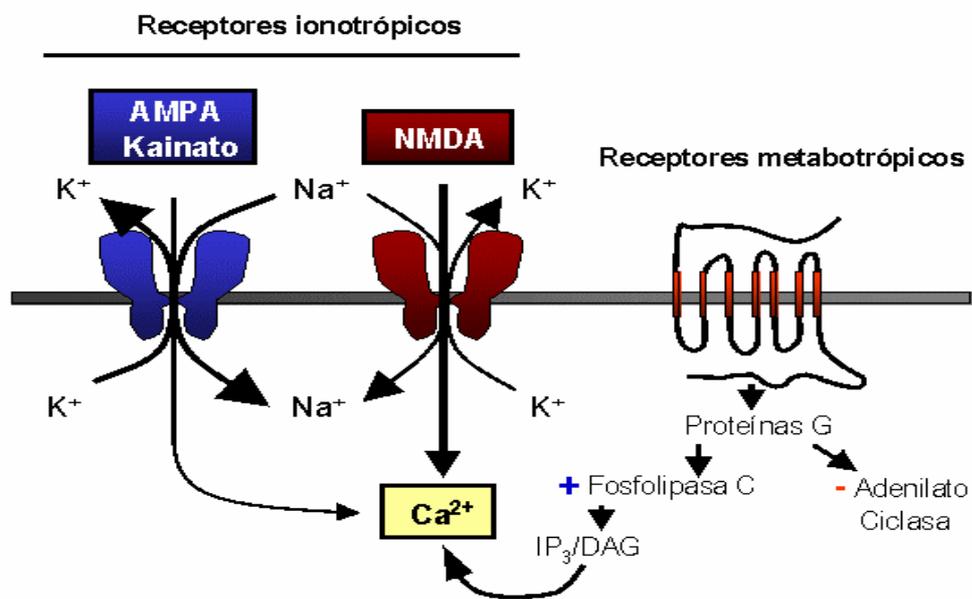


Figura 4: representación de los tipos de receptores de glutamato.

3.1 RECEPTORES DE GLUTAMATO Y EXCITOTOXICIDAD:

Como ya hemos dicho la excitotoxicidad es el mecanismo más importante que contribuye a la neurodegeneración durante la isquemia, el trauma y otros desórdenes neurológicos en el sistema nervioso central (Sattler et al., 2000). El aumento desmedido de actividad de los receptores de glutamato se traduce en una liberación excesiva de glutamato, el neurotransmisor excitatorio más

importante del sistema nervioso central de mamíferos. El glutamato es capaz de activar a gran cantidad de receptores de membrana postsinápticos, que con su activación abren sus canales iónicos asociados para producir flujos de entrada o de salida. Esto va unido a un cambio en la concentración iónica intracelular, los flujos mejor caracterizados son los de sodio, los de cloruro y los de calcio. Un exceso de iones calcio es capaz de activar al calcio intracelular dependiente de señalización que a su vez activa a gran cantidad de señales de segundos mensajeros, lo que normalmente va unido a muerte neuronal (Sattler et al., 2000).

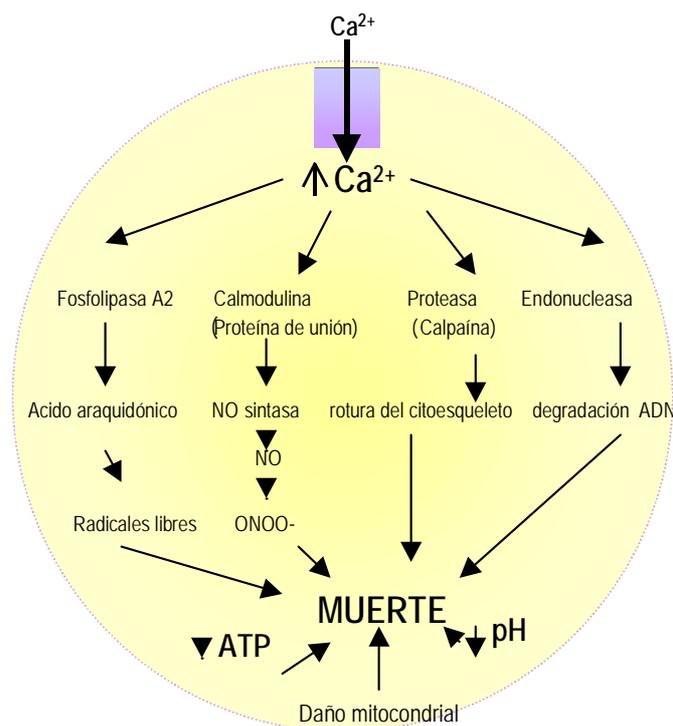


Figura 4: representación esquemática de los mecanismos propuestos por los que el aumento del calcio intracelular podría disparar fenómenos secundarios que resultan en neurotoxicidad (Sattler et al., 2000).

Aunque las bases moleculares de la toxicidad del glutamato son todavía desconocidas, se acepta de manera general que el calcio juega un papel importante (Choi; 1985; 1987; 1995). Además se acepta que el subtipo de receptor de glutamato NMDA juega un papel fundamental como mediador de ciertos aspectos de la neurotoxicidad inducida por glutamato, posiblemente permitiendo que aumente la permeabilidad al calcio (Choi 1988; 1996).

Los receptores de glutamato tipo NMDA y tipo kainato pueden provocar muerte neuronal dependiente de calcio en cultivos primarios de neuronas de rata (Choi, D. 1998; Favaron et al, 1988; Novelli et al. 1988; Schramm et al, 1990; Carafoli., 1987).

La exposición de células a glutamato provoca, entre otras cosas, una rápida e irreversible pérdida de fosforilación de Akt-1 y de su actividad quinasa; estos efectos están estrechamente unidos a excitotoxicidad y activación de caspasa 3, pero se pueden prevenir pretratando las células con litio, ya que produce un rápido incremento de la actividad PI3 quinasa, que provoca un aumento en la actividad quinasa de AKT-1; esta protección del litio puede ser bloqueada mediante inhibidores de la PI3 quinasa (Chalecka-Franaszek et al., 1999).

En condiciones normales, determinados mecanismos de regulación mantienen estables las concentraciones de calcio iónico en el citoplasma de las neuronas. Pero, tras la estimulación excesiva de los receptores de glutamato, se desestabiliza la homeostasis del calcio y esto provoca la subsiguiente activación y translocación (desde el citoplasma a la membrana) de proteína quinasas C dependientes de calcio/ fosfolípidos que parecen tener un papel relevante en la limitación de la amplificación de acciones ligadas a la neurotoxicidad (Favaron et al., 1988; Novelli et al., 1988; Vaccarino et al., 1987; Ogura et al., 1988). La inhibición producida por gangliósidos naturales (Favaron et al., 1988; Novelli et al., 1988) y sus derivados semisintéticos

(Manev et al., 1990) de no sólo la traslocación PKC inducida por glutamato sino también de su neurotoxicidad, sugieren que la fosforilación de proteínas de membrana inducida por el glutamato, vía PKC, provoca desestabilización de los mecanismos que mantienen estable la concentración de calcio citosólico.

4. PROTEÍNA QUINASAS C:

Las Proteína quinasas C (PKCs) son una familia de serina/treonina quinasas dependientes de fosfolípidos en las que se incluyen 10 isoenzimas que se diferencian en su estructura hasta en cuatro variables, manteniendo tres regiones constantes además de su función (Toker, A. 1998; Parekh, D.B. et al., 2000). Estas isoenzimas se agrupan en tres clases (Dempsey et al., 2000; Musashi et al., 2000):

1. PKCs clásicas o convencionales, cPKCs PKC α , β (β I y β II) y γ : pueden ser activadas por diacilglicerol, fosfatidilserina y ésteres de forbol y tienen un sitio de unión a calcio en su segunda región constante, C2.

2. PKCs noveles δ , ϵ , η y θ : no tienen región constante C2 por lo que son independientes de calcio, pero responden a diacilglicerol, fosfatidilserina y ésteres de forbol.

3. PKCs atípicas $\lambda/1$, ζ : carecen también de la región C2, son por lo tanto independientes de calcio y solo responden a fosfatidilserina y no a diacilglicerol o a ésteres de forbol.

La familia de transductores de señal Proteína quinasa C (PKC) está caracterizada por una dependencia a lípidos para su actividad, especialmente las PKCs clásicas (cPKCs α , β , γ) y las noveles (nPKCs δ , ϵ , η , θ). Los distintos subtipos tienen requerimientos fisiológicos distintos de diacilglicerol para realizar su actividad.

Se ha comprobado que las PKCs están implicadas en vías de transducción de señales intracelulares que regulan crecimiento y están ligadas a diferenciación y apoptosis (Li et al., 1995; Mischak et al., 1993; Ascender et al., 1994). El mecanismo de activación bioquímico de las PKCs fue deducido tras el

descubrimiento de la activación y fosforilación de las PKCs clásicas por ésteres de forbol y diacilglicerol, en su bucle de activación por la quinasa dependiente de fosfoinositoles (PDK1). Esta fosforilación inicial desencadena la autofosforilación en sitios en el carboxiterminal, este es el primer paso para generar el enzima maduro (Dutil et al., 1998). De todas formas, la función exacta de todas las isoenzimas PKCs no se conoce, y el papel de las PKCs en algunos procesos biológicos de importancia tiene que ser todavía estudiado. De cualquier manera, algunos artículos sobre la acción de las PKCs son contradictorios (Webb et al., 2000; Wert et al., 2000). La diferente expresión de los isoenzimas depende del sistema celular. Estructuralmente, las isoenzimas PKCs son bastantes similares, y su sustrato específico *in vitro* es casi idéntico (Kazanietz et al., 1994).

Las diferentes isoenzimas, sin embargo, cumplen distintas funciones biológicas *in vivo*. Por ejemplo la PKC δ reduce la proliferación de fibroblastos NHI 3T3 y detiene las células de ovario de hamster chino en la fase G₂/M en respuesta a 12-O-tetradecanoylforbol-13-acetato (TPA) (Watanabe et al., 1992) e induce la diferenciación de células promieloides de ratón (Mischak et al., 1993). Por el contrario, la sobreexpresión de PKC ϵ en fibroblastos de roedores estimula la proliferación celular, induce el crecimiento independiente de anclaje y provoca tumores en ratones desnudos (Mischak et al., 1993; Cacace et al., 1993). Además, las PKCs han sido implicadas en vías de apoptosis durante muchos años (Dempsey et al., 2000; Ghayur et al., 1996; Cross et al., 2000), pero una vez más a este respecto no hay consenso entre los investigadores. Se ha comprobado que las isoformas de PKC α , ϵ y ξ están sobreexpresados en el músculo esquelético de animales genéticamente diabéticos, *Psammomys obesus*, siendo la isoforma más abundante la ϵ . La expresión/actividad alterada de la PKC ϵ , puede contribuir al desarrollo de la diabetes en estos animales,

junto con los otros subtipos y puede estar implicado en el progreso de la enfermedad. Esta posibilidad ocurriría a través de la inhibición de la actividad tirosina del receptor de insulina por una fosforilación en serina/treonina del IRS-1 (Ikeda et al., 2001).

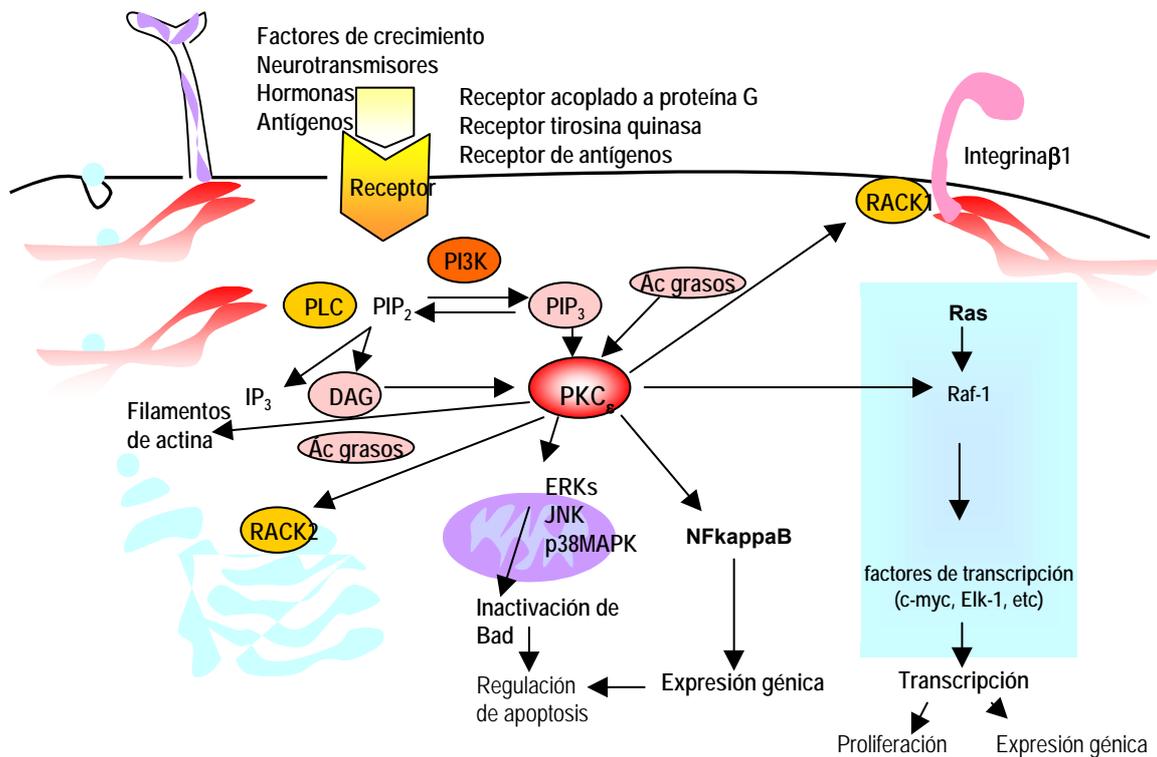


Figura 5: Señalización de PKC epsilon en varios tipos celulares. PKC ϵ se activa por DAG, PIP3 y ácidos grasos generando diferentes estímulos, y mediando distintas respuestas, tales como, apoptosis, adhesión y movilidad. (Akita, 2002; modificado).

4.1 PROTEÍNA QUINASA C Y MUERTE NEURONAL:

El tejido neuronal contiene altos niveles de expresión y actividad de algunos subtipos de la proteína quinasa C (PKC) (Tanaka et al., 1994; Battaini, 2001). La activación de PKC en células nerviosas está asociada con el control de canales iónicos, con la desensibilización de receptores y el aumento de respuesta a neurotransmisores. Además, en comportamiento existen evidencias genéticas y farmacológicas que subrayan la importancia de PKC en el proceso de aprendizaje y memoria (Le Merrer et al., 1994; Takana et al., 1994). PKC no solo controla la proliferación, sino también la supervivencia celular. Algunos estudios recientes definen el papel específico que algunas isoformas de PKC juegan en la regulación de rutas apoptóticas. Mientras algunas isoformas son antiapoptóticas, dependiendo del sistema celular en el que se estudie, PKC δ , en particular, tiene efectos proapoptóticos actuando en diferentes poblaciones celulares (Dempsey et al., 2000), incluidas las neuronas (Maher et al., 2001).

En fenómenos neurodegenerativos agudos como la isquemia cerebral; los estudios en animales y con cultivos celulares indican que un incremento del calcio intracelular activa proteínas quinasas, en las que se incluye PKC, favoreciendo interacciones con segundos mensajeros/activadores y traslocándose a regiones específicas de la membrana plasmática (Domanska-Janik; 1996). En un estudio con 10 pacientes que murieron entre 1 y 52 días tras una isquemia, se estudió la actividad y la expresión de las distintas isoformas de PKC en el infarto, en la zona de penumbra y en el tejido contralateral no afectado (Krupinski et al., 1998). La penumbra isquémica mostraba un aumento en los niveles de PKC γ mientras que el tejido infartado mostraba un aumento

en la isoforma PKC β y la isoforma α . Es interesante que los cambios en la actividad PKC no se correspondan con la expresión de sus isoformas. Una cascada de activación de las isoformas PKC podría estar asociada con la progresión del daño isquémico (Battaini; 2001).

En otro tipo de fenómeno de neurodegeneración aguda como los traumas cerebrales se ha comprobado en estudios con animales, que tras el daño cerebral las regiones que sufre degeneración neuronal experimentan un aumento en la actividad PKC: los subtipos α y β están implicados en esta pérdida (Padmaperuma et al., 1996). Estudios en humanos indican que la generación de radicales libres produce daños severos en el cerebro (Muizelaar et al., 1993). Sería posible por tanto postular que la modulación de

PKC podría ser una estrategia adicional para controlar el daño cerebral (McIntosh, 1998).

En procesos neurodegenerativos crónicos, como la enfermedad de Alzheimer, la expresión de PKC en los tejidos afectados cambia y se correlaciona con la neuropatología (Jin et al., 1995). Junto a esta observación, otros estudios han demostrado que en los cerebros de enfermos de Alzheimer, los niveles y la actividad de PKC β y ϵ están disminuídos en la corteza temporal (Matsushima et al., 1996). También se ha comprobado con extractos crudos que la actividad de PKC en hipocampo, corteza frontal y corteza temporal disminuye en estos enfermos (Wang et al., 1994), mientras que las actividades no se modifican en todas las áreas del cerebro

de enfermos de Alzheimer, cuando los extractos de enzima PKC son purificados de

moduladores endógenos, sugiriendo la posibilidad de un aumento en la actividad de inhibidores endógenos en el cerebro de los enfermos (Kurumatani

et al., 1998).

En otro proceso neurodegenerativo crónico como es la esclerosis lateral amiotrófica, se observa un incremento en la actividad PKC, tanto en sus fracciones de membrana como citosólica, en autopsias de médula espinal; y este incremento está relacionado con las isoformas calcio-dependientes (Lanius et al., 1995). También se ha observado, una tendencia al incremento de actividad PKC en la corteza motora, mientras que en la corteza visual no se observan cambios en la actividad PKC. Este dato se podría relacionar con el aumento de actividad PKC en la médula espinal, que contribuiría a la degeneración de las neuronas motoras.

ENFERMEDAD	CAMBIO PKC O ISOFORMA IMPLICADA
Isquemia Cerebral (IC)	Aumento de PKC γ
IC	Aumento en PKC β
Enfermedad de Alzheimer	Decremento en los niveles y actividad de PKC β y ϵ . Decremento en la actividad y traslocación de PKC. Decremento en la unión a ésteres de forbol. Disminución de los receptores PKC β II y RACK1
Enfermedad de Parkinson	Disminución en la unión a ésteres de forbol
Enfermedad de Huntington	Disminución de PKC β II y aumento de PKC α
Esclerosis lateral amiotrófica	Incremento de actividad PKC y de isoformas cPKC
Desorden Bipolar	Aumento de la traslocación en membrana de PKC y en los niveles de PKC γ y ξ .
Depresión Unipolar	Aumento en la unión a ésteres de forbol

Tabla 1: relación entre enfermedades del SNC y cambios en los niveles de activación de PKC en el cerebro humano.

4.2 PKCS Y GLUTAMATO:

Algunas familias de proteínas quinasas, en las que se incluyen las isoenzimas de la familia de serina/treonina de la proteína quinasa C (PKC), son activadas tras daño cerebral. Las PKCs son quinasas dependientes de calcio y fosfolípidos (Tanaka et al., 1998). Son abundantes en el cerebro y se activan de manera diferente en función del estímulo externo; dentro de estos estímulos se incluye la excitotoxicidad (Buchner et al., 1999; Nakayama et al., 1998)

Uno de los modelos de muerte celular excitotóxica más utilizados *in vivo* es la administración sistémica de kainato, un análogo del glutamato que activa de manera directa a varios tipos de receptores de AMPA/kainato y de manera indirecta también a los receptores de NMDA (Berg et al., 1993; Virgili et al., 1992). Si nos fijamos en el hipocampo de rata tras la administración sistémica de kainato, podemos observar que la expresión de las isoformas clásicas de PKC (α , β y γ) se mantiene dentro de sus valores normales o incluso disminuye, mientras que la expresión de las isoformas noveles δ , ϵ y el subtipo atípico PKC ξ aumentan de manera secuencial frente al mismo estímulo (Kaasinen et al., 2002). Autores como Guglielmetti (Guglielmetti et al., 1997) estudiaron la expresión de las PKCs clásicas y PKC ϵ en el hipocampo, tras la administración sistémica de ácido kaínico, y concluyeron que esta administración sistémica provocaba una disminución significativa de la expresión de PKC γ junto a una tendencia a la reducción en la expresión de PKC α y β en la región CA1 entre el día 1 y 2 de la administración del kainato. Así mismo, observaron un aumento en la expresión de PKC ϵ en células granulares del giro dentado, pero no en las regiones CA1 y CA2 días después de la administración del kainato.

Las células granulares de cerebelo (que contienen mayoritariamente los subtipos de PKCs α y β) en cultivo sometidas a tratamiento de 24 horas con

ésteres de forbol (12-miristato 13-acetato, PMA) no solo reducen de manera drástica el contenido y la actividad catalítica de PKC, sino que también previenen la desestabilización inducida por glutamato de la concentración citosólica de calcio y en consecuencia la neurotoxicidad que éste provoca (Favaron et al., 1990). Cuando la PKC se reduce en un 90%, el 80% de las neuronas quedan protegidas frente a la muerte inducida por glutamato. Esta protección es comparable a la obtenida con las dosis más protectoras de gangliósidos o con antagonistas no competitivos de los receptores NMDA. De cualquier manera el pretratamiento con PMA disminuye sensiblemente el efecto del glutamato incluso con dosis muy altas (1mM) y no requiere la presencia de PMA en el medio de incubación. La protección producida por PMA persiste durante horas después de que la droga haya sido retirada del medio.

Se ha comprobado también, que la Activación de PKC aumenta la apertura de canales NMDA y recluta nuevas moléculas de canal a la superficie celular por regulación de la exocitosis. La PKC debe regular una o varias proteínas implicadas en el reciclaje del receptor y su diana, ya que aumenta el número de los receptores NMDA en la sinapsis (Lan et al., 2001)

4.3 PKCS Y FACTORES TRÓFICOS:

Las diferentes isoformas de la Proteína quinasa C (PKC) van a jugar un papel importante en muchas vías de señalización de factores tróficos, tanto en su activación y regulación como en alguno de los pasos de su cascada de señalización.

1. Moduladores de vías de factores tróficos:

Algunas isoformas de PKC son potencialmente importantes moduladores en la cadena de señalización de la insulina y pueden estar involucrados en la

patología celular de resistencia a insulina (Kellerer et al., 1998). Por ejemplo, el factor de necrosis tumoral ($TNF\alpha$) estimula a la $PKC\epsilon$ que a su vez inhibe al receptor de insulina humano (Kellerer et al., 1998). La PKC activada por forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) disminuye la fosforilación en tirosina del IRS-I y su capacidad para unirse a al PI3 quinasa activada (De Fea et al., 1997^a; 1997b; Kellerer et al., 1998; Li et al., 1999). La PKC disminuye esta fosforilación aumentando la fosforilación en serina y treonina del IRS-I (Danielsen et al., 1995; Barthel et al., 1995; De Fea et al., 1997^a; 1997b; Li et al., 1999) provocando de este modo la imposibilidad de activación de Akt por IGF-I (Zhen et al., 2000). Mutaciones puntuales en la serina 612 del IRS-1 impiden que este pueda ser fosforilado por la PKC , indicando que esta serina juega un papel fundamental (de Fea et al., 1997).

2. Acciones realizadas por la PKC tras la acción de los factores tróficos:

En la ruta de señalización de la PI3 quinasa la $PKC\xi$ va a jugar un papel importante como efector de las acciones metabólicas de la insulina (Standearth et al., 1997; Bandyopadhyay et al., 1999; Etgen et al., 1999; Nystrom et al., 1999). Además, la $PKC\xi$ es mediadora de otras acciones biológicas de la insulina, incluyendo activación de la quinasa p70 S6 (Romanelli et al., 1999), ERK2 (Sajan et al., 1999), NHE1 (Sauvage et al., 2000) y estimulación de síntesis proteica (Mendez et al., 1997). De todas formas, los sustratos que se encuentran por debajo de $PKC\xi$ en la ruta de señalización de la insulina no han sido todavía identificados.

Se ha visto que el IRS-1 es un sustrato fisiológico de la $PKC\xi$. La fosforilación de IRS-1 por $PKC\xi$ representa un ejemplo adicional de retroalimentación negativa de IRS-1 por una Serina/treonina quinasa que se encuentra por debajo de PI3 quinasa (Ravichandran et al., 2001). La retroalimentación de control sobre IRS-1 existe porque serina/treonina quinasas que se encuentran

debajo de PI3 quinasa, como GSK y Akt son capaces de fosforilar a IRS-1 y modular su función (Eldar-Finkelman et al., 1997; Li et al., 1999; Paz et al., 1999). La existencia de mecanismos de retroalimentación múltiple regulatoria a nivel del IRS-1 enfatiza la importancia de éste en la señalización por insulina y podría explicar los efectos de resistencia a insulina en enfermedades como la diabetes y la obesidad (Ravichandran et al., 2001). También, la fosforilación en serina del IRS por PKC ξ , se define como una regulación negativa inducida por insulina. Con drogas como Go6976 (inhibidor de PKC α , β y μ) o GF 109203X (inhibidores de α , β I, β II, γ , δ y ε) se ha comprobado que tras la estimulación con insulina añadiendo cualquiera de estas drogas a la dosis que inhibe al subtipo PKC ξ , se inhibe la fosforilación en serina de IRS-1. (Liu et al., 2001).

5. DAÑO ISQUÉMICO EN EL SNC:

Las isquemias-hipóxicas agudas o daño cerebral por asfixia son una causa muy frecuente de muerte en seres humanos. Hoy en día se reconoce que la muerte neuronal se puede producir en dos fases distintas tras un daño hipóxico-isquémico transitorio. La primera fase ocurre durante o inmediatamente después del daño isquémico y la segunda ocurre tras 6-12 h, periodo retrasado o secundario, y continúa durante otras 48-72 horas (Johnston et al., 1996). Esta fase secundaria ha sido caracterizada tanto de manera experimental (Williams et al., 1990, 1991) como en humanos neonatos que han sufrido daño por asfixia (Azzopardi et al., 1989; Wyatt et al., 1991). Se cree que el daño inicial dispara una cascada de reacciones citosólicas que va destruyendo progresivamente la maquinaria mitocondrial y celular durante muchas horas, resultando en una falta de energía secundaria y la consiguiente muerte celular (Vannucci et al., 1993). Gran cantidad de mecanismos han sido implicados, incluyendo apoptosis (Macmanus et al., 1993; Sei et al., 1994; Mehmet et al., 1994; Beilharz et al., 1995). El descubrimiento de la fase retrasada de muerte neuronal ha abierto la posibilidad de aplicar terapias de rescate neuronal algunas horas después del daño agudo con la esperanza de interferir o interrumpir la cascada citotóxica salvando a las células del cerebro que de otra manera morirían (Johnston et al., 1996).

La excitotoxicidad va a jugar un papel fundamental en la isquemia; este papel está muy bien documentado gracias a la experimentación con animales. En esos estudios se demuestra que la isquemia/hipoxia está asociada con un aumento del glutamato en el fluido extracelular, y que este disminuye su concentración con denervación glutamatérgica o con antagonistas del glutamato. La distribución del daño celular provocado por la isquemia se

corresponde con la de los receptores NMDA, aunque existen notables excepciones. La más importante se da en las células de Purkinje, en las que no existen receptores de NMDA. Los antagonistas del receptor de NMDA son muy efectivos en la zona de penumbra en modelos de isquemia focal. En estas zonas, se produce solo una disminución parcial en la energía, que tiene como resultado la activación selectiva de los receptores de NMDA (Beal., 1992).

Los modelos experimentales de isquemia cerebral en ratas se empezaron a utilizar en gran medida desde 1970 (Molinari et al., 1976), las técnicas de isquemia en las que se logra una isquemia del territorio de la arteria cerebral media (ACM) son las que presentan mayor similitud con los infartos focales en el humano en los cuales la afectación de la arteria cerebral media (ACM) se observa hasta en el 80% de todas las lesiones vasculares cerebrales (Who, 1989).

La obstrucción aguda de una de las mayores arterias cerebrales como la arteria cerebral media (ACM) produce una reducción inmediata del flujo cerebral en el área de irrigación correspondiente (isquemia focal); la reducción del flujo sanguíneo no es homogénea en el sector afectado y puede cambiar en minutos u horas especialmente cuando se restablece la perfusión (Ladecola, 1999). La isquemia se torna severa en el llamado foco isquémico, en la periferia de este se establece un anillo denominado área de penumbra en la cual la disminución del flujo es menos grave gracias a los aportes sanguíneos de las colaterales arteriales del tejido adyacente no isquémico (Back, 1998).

5.1 ISQUEMIA Y FACTORES TRÓFICOS:

Las estrategias terapéuticas para luchar contra el daño producido por la hipoxia/isquemia se centró durante años en la búsqueda de agentes que

previnieran el flujo de calcio, mediante por ejemplo, el bloqueo del receptor de NMDA (Wieloch, 1985). Pero, estudios posteriores han sugerido que los factores tróficos pueden tener un papel en la prevención del daño excitotóxico actuando como “estabilizadores de calcio” endógeno pudiendo proteger a las neuronas reduciendo el flujo de calcio, aumentando la expulsión/tamponamiento o utilizando ambos procesos. La capacidad de los factores tróficos para proteger a las neuronas del sistema nervioso central contra condiciones de isquemia/excitotoxicidad *in vitro* (Mattson et al., 1989; Cheng et al., 1991, 1992) e isquemia *in vivo* (Berlove et al., 1991; Shigeno et al., 1991) sugieren que podrían ser factores efectivos para la isquemia en humanos. La capacidad de algunos factores de crecimiento, en particular el NGF y los IGFs, para proteger neuronas, incluso cuando el tratamiento se aplica de 4 a 12 horas después del daño isquémico, sugieren que estos factores podrían ser utilizados en clínica.

En respuesta a daño isquémico unilateral en crías de ratas o en respuesta a isquemia focal en ratas adultas, se produce un aumento en la expresión del ARNm de IGF-I, junto a un aumento en las proteínas de unión IGFBP-2 e IGFBP-3 (Beilharz et al., 1993; Lee et al., 1992; Gluckman et al., 1992). *In vivo*, la administración central de IGF-I en ratas adultas tras la exposición a una hipoxia/isquemia transitoria, reduce la pérdida neuronal (Gluckman et al., 1992) y la incidencia de infarto cortical (Guan et al., 1993).

El daño hipóxico-isquémico perinatal es una causa importante de daño neurológico y muerte, y esta estimado que afecta a un 0.6% de los niños que nacen (Levene et al., 1985) y entre 5-25% de los bebés prematuros (Volpe., 1992). Modelos animales con ovejas gestantes han demostrado que la administración de IGF-I dos horas después de producirse el daño isquémico reduce significativamente las secuelas provocadas por el mismo. La capacidad

de rescate del IGF-I se comprobó en un alto rango de dosis y no se produjo ningún efecto tóxico sistémico como hipotensión, hipoglicemia, o pérdida de gases en sangre durante los siguientes cinco días tras la administración del IGF-I. Estos resultados hacen pensar que el IGF-I puede ser un agente terapéutico potencial para rescatar neuronas tras un daño hipóxico-isquémico perinatal (Johnston et al., 1996).

MATERIALES

DROGAS Y PÉPTIDOS:

- Factor de crecimiento parecido a insulina tipo I IGF-I, (GroPep, Australia) 10^{-4} M experimentos *in vivo*, 10^{-7} M para experimentos de supervivencia, 10^{-9} M para experimento *in vitro*.
- Ácido L-glutámico; 100 μ M experimentos de supervivencia, 500 μ M experimentos de bioquímica y 1 mM experimentos *in vivo*. Sigma-Aldrich, Alemania
- Phorbol 12 myristate 13 acetate (TPA) Sigma-Aldrich, Alemania. 10^{-7} M experimentos *in vitro*.
- Forskoline 10 μ M (Sigma).
- Ro-32-0432 Inhibidor específico de proteína quinasa C subtipos PKC α , PKC β I, yPKC ϵ , experimentos *in vitro* concentraciones 10nM, 50 nM y 100 nM; experimentos *in vivo* 100 μ M. Calbiochem.
- H-89, Dihydrochloride. Inhibidor específico de proteína quinasa A. Experimentos *in vitro* a concentración 10 μ M. Experimentos *in vivo* 10 μ M Calbiochem.
- Bisindolylmaleimide I, Hydrochloride. Inhibidor específico de proteína quinasa C. Experimentos *in vitro* concentración 1 μ M Experimentos *in vivo* 10 μ M. Calbiochem.
- Wortmannin inhibidor específico de fosfatidilinositol 3-quinasa inhibiendo el FMLP inducido por P₃P y su producción de aniones superóxido. Experimentos *in vitro* concentración 20 μ M Calbiochem.
- LY 294002 inhibidor específico de fosfatidilinositol 3-quinasa actuando sobre el sitio de unión con ATP. Experimentos *in vitro* concentración 25 μ M. Calbiochem.

- PD 98059 inhibidor de la fosforilación y activación de MAP quinasa quinasa (MAPKK). Experimentos *in vitro* a una concentración de 20.µM Calbiochem.
- K-252 a inhibidor de CaM quinasa. Experimentos *in vitro* a concentración 40nM. Calbiochem.
- KN-93 inhibidor de CaM quinasa II. Experimentos *in vitro* 15 µM. Calbiochem.
- PP2 inhibidor de la familia de tirosina quinasas src. Experimentos *in vitro* a concentración 50nM. Calbiochem.
- Ácido okadaico. Inhibidor de las fosfatasas PP1 y PP2B. Experimentos *in vitro* a concentraciones 0.5 nM y 50 nM. Calbiochem.
- Tautomycin inhibidor específico de las fosfatasas PP1, PP2A, y PP2B. Experimentos *in vitro* a concentración de 10 nM.
- BAPTA AM: quelante de calcio. Experimentos *in vitro* a concentración 200µM.
- Ciclosporin A inhibidor de la actividad de la calcineurina. Experimentos *in vitro* a concentración de 2 µM. Sigma-Aldrich, Alemania.
- U733122 inhibidor específico de PLCγ. Experimentos *in vitro* a concentración 10 µM.
- L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylic acid inhibidor específico de la recaptación de glutamato. Experimentos *in vivo* concentración 15 mM. Sigma-Aldrich. Alemania

MEDIOS DE CULTIVO:

- Medio Neurobasal, Gibco BRL life Technologies.
- Medio Dulbecco's Modified Eagle's + nutrient mixture F-12 Ham. Sigma- Aldrich. Alemania.

REACTIVOS PARA CULTIVO:

- EBSS Earle's balanced salts. Gibco BRL life Technologies.
- Papaina. Worthington biochemical corporation.
- Ovomucoid trypsin inhibitor. Worthington biochemical corporation.
- B-27 supplement. Gibco BRL life Technologies.
- Deoxyribonuclease I. Worthington biochemical corporation

KIT DE INFUSIÓN CEREBRAL:

- Bombas mini-osmóticas (modelo 1007D, Alza, Palo Alto, CA). Flujo de liberación constante 0.5 μ L/h durante 7 días.
- Cánula de infusión cerebral de 0.36 mm (alza, Palo Alto, CA).

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN:

Se utilizaron en todos los experimentos ratas macho adultas Wistar de pesos comprendidos entre los 230 y 250 g. Estas ratas pertenecientes a la colonia del Instituto Cajal, se mantuvieron en condiciones constantes, a una temperatura de $20 \pm 2^{\circ}$ C e iluminación controlada con ciclos alternativos de 12 horas de luz/oscuridad.

MATERIALES Y MÉTODOS

- **Anticuerpos primarios**

AC. Primarios	Inmunoreactividad	Tipo	Dilución	Péptido inmunógeno	Casa comercial
PAKT	conejo	P	1:1000	Ser 473 de AKT ratón	Cell signaling
AKT	conejo	P	1:1000	345-480 aa AKT1 humano	Cell signaling
P85	Conejo	P	1:1000		S.Pons Inst Cajal
P85	Ratón	M	1:1000		S.Pons Inst Cajal
IGF-IR	Conejo /Ratón	P/M	1:1000		S.Pons Inst Cajal
P-MAPK	conejo	P	1:1000	Thr202/ Tyr204	Cell signaling
PKC total	Ratón	M	1:1000		Sigma
Calbindina	Conejo	P	1:5000	Calbindina recombinante	Swant
IRS I	Conejo/Ratón	P/M	1:1000		S.Pons Inst Cajal
Pser IRS-I	Conejo	R00	1:1000		Upstate
IRS II	Conejo	P	1:1000		S.Pons Inst Cajal
P-P38	Conejo	P	1:1000	Thr180/ Tyr182	Cell signaling
P38	ratón	M	1:1000	Aa213-360 p38 humano	Santa Cruz
JNK	Conejo	P	1:1000	Thr 183/ Tyr185	Cell signaling
Glur2/3	Conejo	P	1:1000		E.Gcía Spons
PY20	Ratón	M	1:1000	Anti-PTyr	Transduction Lab
4G10	Ratón	M	1.1000	Anti-PTyr	Upstate

P policlonal; M monoclonal.

- **Anticuerpos secundarios:**

AC Secundario	Inmunoreactividad	Tipo	Uso	Casa Comercial
Anti conejo	Conejo	Unido a peroxidasa	1:20000	Jackson
Anti Ratón	Ratón	Unido a peroxidasa	1:20000	Jackson
Anti Proteína A/G	Conejo	Unido a peroxidasa	1:20000	Santa Cruz

MÉTODOS

1. CULTIVO DE CÉLULAS GRANULARES DE CEREBELO:

Para la realización de cada cultivo de células granulares de cerebelo se utilizaron ratas Wistar de siete días (P7) de la colonia del Instituto Cajal (CSIC); los animales son sacrificados mediante decapitación y con la ayuda de una lupa se extrae el cerebelo en medio salino equilibrado (EBSS, GIBCO BRL) se limpia de meninges y vasos y se trocea con pinzas. Una vez que el tejido está reducido a pequeñas porciones comienza la digestión química con papaína (Worthington) y DNAsa (Worthington) a pH ácido en agitación a 37° C. La digestión dura una hora; transcurrido este tiempo se detiene con una centrifugación en gradiente con un ovomucoide (inhibidor de la papaína), según las instrucciones del fabricante (Worthington).

Los cultivos se siembran en medio de cultivo para neuronas Neurobasal (Gibco BRL) suplementado con B27 (Gibco BRL), glutamina (Sigma) y 25mM de KCl (Merk) para estudios bioquímicos y contajes celulares con tratamientos agudos.

Para estudios con tratamientos crónicos con IGF-I las células granulares son sembradas en Medio DMEM-F12 (Sigma) suplementado (selenio (Sigma), glutamina (Sigma), transferrina-putrescina (Sigma), ácido araquidónico (Sigma) y 25 mM KCl (Merk)), optamos por este medio para los experimentos crónicos ya que el B-27 contiene insulina.

Las densidades de siembra de las células granulares era diferente según el experimento y protocolo a realizar (ver más adelante).

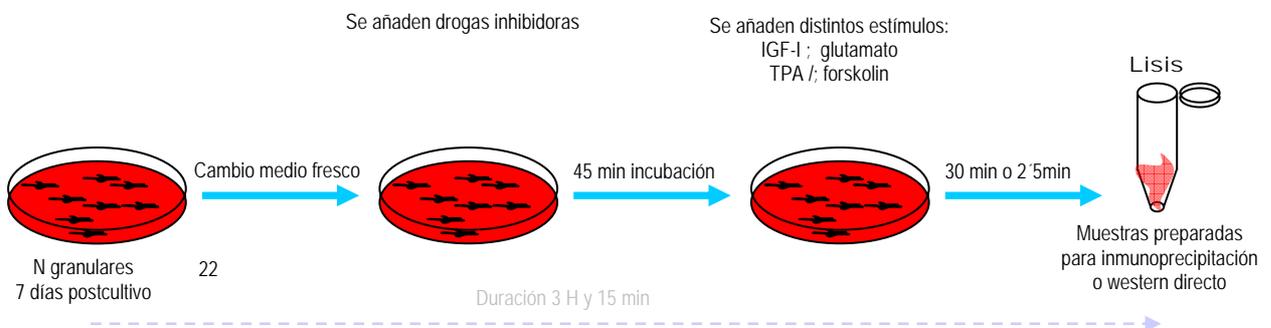
Las placas utilizadas para ensayos de excitotoxicidad y contajes fueron placas de 6 pocillos con $1.5 \cdot 10^6$ células por pocillo.

Todos los experimentos fueron realizados siete días postcultivo.

2. ENSAYO DE EXCITOTOXICIDAD IN VITRO:

Se utilizan tres protocolos diferentes:

2.1 PRIMER PROTOCOLO. Para la determinación de vías de señalización intracelulares:



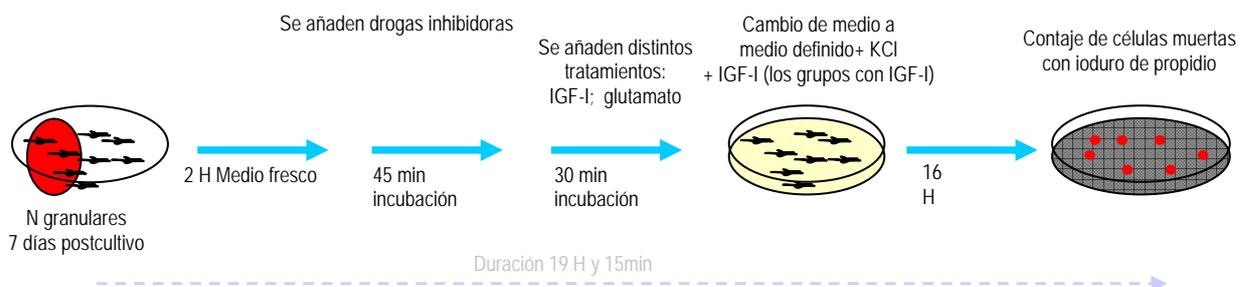
Los cultivos primarios de células granulares de cerebelo de siete días a una concentración de 2 millones de células por pocillo en placas de 35 mm², se cambian a un medio definido: Neurobasal sin suplementos y KCl 25mM durante 2 horas y 30 minutos.

El protocolo de administración de drogas inhibidoras, agonistas, IGF-I y glutamato fue el siguiente:

1. Las drogas inhibidoras se añadieron 45 minutos antes de comenzar el ensayo.
2. El glutamato, IGF-I, los agonistas... son añadidos juntos en cada pocillo.
3. Tiempos de actuación de los distintos tratamientos:
 - 2'5 minutos para fosforilación del receptor de IGF-I e IRS.
 - 30 minutos para la fosforilación de AKT
4. Transcurridos los diferentes tiempos las células son lisadas en frío en tampón de lisis.

5. Se centrifuga los lisados a 14000 r.p.m durante 10 minutos y se congelan los sobrenadantes para su posterior utilización para westernblot.

2.2 SEGUNDO PROTOCOLO: Para la determinación de excitotoxicidad por glutamato:



Los cultivos primarios de células granulares de cerebelo de siete días y concentración de 1 millón por pocillo, en placa de 6 pocillos sometidos a ayuno durante 2 horas y 30 minutos.

Protocolo de administración de drogas inhibitoras, agonistas, IGF-I y glutamato:

1. Las drogas inhibitoras se añaden 45 minutos antes del ensayo.
2. El glutamato $100\mu\text{M}$ y el IGF-I 10^{-9}M son añadidos al mismo tiempo y se dejan actuar conjuntamente durante 30 minutos.
3. Se cambian las células a un medio definido (DMEM-F12, selenio, transferrina-putrescina, glutamina, ácido araquidónico y KCl).
4. Las células son mantenidas en este medio a 37°C y con CO_2 al 2% durante 16 horas.

El método de contaje utilizado es el ioduro de propidio, este colorante se une al DNA fragmentado en los núcleos de las células muertas, haciéndolas fácilmente distinguibles con ayuda de un microscopio de fluorescencia, la preparación de las células tras el ensayo de excitotoxicidad se lleva a cabo siguiendo los siguientes pasos:

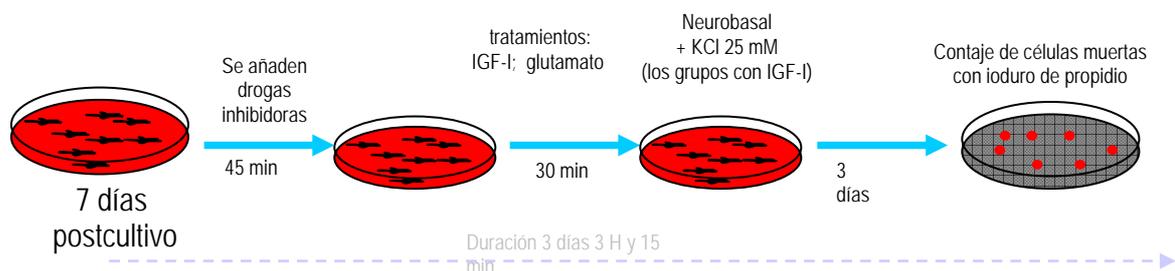
1. Las células son incubadas durante 30 minutos en medio EBSS con Ioduro de Propidio.
2. Tras la incubación se lavan las células con medio DMEM-F12 con suero al 10% 2 veces. Se dejan a las células en este medio durante el contaje.

Protocolo seguido para los contajes en microscopio de fluorescencia:

Los contajes fueron realizados en un microscopio invertido de fluorescencia Zeiss con objetivo de 36 aumentos

El protocolo se basa en la contabilización del número de núcleos rojos por campo, (células muertas), elegidos de manera aleatoria. Todos los tratamientos de cada ensayo de excitotoxicidad fueron realizados por triplicado.

2.3 TERCER PROTOCOLO: Para determinación de protección por IGF-I



Para este experimento partimos de cultivos primarios de células granulares de cerebelo cultivados en medio Neurobasal (Gibco BRL) con glutamina, B27 y KCL.

A los 7 días postcultivo se añade glutamato 100 μM durante 30 minutos y se sustituye el medio por nuevo medio Neurobasal suplementado con KCl. El grupo IGF-I recibe el factor trófico desde que se cambia al nuevo medio a una concentración de 10^{-9}M .

A los 3 días del ensayo se cuenta el número de células muertas teñidas con yoduro de propidio siguiendo el mismo protocolo de incubación y contaje que en el protocolo anterior.

3. PREPARACIÓN Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS:

1. Cultivos celulares: si el material de partida son los cultivos primarios el protocolo a seguir tras el experimento es el lisado de las células en tampón de lisis (150 mM de NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 1mM Cl_2Ca , 1mm Cl_2Mg , 10% glicerol, 1% NP-40, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aprotinina, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptina, 400 μM vanadato sódico, 200 mM PMSF), este se realiza en frío y con ayuda de un rascador de células, tras recoger el lisado, se centrifuga a 4°C a 14000 r.p.m durante 10 minutos.
2. Tejido fresco: si el material de partida es tejido fresco; éste debe sufrir homogenización tras ser diseccionada la parte que nos interesa. Partimos del tejido congelado que es resuspendido en tampón de lisis y homogeneizado en frío, y centrifugado a 4°C a 14000 r.p.m durante 15 minutos.

4. INMUNOPRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS:

Tanto lisados celulares como homogeneizados de tejidos, se incuban durante 12 horas a 4°C en agitación con el anticuerpo contra la proteína de interés. Transcurrido este tiempo se realiza una segunda incubación también a 4°C

Con Proteína A-Sefarosa (Amersham-Pharmacia-Biotech). Los inmunoprecipitados se lavan varias veces y se someten a desnaturalización en tampón reductor y SDS-PAGE.

5. ELECTROFORESIS Y WESTERNBLOT:

Partimos de homogeneizados tisulares (hipocampos), lisados celulares o inmunoprecipitados (cultivos de células granulares de cerebelo).

Las muestras son cargadas en geles de acrilamida/bisacrilamida (Bio-Rad) en equipos de electroforesis de proteínas (Bio-Rad). Una vez terminada la electroforesis las proteínas son transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Prolan).

La membrana de nitrocelulosa se bloquea en tampón TTBS (tampón Tween-Tris salino) con leche al 7% para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos. Una vez bloqueada la membrana es incubada con anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C. A la mañana siguiente se lava con TTBS, y se incuba durante 2 horas con el anticuerpo secundario. Transcurrido este tiempo se vuelve a lavar la membrana con TTBS y por último con TBS (Tampón Tris salino). Para su revelado se incuba con la solución quimioluminiscente ECL (Amersham-Pharmacia-Biotech) para la detección de anticuerpos con preoxidas y se expone sobre Hyperfilm (película de autorradiografía, Amersham Pharmacia-Biotech) a tiempo variable.

6. EXPERIMENTOS IN VIVO:

6.1 INYECCIÓN INTRACEREBROVENTRICULAR:

Bajo anestesia con 2, 2, 2 tribromoetanol al 2%, se realiza una incisión en la piel de la línea media de la cabeza en sentido antero-posterior de unos 2 cm,

dejando al descubierto el tejido subcutáneo, el cual se retira con ayuda de un bisturí hasta dejar a la vista el cráneo. Se coloca al animal en un estereotáxico (David Kopf). Con el cráneo limpio y seco se calculan las coordenadas para el ventrículo lateral. Las coordenadas fueron tomadas del atlas Paxinos y Watson (1982): 1.4 mm lateral, 0.8 mm anteroposterior a Bregma, 4 mm dorso-ventral.

A través del orificio realizado con ayuda de un trepanador se realiza una inyección con una jeringuilla Halmilton, el volumen inyectado en el ventrículo lateral en todos los casos fue de 5µL, inyectando 1µL cada 10 segundos.

Drogas y tratamientos realizados:

Drogas inhibitorias inyectadas 45 minutos antes de los distintos tratamientos por el mismo orificio.

- Bisindolylmeleimida 10µM.
- H89 10 µM.
- Ro 32-4032 100µM.

Tratamientos realizados:

1. Grupo control: inyección de suero salino.
2. Grupo IGF-I: inyección de IGF-I 10^{-4} M.
3. Grupo IGF-I+Glutamato: IGF-I 10^{-4} M + glutamato 10mM + PDC 15 mM (L-trans-Pyrrolidine-2,4-dicarboxylic acid).

Tras la aplicación de los distintos tratamientos se retira la aguja y después de una hora (el tiempo óptimo para el sacrificio de los animales fue calculado realizando inyecciones a distintos tiempos y comprobando que a 1 hora el grado de fosforilación de la molécula Akt era máximo) los animales son sacrificados por decapitación. Se extrae el hipocampo ipsilateral a la inyección en fresco sobre una superficie fría y se congela a -80°C para su posterior procesamiento.

Procesamiento y preparación de las muestras:

Se homogenizan las muestras en frío en tampón de lisis.

La cantidad de proteína de cada muestra fue estimada por un micro-ensayo de Bradford, y se prepara la muestra para westernblot y para inmunoprecipitación.

6.2 IMPLANTACIÓN DE BOMBAS OSMÓTICAS PARA LA ADMINISTRACIÓN CEREBROVENTRICULAR:

Se implantó un sistema de infusión cerebral, consistente en una cánula de 0.36 mm, unida a una mini-bomba osmótica (modelo 1007D, Alzet). La bomba se dispone subcutáneamente en la región dorsal escapular de la rata y la cánula se fija al cráneo con cemento dental.

Mini-bombas con una capacidad de 95 μ L llenas con el inhibidor de PKC Ro 32-4032 (Calbiochem) disuelto en solución salina y otras solo con solución salina; fueron implantadas en el ventrículo lateral de machos de rata Wistar de 250 g de peso, con las mismas coordenadas e igual protocolo que la administración aguda cerebroventricular: 1.4 mm lateral, 0.8 mm anteroposterior a Bregma.4 mm dorso-ventral.

6.2.1 ISQUEMIA POR OCLUSIÓN DE LA ARTERIA CEREBRAL MEDIA:

El modelo de isquemia cerebral utilizado experimentalmente está basado en la técnica de desarrollada simultáneamente por Longa et al. Y Nagasawa et al. en 1989, que consiste en introducir por vía cervical a través de la arteria carótida interna un nylon recubierto de polilisina (Belayeb, 1996) monofilamento que alcanza el origen de la arteria cerebral media, más tarde, pasada una hora el nylon se retira del lecho arterial lo que permite la reperfusión vascular. Este tipo de isquemia por oclusión de la arteria cerebral

media provoca necrosis en el caudado putamen, corteza frontoparietal posterior y parte anterior del hipocampo, así como daños neurológicos visibles.

Los animales de experimentación fueron sometidos a la implantación de cánulas cerebroventriculares tres días antes de realizar la isquemia.

Durante los 90 minutos que dura la oclusión se le implanta al animal una bomba de infusión (previamente a los animales les han sido implantadas las cánulas cerebroventriculares). Una vez transcurrido el tiempo de isquemia se tira del nylon dejando solo en el interior del vaso la cabeza del mismo, a partir de este momento se produce el reestablecimiento del flujo sanguíneo en la zona.

En los controles se sutura la carótida externa y se clampea la común durante tres minutos.

6.2.2 Sacrificio y procesamiento de las muestras:

A los siete días de haber realizado la isquemia los animales se sacrifican y fijan mediante perfusión con paraformaldehído al 4%. Una vez extraídos los cerebros, se cortan en sentido coronal en el vibratomo con un grosor de 50 micras.

6.2.3 Cálculo del volumen del infarto isquémico:

Para calcular el volumen de daño isquémico utilizamos la tinción con Hematoxilina-eosina de los cortes. Una vez teñidos se van tomando los cortes coronales antero-posteriores con un intervalo de 1.5 mm. De esta manera se obtienen alrededor de 8 cortes por cerebro. Una vez teñidos y montados, calculamos el área de infarto en cada corte con ayuda del programa de ordenador ICE. Con estas áreas relativas calculamos el volumen (mm^3):

$$V = \sum \text{áreas cortes} \times \text{distancia entre cortes}$$

7. DENSITOMETRÍA:

La cuantificación densitométrica de las bandas de proteína se realizó con la ayuda de un scanner Cannon 600 y gracias al programa de cuantificación de proteínas 1D-Manager de la empresa TDI (España).

Todos los blots fueron corregidos con un control de carga, la proteína inmunoprecipitada en el caso de las inmunoprecipitaciones y con una proteína de referencia (teóricamente no modulada) en el caso de los lisados tisulares y celulares.

Una vez corregidos, los datos se relativizaron a tanto por ciento para su posterior análisis estadístico.

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Los resultados de los experimentos fueron analizados mediante un análisis de la varianza de un factor (ANOVA), para realizar las comparaciones estadísticas múltiples.

Las diferencias significativas entre los grupos fueron determinadas mediante el análisis Tukey Post-hoc y prueba t.

OBJETIVOS:

- 1. Determinar si el IGF-I es capaz de antagonizar los efectos neurotóxicos del glutamato.**
- 2. Determinar si existen puntos de convergencia entre la señalización del IGF-I y del glutamato.**
- 3. Determinar su posible significado patológico.**

1. Efectos antagónicos del glutamato e IGF-I sobre la supervivencia neuronal:

En la primera fase del estudio utilizamos como modelo cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo de ratas neonatales para investigar la interacción entre los efectos neurotóxicos del glutamato y la protección por IGF-I. El efecto del glutamato sobre los cultivos de neuronas granulares de cerebelo ya había sido descrito por otros autores con anterioridad (Bessho et al., 1994), así como su efecto neurotóxico a altas concentraciones (Beal., 1992).

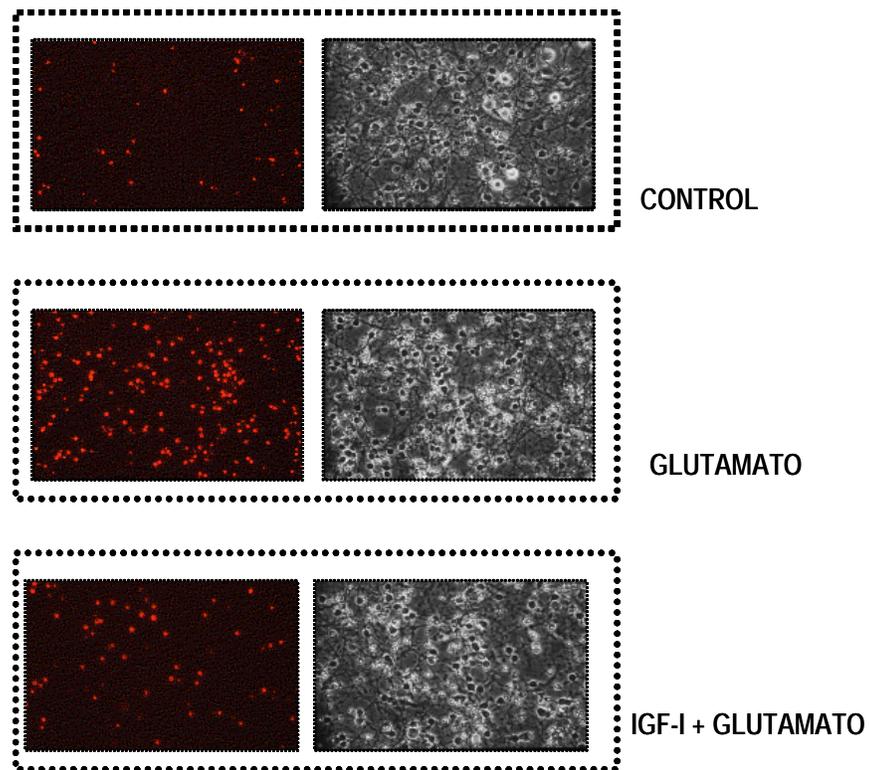


Figura 1. Cultivos tras 7 días *in vitro*: excitotoxicidad del glutamato en cultivos de neuronas granulares de cerebelo. Columna de la izquierda, células muertas (ioduro de propidio). Columna de la derecha fotos en contraste de fase de neuronas granulares en cultivo. **A:** control. **B:** glutamato: 30 minutos de incubación con 500 μ M de glutamato. **C:** IGF-I+glutamato: 30 minutos de tratamiento con 100nM de IGF-I + glutamato 500 μ M. Los experimentos fueron realizados por duplicado, n = 10 experimentos.

2. El IGF-I no es capaz de reducir la toxicidad del glutamato:

El glutamato interfiere con la supervivencia que ejerce el IGF-I sobre estas y otras neuronas (D'Ercole et al., 1996). Las neuronas granulares expuestas a dosis excitotóxicas de glutamato (100 μ M y 500 μ M, Figuras 1 y 2, presentan una tasa de supervivencia inferior a las neuronas que no reciben este agente neurotóxico; si estas neuronas reciben al mismo tiempo que el glutamato IGF-I (10^{-9} M), éste no es capaz de revertir la muerte excitotóxica por glutamato.

Como el glutamato induce una muerte neuronal aguda y otra más tardía, analizamos si el IGF-I interfiere con alguna de éstas fases. Como muestra la figura 2, tras tres días de estímulo excitotóxico, el IGF-I no es capaz de bloquear el efecto del glutamato. Igualmente (figura 3) los efectos agudos del glutamato tampoco son sustancialmente inhibidos por el IGF-I.

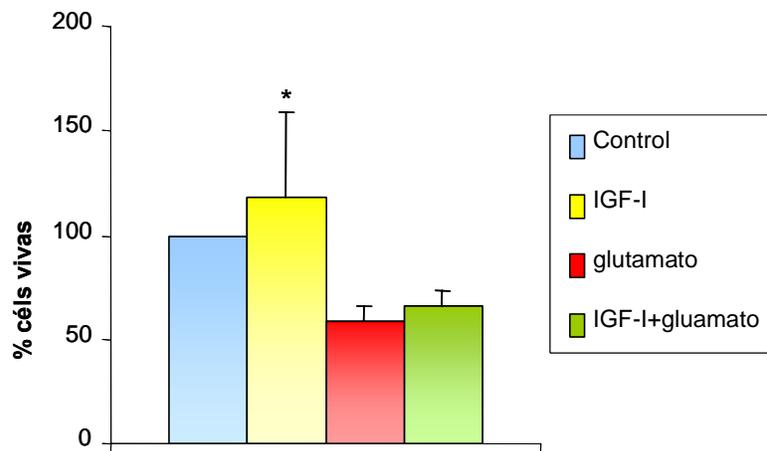


Figura 2: Cultivos de neuronas granulares de cerebelo sometidos a tratamientos con glutamato (500 μ M) e IGF-I (100nM) de 30 minutos y mantenidos con vida hasta los tres días posteriores a la exposición. El histograma muestra el resultado de los conteos con yoduro de propidio. ($p < 0.005$).

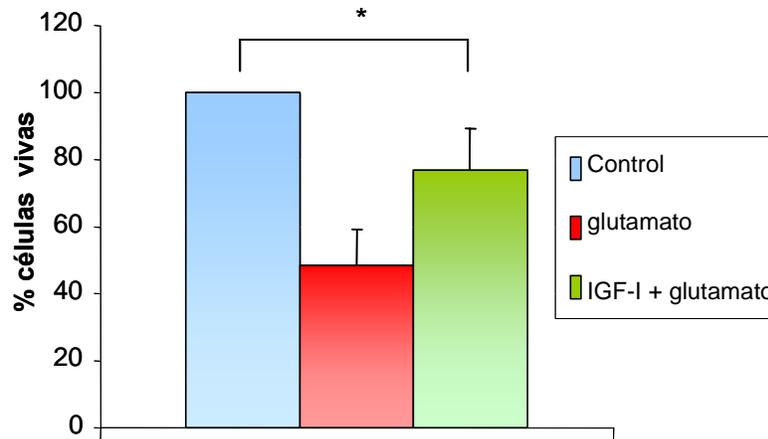


Figura 3: Cultivos de neuronas granulares de cerebelo sometidos a tratamientos con glutamato (500 μ M) e IGF-I (100nM) de 30 minutos y mantenidos 18h ($p < 0.005$).

3. REGULACIÓN OPUESTA DE LA FOSFORILACIÓN DE Akt POR EL GLUTAMATO Y EL IGF-I:

Como el IGF-I no es capaz de inhibir el efecto tóxico del glutamato analizamos las posibles rutas intracelulares implicadas.

Comenzamos centrándonos en la serina/areonina quinasa Akt ya que el glutamato es capaz de inactivarla en neuronas (Chalecka-Franaszek et al., 1999). Se ha visto que Akt juega un papel crítico en el efecto promotor de supervivencia del IGF-I en neuronas (Dudek et al., 1997). Con estos datos parecía probable que Akt fuera el punto de convergencia entre la señalización por IGF-I y el glutamato.

El efecto opuesto sobre la fosforilación de AKT se pone de manifiesto cuando a neuronas que reciben IGF-I y por tanto, aumentan el grado de fosforilación de AKT, reciben al mismo tiempo una dosis excitotóxica de glutamato (500 μ), que

RESULTADOS

disminuye esta fosforilación. Como se muestra en la figura 4, el grado de fosforilación de AKT en se ve drásticamente disminuido si se añade glutamato al medio de cultivo.

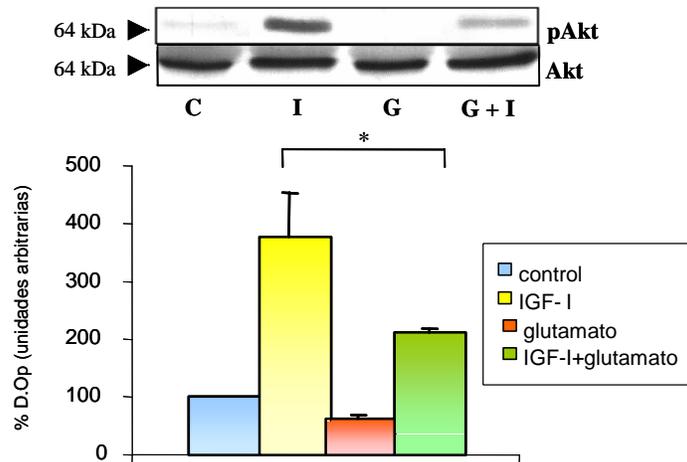


Figura 4: El glutamato antagoniza la acción del IGF-I: el IGF-I (100nM) estimula la fosforilación de Akt (pAkt el gel superior) en cultivos de neuronas granulares de cerebelo, este efecto es antagonizado por el glutamato (500 μ M). El Akt total (gel inferior) no se modifica durante los distintos tratamientos. En el histograma inferior se muestra el análisis cuantitativo de las desotometrías de los western blots. Los resultados revelan que los niveles de pAkt tras normalizar con el Akt total son significativamente distintos ($p < 0.005$) entre el grupo del IGF-I y el grupo IGF-I+glutamato (n=6).

La fosforilación de Akt vía IRS/PI3 quinasa está muy bien descrita (Dudek et al., 1997). Sin embargo, la manera en que se produce la defosforilación de Akt por glutamato es totalmente desconocida, aunque se ha propuesto que pueda ser a través de una fosfatasa todavía sin identificar (Chalecka-Franaszek et al., 1999). Esta interacción entre el IGF-I y el glutamato puede implicar tanto rutas de señalización comunes, como independientes.

RESULTADOS

Para determinar si las 2 rutas de señalización mejor caracterizadas de GF-I interaccionaban con el efecto del glutamato utilizamos drogas inhibidoras de PI3 quinasa: Wortmannin y LY294002, y vimos que producían un efecto de pérdida de fosforilación de Akt (figura 5).

Por último, el inhibidor de MAP quinasa PD98059 no tenía efecto. Estos resultados pueden indicar que la ruta de la PI 3 quinasa converge sobre la activada por glutamato.

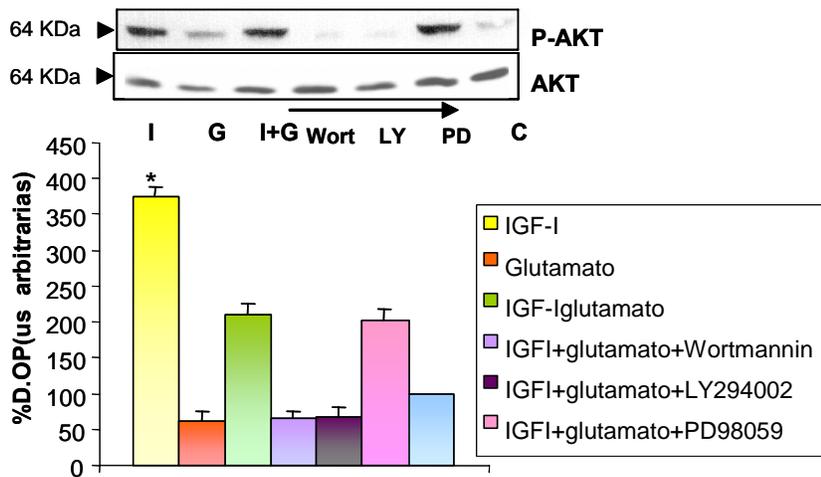
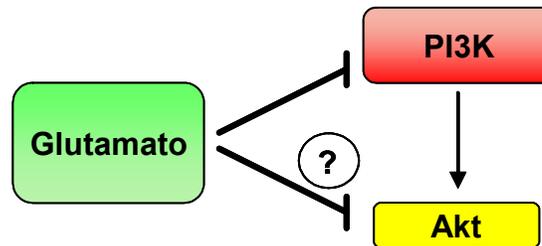


Figura 5: Cultivos con inhibidores de la PI3 quinasa: wortmannin 20 μ M y LY294002 25 μ M; la fosforilación de Akt en los grupos que reciben IGF-I (100nM) y glutamato (500 μ M) se reduce de manera significativa en comparación con el grupo que solo recibe IGF-I (100nM). El grupo que recibe el inhibidor de la MAP quinasa PD98059 20 μ M sigue manteniendo un valor de pAkt similar al grupo IGF-I+glutamato. (n=7).

La vía de la PI3 quinasa puede estar implicada en la acción del glutamato sobre Akt tras IGF-I (esquema 1):



4. RUTA POR LA QUE EL GLUTAMATO EJERCE SU EFECTO ANTAGONISTA SOBRE LA SEÑALIZACIÓN DEL IGF-I:

Según algunos autores, el glutamato puede defosforilar Akt de diferentes maneras. Por eso, nuestro siguiente paso fue utilizar inhibidores de distintas fosfatasa/quinasas que podían estar activadas por glutamato. El ácido okadaico (inhibidor de PP2B y PP1) que es capaz de inhibir la defosforilación inducida por glutamato tras activación de AKT-1 por litio (Chalecka-Franaszek et al., 1999); la tautomicina inhibidor de PP2B; la ciclosporina inhibidor de la calcineurina; U733122 inhibidor de la PLC γ ; K252^a inhibidor de la Cam quinasa; Kn92 inhibidor de la Cam quinasa II; PP2 inhibidor de la familia de las src quinasas o el quelante de calcio BAPTA (figura 6).

RESULTADOS

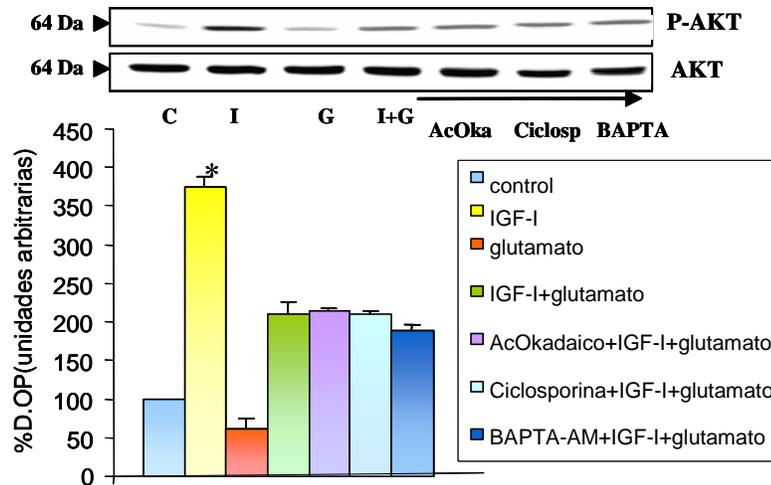


Figura 6: la inhibición de las fosforilación de Akt por glutamato es independiente de calcio, de las fosfatasa PP2B y PP1, y de calcineurina. La interacción entre el glutamato y la vía de supervivencia del IGF-I no depende de calcio, ya que al añadir el quelante de calcio BAPTA-AM (200 μ M) junto a IGF-I y glutamato el nivel de fosforilación de Akt es igual al de grupo IGF-I+glutamato y significativamente distinto al grupo IGF-I ($p < 0.005$). Lo mismo ocurre con la ciclosporina A (2 μ M) inhibidor de la calcineurina y con los inhibidores ácido okadaico (50nM) inhibidor de las fosfatasa PP1 y PP2B y ciclosporina (10 μ M) inhibidor específico de calcineurina. Todos los grupos recibieron IGF-I (100nM)+glutamato (500 μ M) y todos son significativamente diferentes al grupo IGF-I(100nM). (n=6).

Estudiamos además el efecto del glutamato sobre la fosforilación de la quinasa Jun (JNK) ya que existían estudios previos en los que se había descrito como la excitotoxicidad inducida por glutamato implicaba la activación de Jun quinasa (Schawarzschild et al., 1997). Determinamos los niveles de fosfo-Jun quinasa activada tras glutamato. Con otros tipos de agresiones en células cerebelares (Gunn-Moore et al., 1998), no había cambios en la fosforilación de Jun quinasa tras tratar a nuestros cultivos con glutamato (figura 7).

RESULTADOS

Por tanto, comenzamos a considerar la posibilidad de que el glutamato pudiera desactivar la fosforilación de Akt inducida por IGF-I interfiriendo de manera directa sobre alguna molécula o moléculas situadas por encima de Akt en la ruta de señalización de IGF-I.

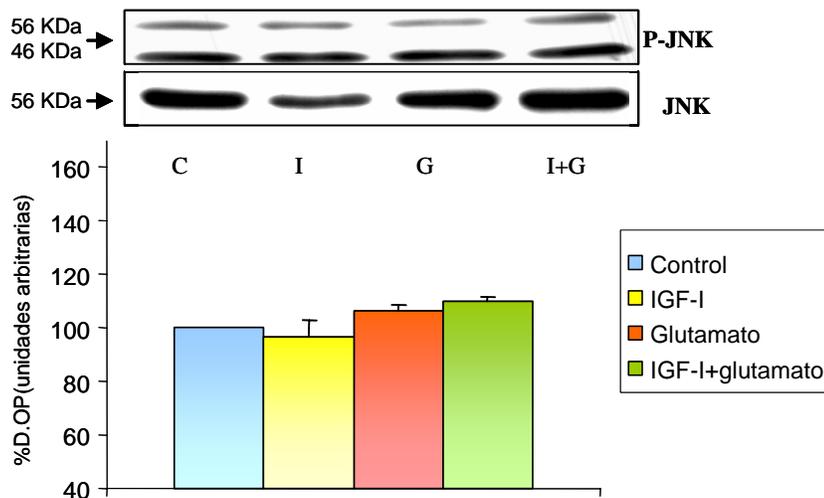


Figura 7: JUNK no se activa por glutamato en células granulares en cultivo: al añadir glutamato ($500\mu\text{M}$) a cultivos de neuronas granulares de cerebelo en cultivo no se produce activación de JUNK, esta quinasa no se modula si se añade al mismo tiempo IGF-I (100nM). ($n=5$).

5. INTERACCIÓN ENTRE EL GLUTAMATO Y EL IGF-I SOBRE LA RUTA DE LA PI3 QUINASA:

Lo primero que analizamos fue si el glutamato era capaz de modular la fosforilación del receptor de IGF-I tras la estimulación por IGF-I (figura 8). Comprobamos que esta fosforilación no se veía modulada por la presencia de glutamato, ya que tanto en presencia como en ausencia de glutamato el IGF-I seguía produciendo la misma autofosforilación en tirosina de su receptor.

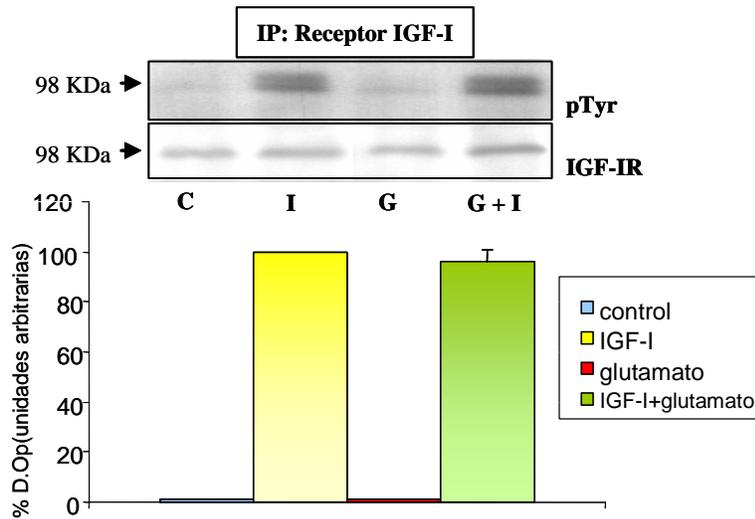


Figura 8: la fosforilación del receptor de IGF-I no se ve afectada por el glutamato. En el panel superior, un blot representativo con anti fosfo-tirosina de un inmunoprecipitado del receptor de IGF-I. La cantidad de receptor de IGF-I es muy similar en todos los tratamientos (gel inferior). En el panel inferior: el análisis densitométrico (n=5) de los distintos grupos de tratamiento demuestra que no existe diferencia entre el grupo que recibe IGF-I (100nM) y el grupo IGF-I(100nM) + glutamato (500μ M).

El $TNF\alpha$ es capaz de interrumpir la señalización del IGF-I actuando sobre la activación del IRS, provocando su fosforilación en serina/treonina (Kanety et al., 1997); ¿Podía el glutamato ejercer sobre la señalización del IGF-I un efecto parecido al inducido por $TNF\alpha$? Tras la activación del receptor de IGF-I, el siguiente paso es la activación de IRS mediante la fosforilación en residuos de tirosina, esta fosforilación es fundamental para que IRS se pueda asociar a la PI3 quinasa.

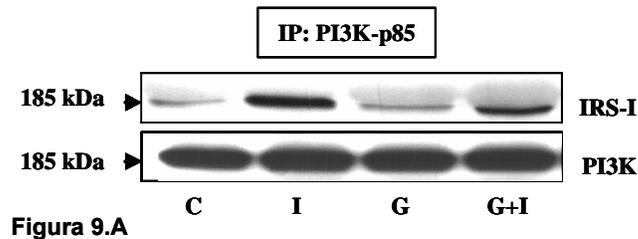


Figura 9.A

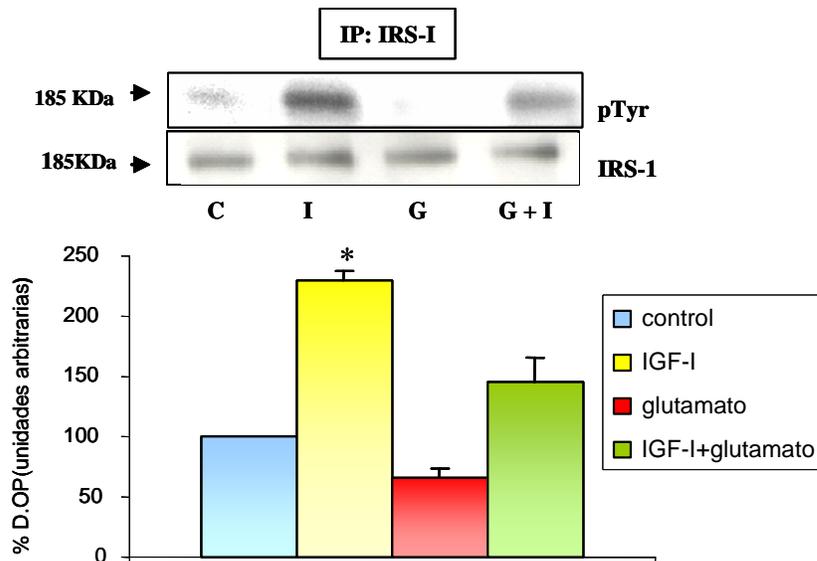


Figura 9.B

Figura 9: el glutamato interfiere con la ruta de supervivencia del IGF-I a través de la inhibición de la fosforilación en tirosina del IRS-1. El IGF-I produce un aumento en la fosforilación en tirosina del IRS-1 que es antagonizada por el glutamato. En la **figura 9.A** vemos como tras la inmunoprecipitación con la subunidad p85 de la PI3 quinasa los niveles de IRS-1 asociado a esta molécula disminuyen si además de IGF-I (100nM) añadimos glutamato (500 μ M) carril de la derecha. En la **figura 9.B** Podemos comprobar que la cantidad de IRS-1 fosforilado en tirosina disminuye de manera significativa ($p < 0.005$) en el grupo IGF-I (100nM)+glutamato (500 μ M), si lo comparamos con el grupo que solo recibe IGF-I (100nM) ($n=5$). Como se comprueba en el gel inferior, la cantidad de IRS-1 no se modifica con los distintos tratamientos.

Como se muestra en las figuras 9.A y 9.B, el glutamato interacciona a nivel del IRS-1 aboliendo de manera significativa ($p < 0.005$) su fosforilación en tirosina tanto si inmunoprecipitamos lisados celulares con IRS-1 y vemos su nivel de fosforilación en tirosina con anticuerpos anti-tirosina (figura 9.B), como si lo medimos de

RESULTADOS

manera indirecta analizando la interacción entre el IRS-I y la subunidad catalítica de la PI3 quinasa inmunoprecipitando p85 y revelando con anticuerpos anti-IRS (figura 9.A).

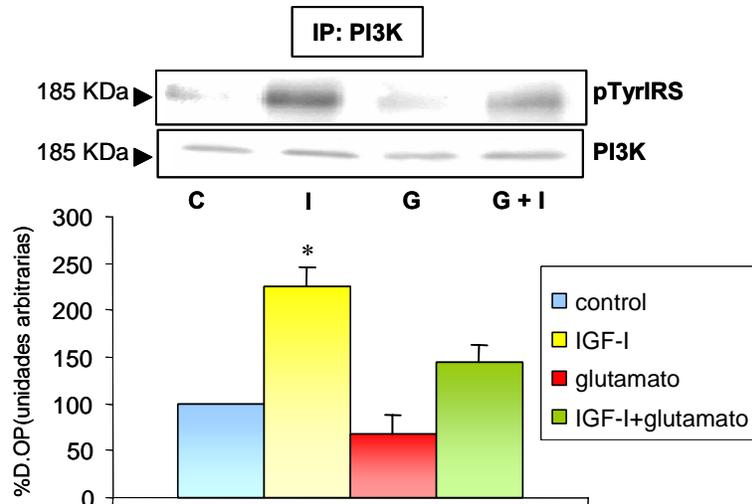


Figura 10: los niveles de IRS-1 fosforilado en tirosina asociado a la PI3 quinasa disminuyen tras añadir glutamato. El grado de asociación entre IRS-1 activado (fosforilado en tirosina) y la subunidad de la PI3 quinasa p85 disminuye de manera significativa ($p < 0.005$) en el grupo que recibe IGF-I+glutamato al compararlo con el grupo que solo ha recibido IGF-I ($n=6$); los niveles de p85 total no varían. (gel inferior).

El siguiente paso es el acoplamiento de IRS-1 fosforilado en tirosina a la subunidad p85 de la PI3 quinasa p85. Este paso es fundamental para la activación de la PI3 quinasa (Pons et al., 1995), como se puede comprobar en la figura 10 en presencia de glutamato esta interacción está inhibida de manera significativa ($p < 0.005$). En este punto comenzamos a hablar de inhibición del glutamato a nivel de IRS-I, pero no de IRS-2, por que los niveles de esta molécula en nuestros cultivos es muy baja y aunque no se muestra no presentan modulación en su fosforilación por parte del glutamato.

6. EL GLUTAMATO INHIBE LA SEÑALIZACIÓN DEL IGF-I A TRAVÉS DE LA ACTIVACIÓN DE LA PROTEÍNA QUINASA A Y LA PROTEÍNA QUINASA C:

La fosforilación de IRS-1 en residuos de serina impide que éste se pueda asociar al receptor de IGF-I activado y se induce de esta manera resistencia celular al IGF-I (Rui et al., 2001). La señalización del glutamato a través de sus receptores ionotrópicos y metabotrópicos de membrana implica multitud de vías de transducción en las que se incluyen la activación de diferentes serina quinasas (Skaper et al., 2001).

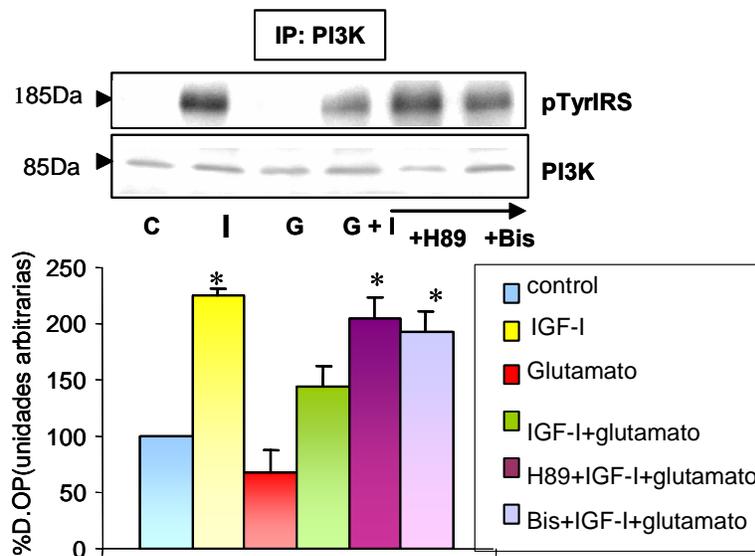


Figura 11: el glutamato inhibe la señalización del IGF-I a través de una PKA y una PKC la inhibición de PKA o de PKC impide al glutamato ejercer sus efectos sobre la asociación inducida por IGF-I de asociación entre el IRS-1 fosforilado en tirosina y la PI3 quinasa. Gel superior: blot representativo de inmunoprecipitación de PI3quinasa que muestra como la inhibición de PKA con H89 o la inhibición de PKC con bisindolylmaleimide (Bis) impide al glutamato ejercer sus efectos inhibidores sobre la asociación entre PI3 quinasa e IRS fosforilado en tirosina tras IGF-I ($p < 0.005$ vs glutamato+IGF-I para ambas drogas $n=5$). Los niveles de PI3 quinasa no se ven afectados por los distintos tratamientos (gel inferior).

RESULTADOS

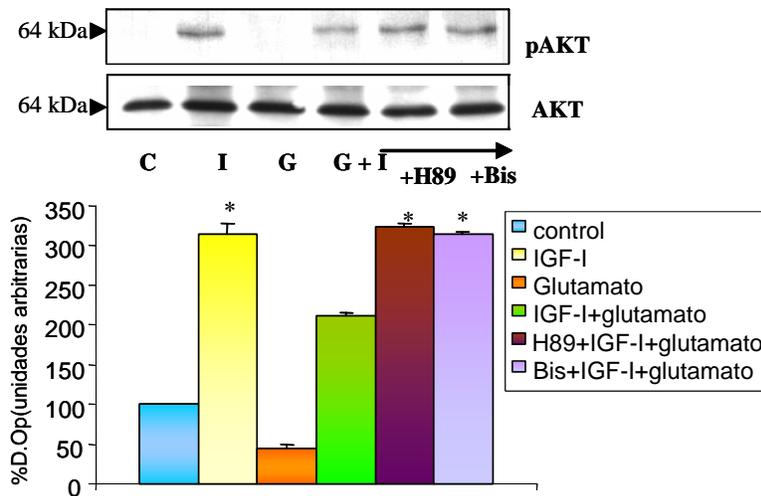


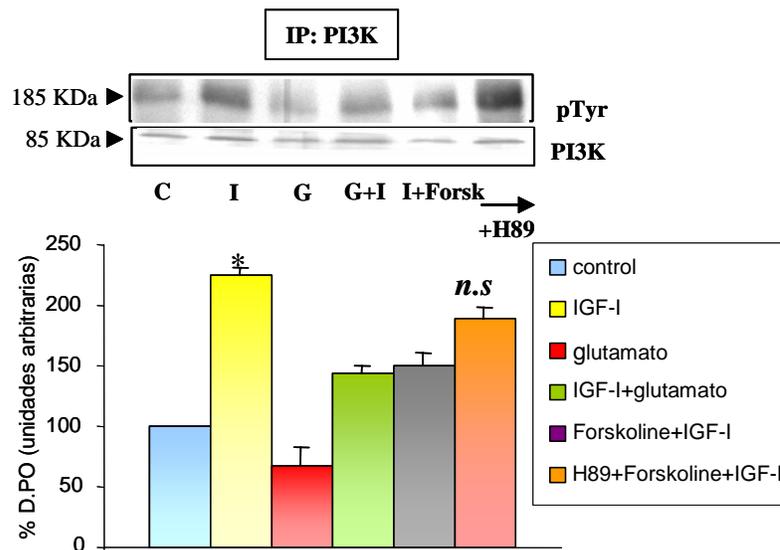
Figura 12: el glutamato inhibe la señalización del IGF-I a través de una PKA y una PKC. H89 y bisindolylmaleimide abolen el efecto del glutamato en la activación de Akt inducida por IGF-I. Gel superior: blot representativo de fosfoAkt mostrando que con el H89 o la bisindolylmaleimide se inactiva el efecto inhibitor del glutamato sobre la fosforilación de Akt tras la aplicación de IGF-I ($p < 0.005$; $n = 5$). Los niveles de Akt total no se ven afectados por los distintos tratamientos (gel inferior).

Para determinar que tipo de serina quinasa estaba implicada en la disociación de IRS-1 del receptor de IGF-I por glutamato utilizamos distintos tipos de inhibidores. De todos los inhibidores utilizados comprobamos que solo el inhibidor de PKA, el H89, y el inhibidor de PKC, la bisindolylmaleimida, eran capaces de bloquear la inhibición inducida por glutamato de la asociación entre el IRS y la PI3 quinasa (figura 11). El glutamato provoca una bajada significativa en la asociación inducida por IGF-I de pTyrIRS-1 y la subunidad p85: desde un aumento de más del doble de asociación en el grupo IGF-I con respecto al control hasta un incremento menor al 50% en el grupo de glutamato + IGF-I ($p < 0.005$). Al añadir H89 o bisindolylmaleimide se suprime por completo el efecto inhibitor que ejerce el glutamato sobre esta asociación.

Como era de esperar, los efectos de los inhibidores de PKA y PKC sobre la fosforilación de Akt son muy parecidos a los obtenidos sobre la asociación de PI3

RESULTADOS

quinasa e IRS-I (figura 12). La fosforilación de Akt inducida por IGF-I, se ve reducida significativamente por el glutamato, pero tras la exposición conjunta de glutamato e IGF-I con H89 o bisindolylmaleimide los niveles de fosforilación se restauran llegando a los mismos niveles que el grupo que solo recibió IGF-I. Si añadimos las dos drogas juntas, el efecto de inhibición sobre la acción del glutamato es el mismo, sugiriendo que estas serina proetina quinasas son estimuladas de manera secuencial por el glutamato (ver más adelante).



Figuras 13:: la activación de PKA o PKC imita el efecto del glutamato sobre la vía de supervivencia del IGF-I. Figura 13: La activación de PKA con forskolin imita el efecto negativo del glutamato en la señalización del IGF-I. El gel superior muestra como la estimulación de PKA con forskolin inhibe la estimulación inducida por IGF-I de la asociación entre fosfo-IRS-1 y PI3 quinasa ($p < 0.005$ vs IGF-I solo), mientras que H89 inhibe el efecto de la forskolin ($p < 0.005$ vs IGF-I+forskolin). La cantidad total de PI3 quinasa total no se ve afectada por los distintos tratamientos (gel inferior).

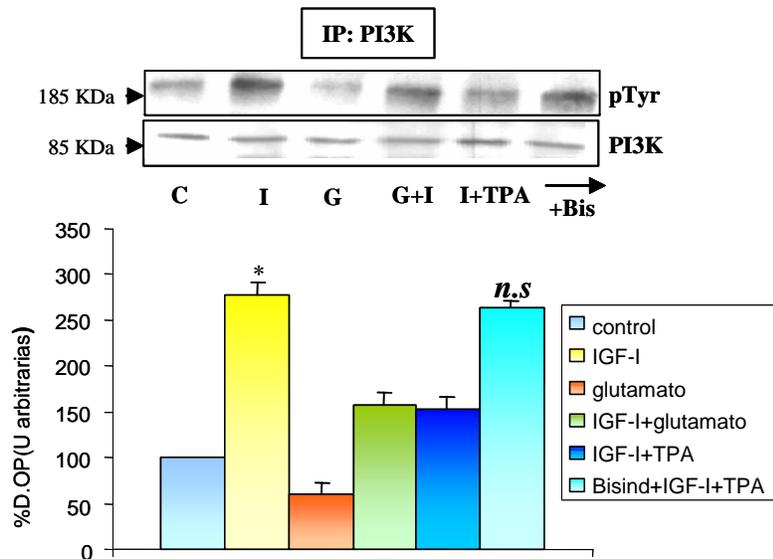
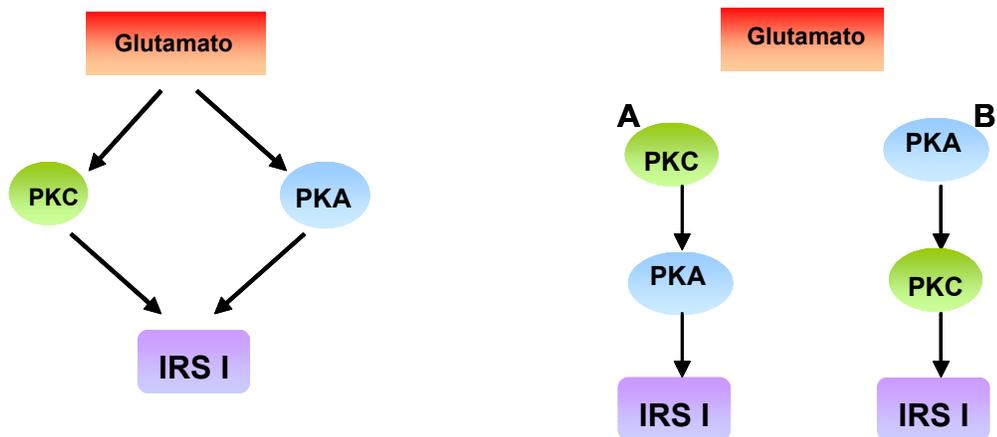


Figura 14: Gel representativo de fosfo-tirosina inmunoprecipitado con PI3 quinasa que ilustra como la estimulación de PKC con TPA inhibe el incremento en los niveles de IRS-1 fosforilado en tirosina asociado a la PI3 quinasa ($p < 0.005$ vs IGF-I solo) y como el inhibidor de la PKC bisindolylmaleimide es capaz de contrarrestar este efecto de TPA ($p < 0.005$ vs IGF-I+bisindolylmaleimide, $n=4$). Los niveles totales de PI3 quinasa no se ven afectados por los diferentes tratamientos (gel inferior).

Para confirmar que la estimulación de PKC y/o PKA estaban implicadas en los efectos del glutamato en la señalización del IGF-I, añadimos a los cultivos TPA (100nM), un agonista de PKCs de amplio espectro o Forskolin (10 μ M), un potente estimulador de PKA, al mismo tiempo que el IGF-I. Como se puede comprobar en las figuras 13 y 14, ambas drogas son capaces de imitar el efecto del glutamato inhibiendo la asociación del IRS-1 con la PI3 quinasa ($p < 0.005$ vs IGF-I solo). De cualquier forma, la bisindolylmaleimide es capaz de inactivar por completo la estimulación de PKC inducida por TPA (carril de la derecha de la figura 14), dejando al grupo que recibe esta droga al mismo nivel de estimulación que el grupo que solo ha recibido IGF-I. El mismo efecto sobre la estimulación de PKA inducido por forskolin, ejerce el inhibidor H89 (banda de la derecha de la figura 13)

RESULTADOS

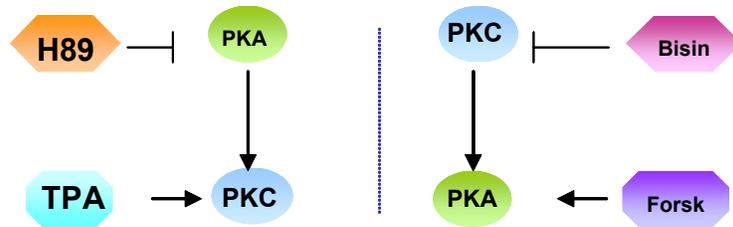
devolviendo al grupo que recibe esta droga a los niveles de estimulación, (fosforilación en tirosina) de IRS-1 que el grupo que solo había recibido IGF-I. Debido a que si añadíamos al mismo tiempo los dos inhibidores en el mismo grupo de experimentación no encontrábamos un aumento en la inhibición de la acción del glutamato dedujimos que ambas quinasas debían de estar convergiendo en la misma ruta de señalización. En este punto debíamos comprobar si la estimulación de estas dos quinasas era simultánea tras la estimulación por glutamato, o por el contrario era una activación secuencial que implicaba en un primer paso la activación de una de ellas, y si la respuesta correcta era esta segunda hipótesis cual de ellas estaba primero y cual era la que fosforilaba en serina al IRS-1 y lo descoplaba de la ruta de supervivencia del IGF-I.



Esquema 2: las figuras muestran las posibilidades de interacción del glutamato a través de las quinasas PKC y PKA. El esquema de la izquierda muestra la posibilidad de que la activación de las quinasas inactiven a IRS I fosforilándolo en dos puntos distintos, pero como la acción de los agonistas de las dos quinasas juntos no son sinérgicos, esta posibilidad está descartada. El esquema de la derecha muestra las dos posibles situaciones de las quinasas en la activación secuencial de cada una de ellas.

RESULTADOS

Para ver el orden de estimulación secuencial combinamos inhibidores y estimuladores de PKC y PKA y examinamos como afectaban a la activación por parte del IGF-I de IRS/PI3 quinasa.



Esquema 2: Esquema del experimento con las distintas combinaciones de estimuladores e inhibidores. El esquema de la izquierda muestra la combinación del inhibidor de PKC H89 con TPA. El esquema de la derecha muestra la combinación del inhibidor de PKA bisindolimaliymine y el agonista de PKC forskolin.

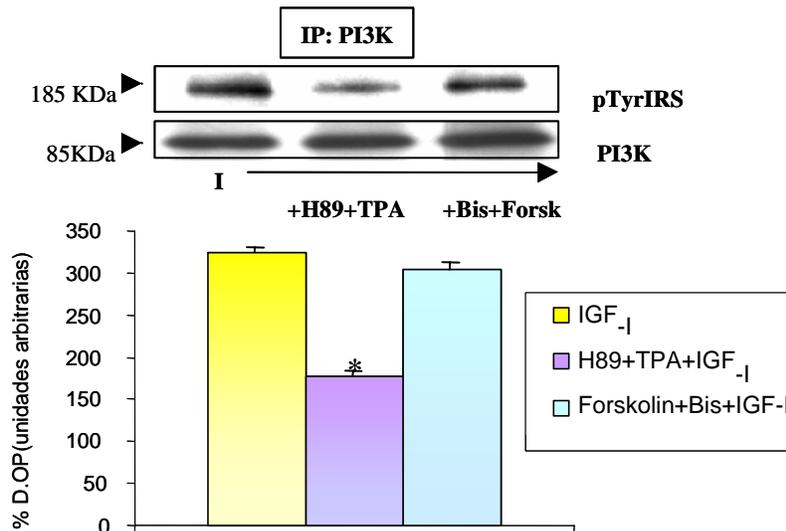


Figura 15: la activación de PKA y PKC es secuencial: la activación de PKC en presencia de PKA inhibida imita los efectos inhibitorios del glutamato sobre la activación de PKC/PI3 quinasa, mientras que la activación de PKA en presencia de PKC inhibida no lo imita. En el panel superior se muestra un gel de inmunoprecipitación de PI3 quinasa que muestra que la acción combinada de TPA+H89 reduce los niveles de asociación de IRS fosforilada en tirosina con PI3 quinasa tras tratamiento con IGF-I, mientras que bisindolylmaleimide+forskolin no afectan a la respuesta frente a estimulación por IGF-I. En la gráfica se puede comprobar que esta reducción en la asociación inducida por TPA+H89+IGF-I es estadísticamente significativa $p < 0.005$, $n = 5$.

Cuando la PKC está inhibida por bisindolymaleimide mientras que la PKA es estimulada con forskolin, la estimulación de fosfotirosina-IRS en asociación a PI3 quinasa debida a IGF-I no se ve afectada (ver gel de figura 15 banda de la derecha). Mientras que si, PKA es inhibido por H89, y al tiempo se añade al medio que contiene IGF-I el activador de PKC TPA, se inhibe por completo la fosforilación en tirosina del IRS-1 y su consiguiente asociación a la subunidad p85 de la PI3 quinasa tras la estimulación con IGF-I (ver banda del centro en blot de figura N 15, $p < 0.005$, siendo $n=5$). De esta manera se demuestra que PKA necesita la actividad de la PKC intacta para bloquear la señalización del IGF-I, mientras que la activación de la PKC imita el efecto del glutamato incluso en ausencia de la activación de PKA. En resumen la estimulación de PKA precede a la de PKC (en la inhibición inducida por glutamato sobre la fosforilación en tirosina del IRS-1 tras la estimulación de IGF-I).



Esquema 3. Representación de la activación secuencial de las quinasas PKA y PKC tras la estimulación con glutamato, PKC fosforila en serina a IRS-I desacoplándolo de la ruta de supervivencia inducida por IGF-I.

7. LA FOSFORILACIÓN DEL IRS-1 INDUCIDA POR EL GLUTAMATO ES PRODUCIDA POR PKC ϵ :

Para determinar que isoforma de PKC estaba implicada en la acción inhibitoria del glutamato sobre la activación del IRS-1 utilizamos inhibidores específicos de PKC. En experimentos anteriores (figura 6) habíamos comprobado que el proceso de inhibición ejercido por el glutamato era independiente de calcio, ya que añadiendo

RESULTADOS

el quelante BAPTA-AM no se inhibía la acción del glutamato; por lo tanto, nuestra investigación se centró en la búsqueda de isoformas de PKCs de las llamadas noveles y las atípicas, ya que estos dos grupos no necesitan calcio para su activación. Descubrimos que Ro 32-0432, a la dosis de 100 nM, que es capaz de inhibir selectivamente PKC epsilon (Birchall.et al., 1994), bloqueaba la acción deleterea del glutamato sobre la señalización del IGF-I. Como se puede comprobar en la figura 16, la dosis de 100nM de Ro 32-0432 que inhibe al subtipo epsilon de la PKC inhibe por completo su acción sobre fosfo-Akt, mientras que a dosis menores que inhiben a los subtipos de PKC clásicas alfa y beta II no inhiben la acción del glutamato.

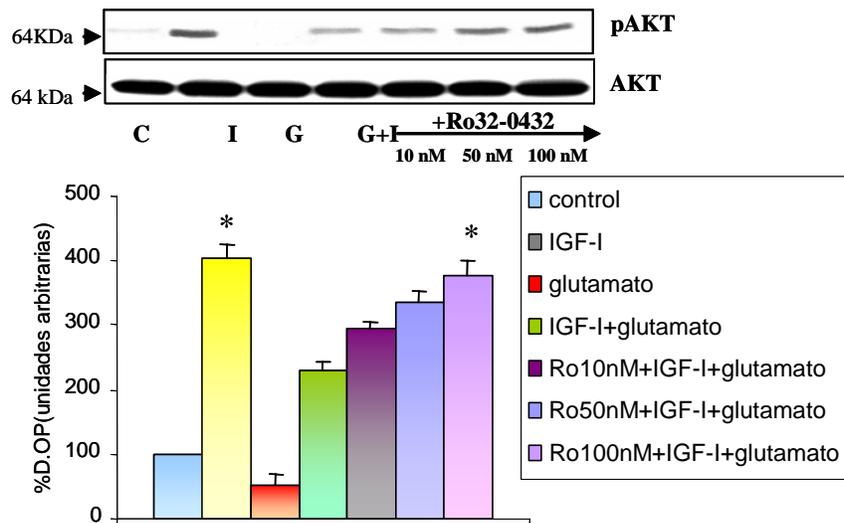
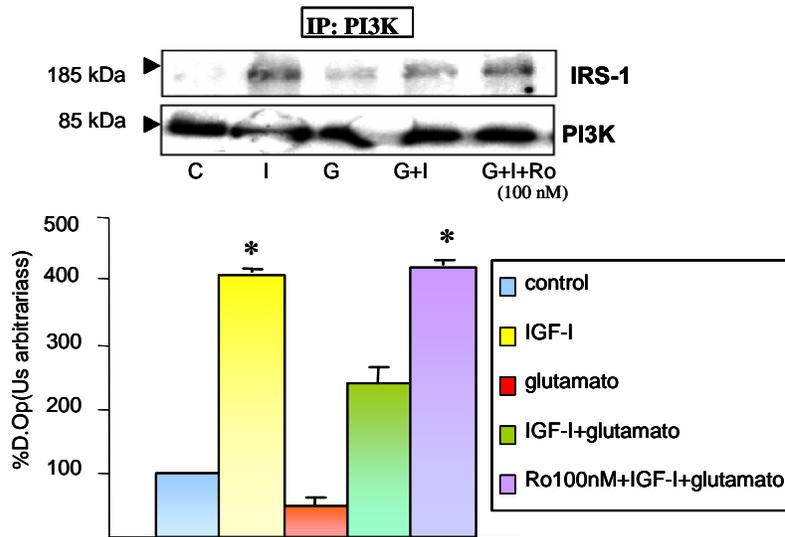


Figura 16: la inhibición de PKC epsilon inactiva el efecto inhibitorio del glutamato sobre la señalización del IGF-I Ro 32-0432 (Ro) inhibe de manera dosis dependiente la defosforilación de Akt por el glutamato ($p < 0.005$). **Figura**

RESULTADOS

En la figura inferior (figura 17) se puede comprobar como la dosis de 100nM de Ro 32-0432 es capaz de abolir por completo la fosforilación de PI3K-IRS-1 inducida por el glutamato, devolviendo al grupo que ha recibido la droga a los mismos niveles de fosforilación en tirosina que el grupo que solo ha recibido IGF-I ($p < 0.005$ y $n = 4$).



Figuras 17: la inhibición de PKC ϵ inactiva el efecto inhibitorio del glutamato sobre la señalización del IGF-I. 17: la administración conjunta de Ro 32-0432 (100nM) bloquea la reducción inducida por glutamato de la asociación entre IRS-1 y PI3 quinasa inducida por IGF-I ($p < 0.005$ vs glutamato+IGF-I, $n = 4$). Panel superior: gel representativo de IRS-1 Inmunoprecipitado con PI3 quinasa; el panel inferior muestra que los niveles de PI3 quinasa inmunoprecipitados no sufren variación con los distintos tratamientos.

RESULTADOS

Tras estos experimentos, estudiamos la activación de la PKC epsilon por glutamato.

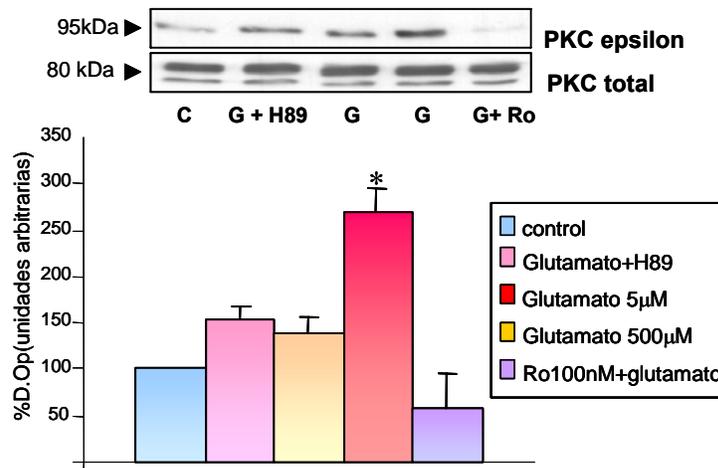


Figura 18: El glutamato aumenta la activación de la PKC épsilon. La fosforilación en serina debida a glutamato es abolida absolutamente por Ro 32-0432 100nM. La activación de PKC épsilon es significativamente distinta en el grupo glutamato 500µM ($p < 0.005$, $n = 4$) al resto de grupos de experimentación. En el gel inferior se muestran los niveles de PKC totales que no se modifican con los distintos tratamientos.

La figura 18 muestra como el glutamato es capaz de estimular la fosforilación en serina 729 de la PKC epsilon a dosis excitotóxicas de 500 µM ($p < 0.005$) en comparación con el control, pero no a 5µM que corresponde a una dosis no tóxica de glutamato. La fosforilación de este residuo de serina de la PKC epsilon es necesaria para la activación de esta quinasa (Cenni et al., 2002). Esta fosforilación por 500µM glutamato es totalmente abolida por 100 nM Ro 32-0432 ($p < 0.005$, $n = 4$). Como se había comprobado en experimentos anteriores utilizando TPA y forskolin, la activación de PKC epsilon con 500µM de glutamato requiere actividad PKA ya que si añadimos al medio H89 se inhibe la fosforilación de la serina 729 de

RESULTADOS

la PKC epsilon tras estimulación con glutamato (figura 18, segundo carril desde la izquierda).

Está documentado que la fosforilación de IRS-1 en el residuo Serina 307 interfiere en la unión de esta molécula al receptor de IGF-I (Aguirre et al., 2002). Por lo tanto, analizamos a continuación si este residuo de serina era fosforilado por glutamato de forma dependiente de PKC épsilon.

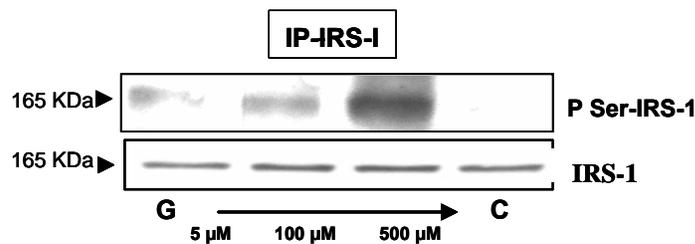


Figura 19

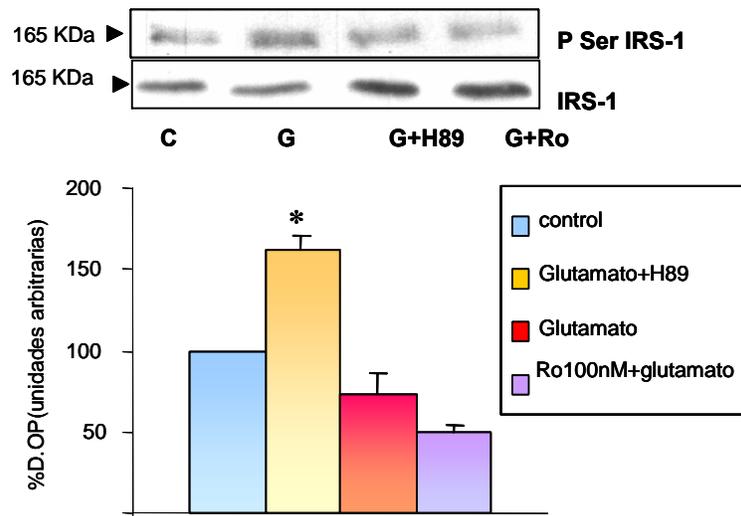


Figura 20

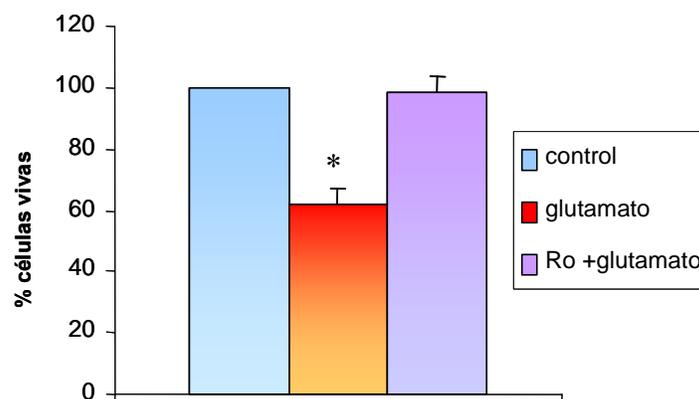
Figuras 19y 20: El glutamato induce fosforilación en serina de IRS-1 a través de PKC. Figura 19: glutamato 500μM estimula la fosforilación de IRS-1 en la serina³⁰⁷, esta fosforilación es dosis dependiente. Los niveles de IRS-1 total no se modifican. **Figura 20:** La fosforilación en serina³⁰⁷ por altas dosis de glutamato es inhibida por la dosis de Ro 320432 que interfiere con la PKC épsilon (100 nM). De manera parecida, la inhibición de PKA inhibe el efecto de 500μM de glutamato. Los niveles totales de IRS-1 no están alterados. El histograma muestra como en un total de 3 experimentos el grupo glutamato 500μM es significativamente distinto $p < 0.005$ a los grupos que reciben junto a esa dosis de glutamato los inhibidores de PKA h89 y el de PKC.

RESULTADOS

Para ello utilizamos un anticuerpo fosfo-específico para este residuo concreto de IRS-1, y como se puede comprobar en la figura 19, el glutamato fosforila la serina 307 del IRS-1 de manera dosis dependiente. El efecto del glutamato depende de la activación de la PKC epsilon, ya que si añadimos al mismo tiempo que el glutamato el inhibidor Ro 32-0432 el efecto de fosforilación de este residuo en el IRS-1 desaparece (figura 20). Además, la inhibición de la PKA mediante H89 también impide la fosforilación inducida por glutamato de IRS-1 (figura 20), lo que confirma la relación de PKA con este efecto.

8. LA ACTIVACIÓN DE PKC POR GLUTAMATO INTERVIENE EN LA MUERTE NEURONAL EXCITOTÓXICA:

A continuación, determinamos la importancia que tiene la estimulación de PKC epsilon por glutamato en los efectos neurotóxicos de este aminoácido. Cultivos de neuronas granulares de cerebelo fueron sometidos a dosis excitotóxicas de glutamato tres días después se analiza supervivencia (figura 21). Los grupos de neuronas que recibieron junto al glutamato el inhibidor de PKC epsilon Ro 32-0432 manifiestan un bloqueo de la acción del glutamato ($p < 0.005$).



Figuras 21: la inhibición de PKC epsilon impide la excitotoxicidad en cultivos sometidos a tratamientos con glutamato. Figura 21: Cultivos de neuronas granulares de cerebelo sometidos a tratamientos con glutamato (500 μ M) y Ro 320432 de 30 minutos y analizados tres días después. Muestran una inhibición de la muerte $p < 0.005$ si al mismo tiempo que se le añade glutamato se añade Ro 32-0432 100nM (n=4).

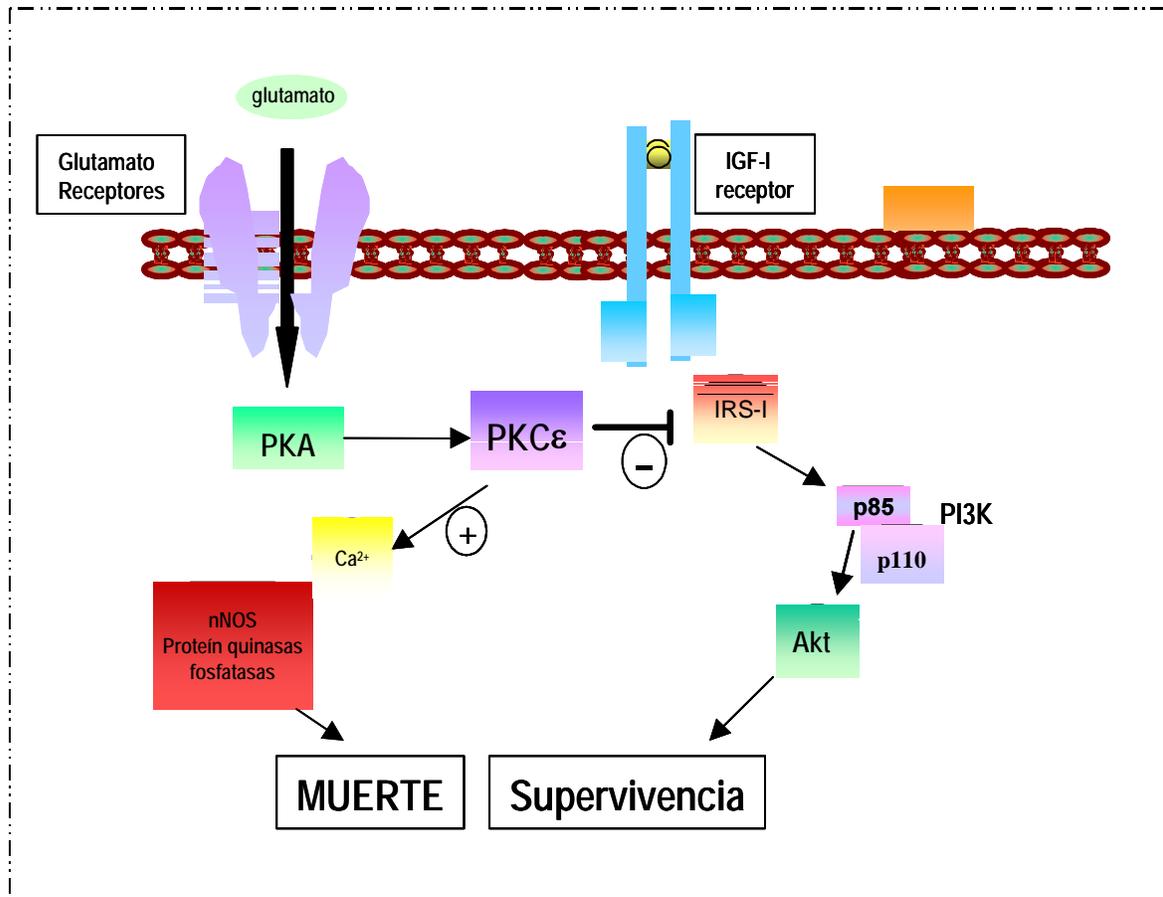


Figura 22: el glutamato interfiere con la señalización del IGF-I neuronas. Diagrama resumen. Las dosis excitotóxicas de glutamato implican tanto a receptores ionotrópicos como a receptores metabotrópicos de glutamato teniendo como resultado la activación primero de una PKA seguida de PKC épsilon. En este punto, PKC épsilon debe señalizar a través de dos rutas paralelas: 1) fosforilando IRS-1 en serina³⁰⁷ unida a la disociación del IRS-1 del receptor activado (Aguire et al.; 2002). Esto se traduciría en resistencia en la señalización de IGF-I, por que si IRS-1 no es fosforilado en tirosina por el IGF-I la subunidad reguladora del PI³ quinasa p85 no se asocia a IRS-1. Como resultado la subunidad catalítica de PI3 quinasa (p100) no puede señalizar más abajo en la vía, por lo que no se activa Akt y se interrumpe así la cascada de supervivencia inducida por IGF-I. 2) incrementa el flujo intracelular de calcio (Ca²⁺) que resulta en la activación de vías de muerte celular. Una ruta más tardía podría consistir en la activación de otras rutas de muerte que incluyeran la activación de otras isoformas de PKCs. Además, la vía de inhibición a través de PKC épsilon podría a su vez ser utilizada por TNF- α para fosforilar en serina a IRS (Kellerer et al., 1997). De cualquier manera, otras quinasas han sido implicadas en las acciones inhibitorias de TNF- α sobre el IRS.

9. EL GLUTAMATO REDUCE LA FOSFORILACIÓN DE AKT INDUCIDA POR IGF-I IN VIVO:

Para comprobar si la activación de PKC tenía importancia fisiológica en el papel excitotóxico del glutamato sobre el cerebro; nuestro siguiente paso fue primero comprobar si el glutamato era capaz de interferir la señal de fosforilación de Akt por IGF-I in vivo. Administramos intracerebroventricularmente (icv) las diferentes sustancias a testar. La figura número 23 muestra además de los resultados del experimento un esquema descriptivo del protocolo de inyección.

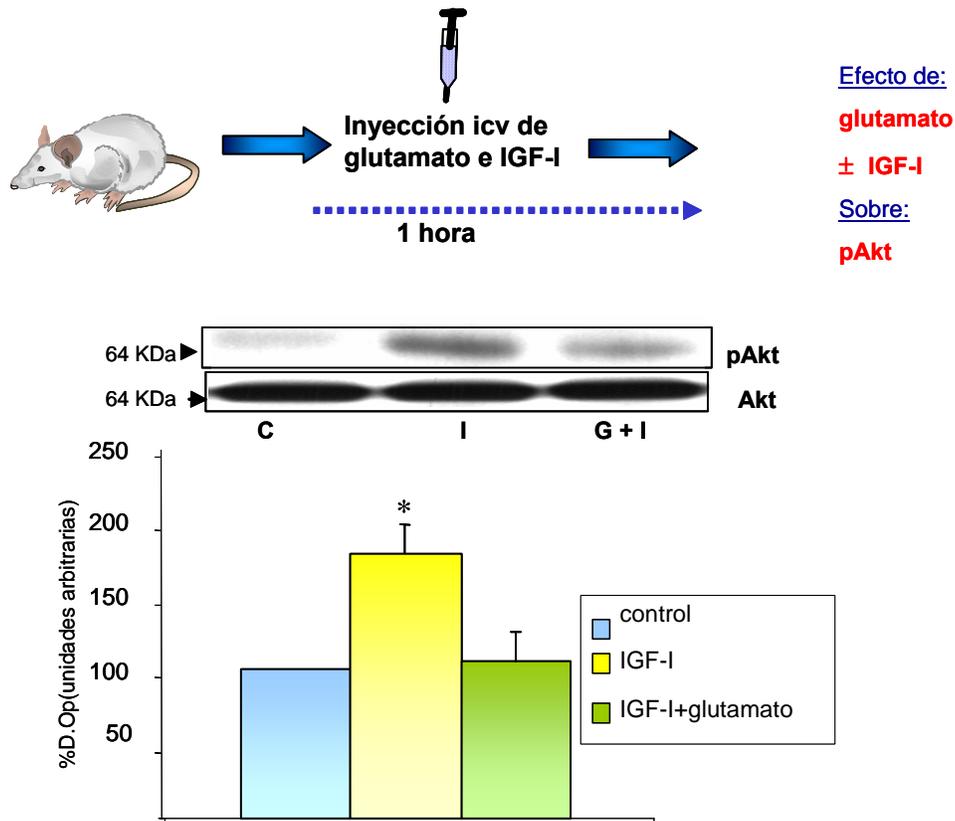


Figura 23: El glutamato inhibe la fosforilación de Akt inducida por IGF-I in vivo. La inyección aguda intracerebroventricular de IGF-I (100 μ M) aumenta el nivel de fosforilación de Akt en hipocampo, la administración de 10 mM de glutamato + 15mM de PDCA reduce significativamente ($p < 0.005$) la fosforilación de Akt tras IGF-I ($n=5$). El histograma muestra los niveles de Akt fosforilado tras su corrección con los niveles de Akt.

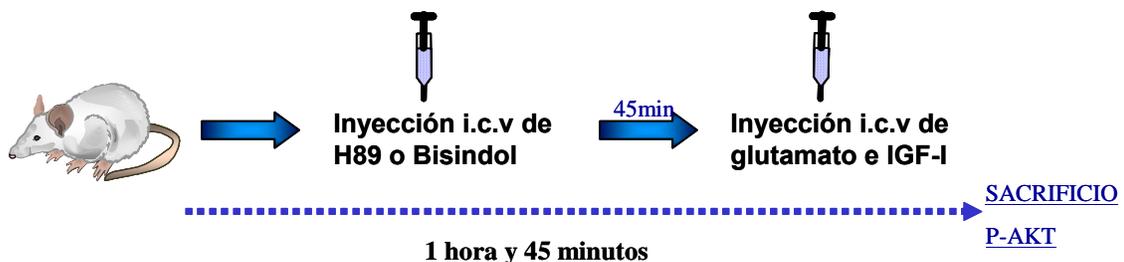
RESULTADOS

Los animales que recibieron IGF-I experimentan un aumento en los niveles de fosforilación de Akt en hipocampo. El grupo que recibió el IGF-I con glutamato y PCDA (un antirecaptador de glutamato para mantener las concentraciones externas de glutamato altas) disminuyó la fosforilación de Akt inducida por el IGF-I ($p < 0.005$).

Parecía por tanto que el glutamato interfería en la ruta del IGF-I también en animales vivos. El siguiente paso era averiguar si se replicaban los datos obtenidos in vitro y las drogas inhibidoras de la PKA y la PKC eran capaces de bloquear los efectos del glutamato.

10. LA INHIBICIÓN POR GLUTAMATO DE AKT IN VIVO ES DEPENDIENTE DE PKC Y PKA:

Al igual que los resultados obtenidos in vitro con cultivos, la administración de los inhibidores H89 (inhibidor de PKA) o bisindolymaleimide (inhibidor de PKC) protege a Akt de la desfosforilación por glutamato.



RESULTADOS

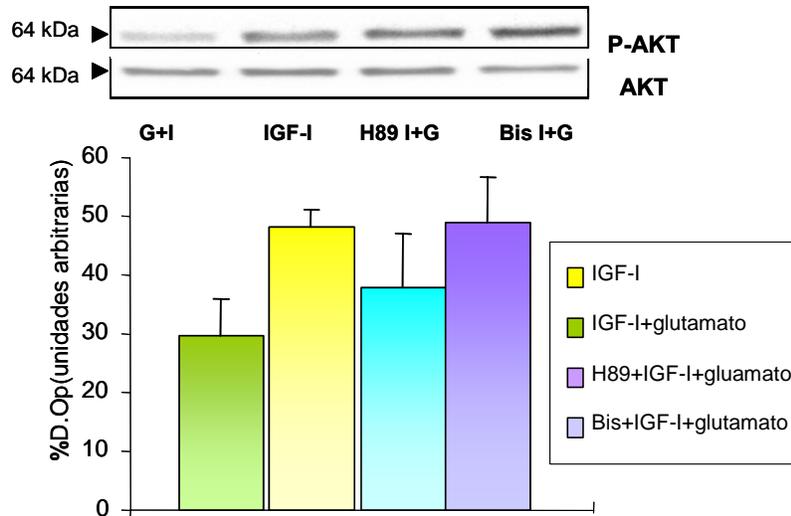


Figura 24: la administración icv de inhibidores de PKA y PKC inhibe la acción del glutamato sobre Akt cuando añadimos IGF-I. La inyección aguda icv de glutamato (10mM) + PDCA (15 mM) + IGF-I (100 μ M) disminuye la fosforilación de Akt en homogeneizados de hipocampo. Esta disminución se ve reducida por la inyección icv previa del inhibidor de PKA H89 o por el inhibidor de PKC bisindolylmaleimide.

En la figura número 24 podemos comprobar tanto en la gráfica como en el blot de referencia que los grupos experimentales que recibieron alguna de estas dos drogas inhibidoras son capaces de restaurar los niveles de fosforilación de Akt casi a la misma intensidad que el grupo que solo había recibido el factor trófico, a diferencia de el grupo que al mismo tiempo había recibido glutamato y su antirecaptador.

El mismo protocolo de preincubación con drogas inhibidoras fue también utilizado en el siguiente experimento descrito en la figura número 25, en el que se trató de comprobar la efectividad in vivo de la droga inhibidora selectiva de los subtipos de PKC alfa, beta II y épsilon, Ro 32-0432.

RESULTADOS

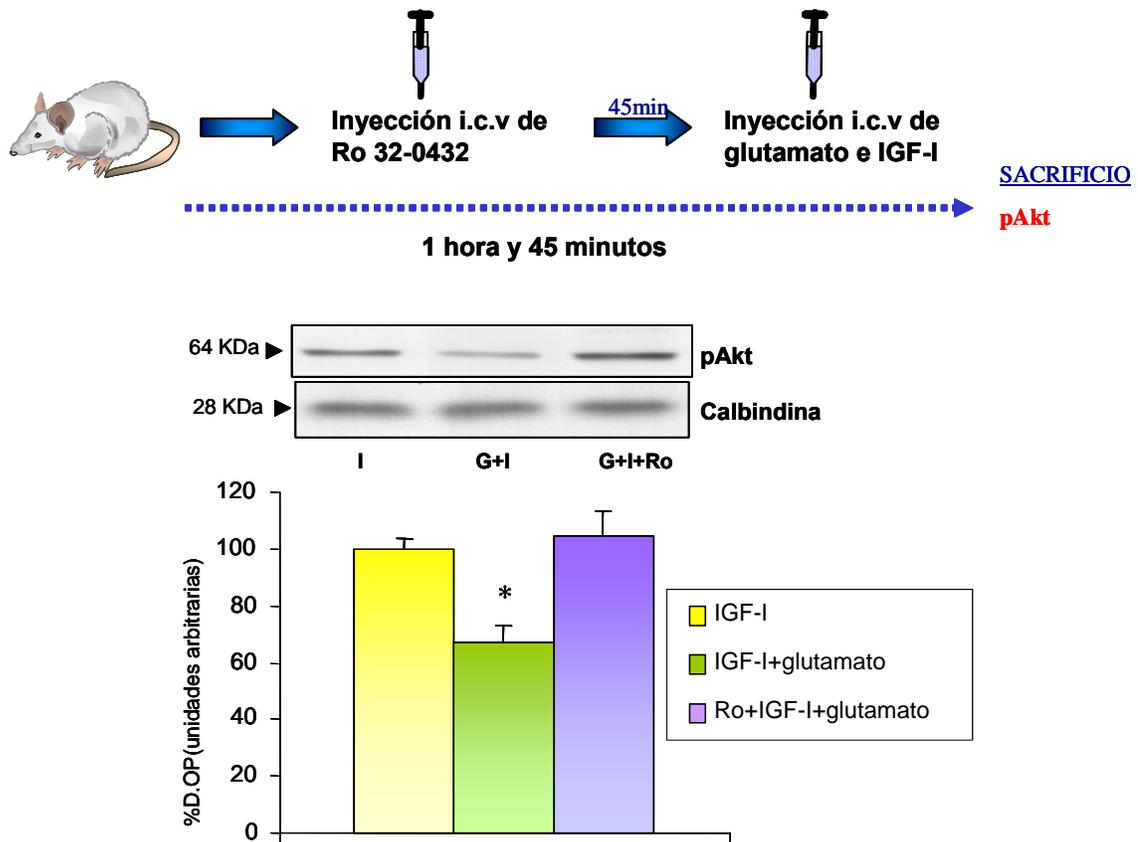


Figura 28: la reducción en la fosforilación de Akt inducida por IGF-I tras la administración icv de glutamato es inhibida por Ro 32-0432. La reducción en la fosforilación de Akt en cerebro inducida por glutamato tras la administración de IGF-I es inhibida por la administración de Ro 32-0432 (100 μ M). Histograma: cuantificación de fosfo-Akt normalizada con niveles de calbindina (marcador neuronal que no se modifica por los distintos tratamientos) indica la desaparición de los efectos del glutamato tras la incubación con Ro 32-0432 $p < 0.005$, $n = 5$.

Los resultados son muy llamativos, ya que la administración con esta droga protege ($p < 0.005$) a Akt de la defosforilación provocada por la inyección icv de IGF-I + glutamato. Este resultado nos planteaba la posible utilización de un inhibidor de PKC en algún modelo *in vivo* de daño excitotóxico.

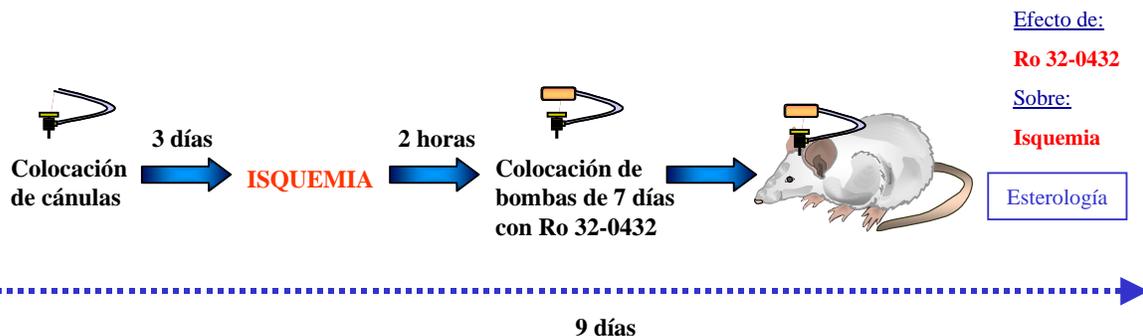
RESULTADOS

11. REDUCCIÓN DEL VOLUMEN DE INFARTO ISQUÉMICO EN ANIMALES TRATADOS CON EL INHIBIDOR DE PKC RO 32-0432:

El daño excitotóxico parece estar implicado en el proceso isquémico (Beal, 1992), y en muchos tipos de enfermedades neurodegenerativas agudas, así como en muchas de las enfermedades neurodegenerativas crónicas.

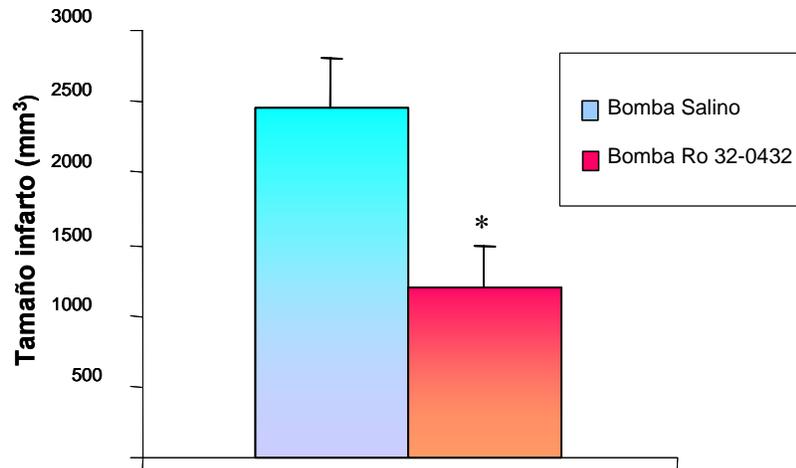
La obstrucción aguda de una de las mayores arterias cerebrales como la arteria cerebral media (ACM), produce una reducción inmediata del flujo cerebral en el área de irrigación correspondiente y es la que presenta mayor similitud con los infartos focales en el humano (Who, 1989).

Como muestra las imágenes de la figura 28 la serie de animales que recibieron la

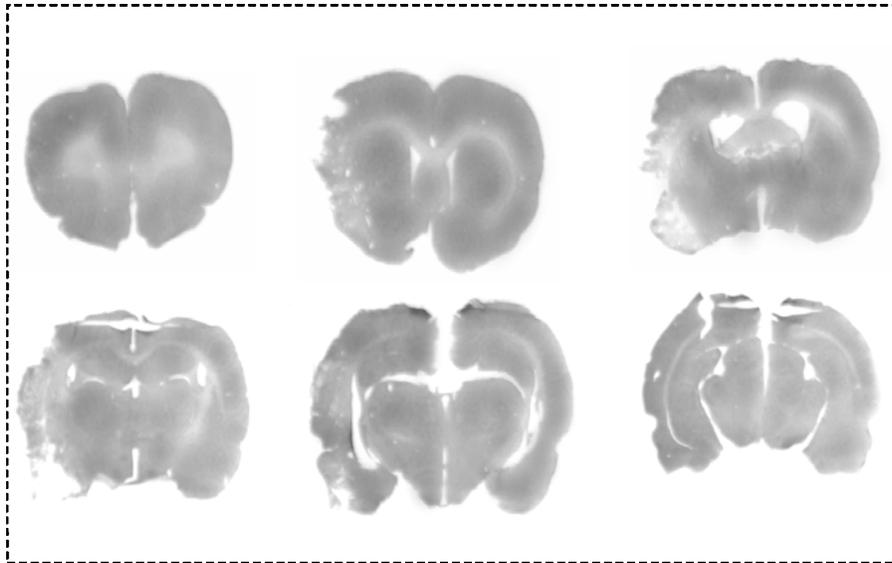


droga tras sufrir la oclusión de la arteria cerebral media experimentaron una reducción significativa en el volumen del infarto isquémico (figura N 29, grupo Ro 32-0432) en comparación con los animales a los que solo se les administró solución salina tras sufrir el infarto cerebral (figura N 29, grupo bomba salino $p < 0.005$). Tanto el grupo Ro 32-0432 como el grupo salino recibieron su tratamiento mediante la colocación de una bomba de liberación controlada intracerebroventriculas conectada justo después de sufrir la oclusión de la ACM, imitando un posible uso terapéutico tras daño isquémico.

RESULTADOS

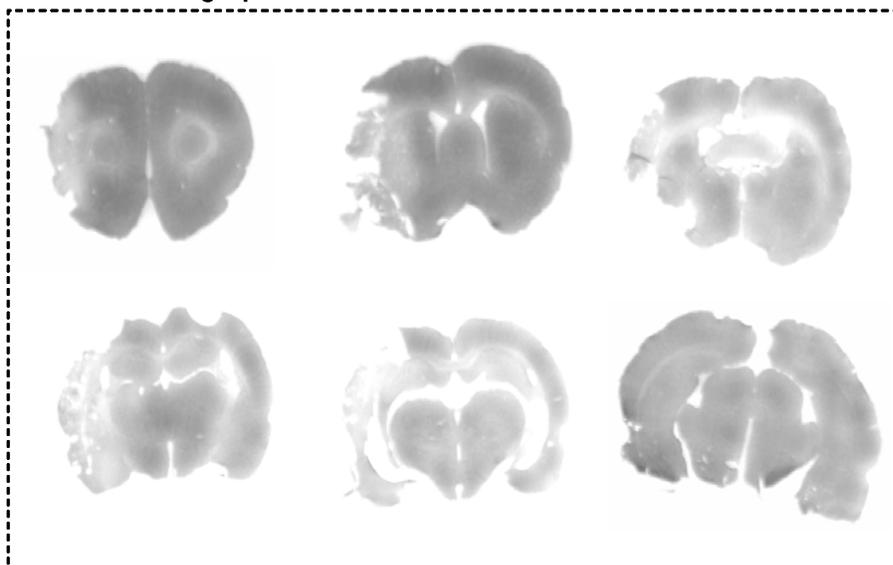


Figuras 29 y 30. Ro 320432 protege de los efectos provocados por oclusión de la arteria cerebral media. Figura 29: esta figura muestra dos series de cortes frontales de animales sometidos a la oclusión de la arteria cerebral media. En la serie superior se muestran cortes de un animal que tras la isquemia recibió un tratamiento de 7 días con el inhibidor de PKC épsilon Ro 32-0432. La serie inferior muestra cortes de un animal que tras sufrir la isquemia recibió solución salina durante 7 días. Nótese que el volumen de infarto del animal que recibió el inhibidor es significativamente inferior al del animal que solo recibió solución salina (las ratas control muestran una lesión telenfálica extensa en el lado izquierdo; comparar con el lado contralateral intacto) **Figura 30:** en esta figura se describe el protocolo seguido antes, durante y después de la oclusión de la arteria cerebral media; y como la administración crónica de Ro 32-0432 (100mM) inmediatamente después de la isquemia reduce drásticamente el volumen de infarto (~ 50%) determinado 7 días tras el daño isquémico. La diferencia respecto al grupo de animales tratados con suero salino tras la isquemia es estadísticamente diferente con una $p < 0.005$, siendo 5 el número mínimo de ratas por grupo.



grupo con bomba Ro32-0432

grupo con bomba salino



El IGF-I es capaz de promover supervivencia neuronal, en esta capacidad está implicada una de las rutas de señalización más estudiadas de este factor trófico, la vía de la PI3 quinasa/Akt (Dudek et al., 1997). Durante el desarrollo de esta tesis doctoral hemos comprobado como las dosis excitotóxicas de glutamato interfieren con esta vía. Nuestros resultados, junto a observaciones recientes en las que se demuestra la pérdida de sensibilidad a la insulina y/o IGF-I en diferentes tipos de condiciones neurodegenerativas (Ostlund et al., 2001; Peretz et al., 2001; Venters et al., 1999), dan una nueva perspectiva en la que señales citotóxicas pueden operar interfiriendo con rutas neurotróficas. En esta nueva interpretación, el exceso de glutamato sería también neurotóxico por ser capaz de atenuar la señal trófica del IGF-I. En principio, esta hipótesis parecería contradictoria con otros estudios que otorgan un papel fundamental al calcio intracelular en la excitotoxicidad del glutamato (Sattler et al., 2000), pero no lo es, ya que se podría considerar esta pérdida de sensibilidad al IGF-I como una ruta paralela implicada en la muerte neuronal por glutamato.

Los cultivos de neuronas granulares de cerebelo proporcionan un modelo muy útil para estudiar la toxicidad del glutamato. El glutamato reduce su supervivencia en más de un 50%. El IGF-I añadido junto al glutamato es incapaz de revertir por completo la muerte que éste último provoca en las neuronas granulares, sugiriéndonos que el glutamato interfiere o bloquea la ruta de supervivencia inducida por el IGF-I.

El IGF-I activa a la serina/treonina quinasa B (PKB o Akt) a través de la activación de la PI3 quinasa, y esta activación es necesaria y suficiente para la supervivencia de neuronas cerebelares (Dudek et al., 1997). Nuestros resultados demuestran

que el glutamato y el IGF-I modulan de forma opuesta el estado de fosforilación de Akt. La activación por fosforilación de Akt/PKB juega un papel fundamental en la prevención de la muerte celular por apoptosis, ya que fosforila e inactiva muchas proteínas implicadas en apoptosis (Vincent et al., 2002). En el caso del glutamato, se produce una pérdida de la fosforilación y actividad de Akt que se traduce en una inhibición de su capacidad antiapoptótica; en este punto había que formularse la pregunta de si ¿el glutamato modifica el nivel de fosforilación de Akt de manera directa o si por el contrario esa disminución es consecuencia de la modulación previa sobre una o varias moléculas de la ruta?

Para orientarnos en la búsqueda de respuesta a estas preguntas descubrimos en estudios previos por ejemplo, que la activación de Akt inducida por litio es inhibida por glutamato, sugiriéndose que la molécula capaz de reducir esta fosforilación inducida por glutamato es la fosfatasa 2A (Chalecka-Franaszek et al., 1999). Esta observación nos llevó a utilizar inhibidores de fosfatasas para comprobar si mediaban la disminución de la fosforilación de Akt tras glutamato en nuestro modelo, ya que parecía que la inhibición en el grado de fosforilación de Akt inducido por glutamato no era una acción directa, pero la adición de inhibidores de proteína fosfatasas como el ácido okadaico o la tautomicina no tenía ningún efecto sobre el grado de inhibición del glutamato sobre Akt; así como la adición de drogas implicadas en el metabolismo del calcio como el quelante BAPTA-AM, tan relacionadas con excitotoxicidad por glutamato, no tenía ningún efecto sobre el grado de fosforilación de Akt.

1. VÍAS DE INTERACCIÓN ENTRE EL GLUTAMATO Y EL IGF-I:

El IGF-I y la insulina ejercen sus efectos uniéndose a su receptor específico en la superficie celular (Myers et al., 1993). Tras la unión de la insulina o el IGF-I a la subunidad extracelular α de su receptor, la tirosina-proteína-quinasa de la subunidad intracelular (β) del receptor se activa. Esta activación se traduce en una autofosforilación de la subunidad β en tirosina. La actividad tirosina-quinasa del receptor, fosforilando sustratos intracelulares es crucial para que el IGF-I y la insulina puedan ejercer su acción, su abolición mediante anticuerpos o mutantes específicos destruye por completo la señalización de la insulina o el IGF-I (Myers et al., 1993). Por ello, en una primera aproximación estudiamos si el grado de fosforilación en tirosina del receptor de IGF-I se veía disminuído por el tratamiento con glutamato, y comprobamos que no se modificaba,

lo que nos indicaba que la interacción entre el glutamato y la supervivencia inducida por IGF-I no se producía en este nivel.

En un siguiente paso comprobamos si la fosforilación de IRS-I se veía afectada por el tratamiento con glutamato, y a diferencia del receptor de IGF-I, la fosforilación en tirosina del IRS-I se veía significativamente disminuida cuando administramos al mismo tiempo IGF-I y glutamato. El IRS-I posee gran cantidad de sitios de fosforilación en serina/treonina, la fosforilación en estos residuos puede ser uno de los mecanismos por

los que el factor de necrosis tumoral (TNF) provoca resistencia a insulina (Feinstein et al., 1993; Hotamisligil et al., 1996; Kanety et al., 1995; Paz et al., 1997; Rui et al., 2001). También se ha comprobado que la estimulación en células de PKC provoca la fosforilación en serina/treonina de IRS-I, inhibiendo su

capacidad de fosforilación en tirosina (Sun et al., 1991; Chin et al., 1994). Otro estudio demuestra que la quinasa c-jun NH₂ (JNK) es capaz de activarse por diversos estímulos inflamatorios, formando complejos estables con IRS-I, para ello fosforila su serina³⁰⁷, impidiendo que la insulina lo pueda fosforilar en tirosina. También, la sustitución de la serina³⁰⁷ por una alanina evita que la insulina pueda fosforilar al IRS-I en sus residuos de tirosina en neuronas en cultivo (Aguirre et al., 2000). Por tanto, la fosforilación en residuos tirosina de IRS-1 es necesaria para la señalización del IGF-I ya que crea un complejo de señalización activo por unión de varias proteínas, incluyendo a las dos subunidades de regulación de la PI3 quinasa (p85 α p85 β), esta unión es necesaria para que se pueda activar la PI3 quinasa y se puedan así producir los efectos pro-supervivencia de esta vía de señalización (Myer et al., 1996).

Parece, por tanto que la fosforilación en residuos específicos del IRS-I es un mecanismo importante de regulación, ya que otorga gran especificidad en multitud de niveles incluyendo la interacción entre serina quinasas específicas e IRS-I, regulación de la actividad de quinasas asociadas, y la selección de residuos específicos de fosforilación.

De todas formas, es difícil demostrar que la fosforilación en serina de IRS-I es diferente según las condiciones fisiológicas, ya que IRS-I tiene cerca de 100 residuos potencialmente fosforilables en serina que complican mucho los análisis bioquímicos (Rui et al., 2001). Nuestros resultados muestran que el glutamato es capaz de disminuir la fosforilación de IRS-I en tirosina disminuyendo la capacidad de IRS-I de asociarse a la subunidad p 85, la subunidad reguladora de la PI3 quinasa. Esta fosforilación específica no es dependiente de JNK, ya que esta

quinasa no modifica sus niveles de fosforilación en presencia de glutamato.

2. LAS PROTEÍNAS QUINASAS PKA Y PKC ESTÁN IMPLICADAS EN LA FOSFORILACIÓN EN SERINA DEL IRS-I:

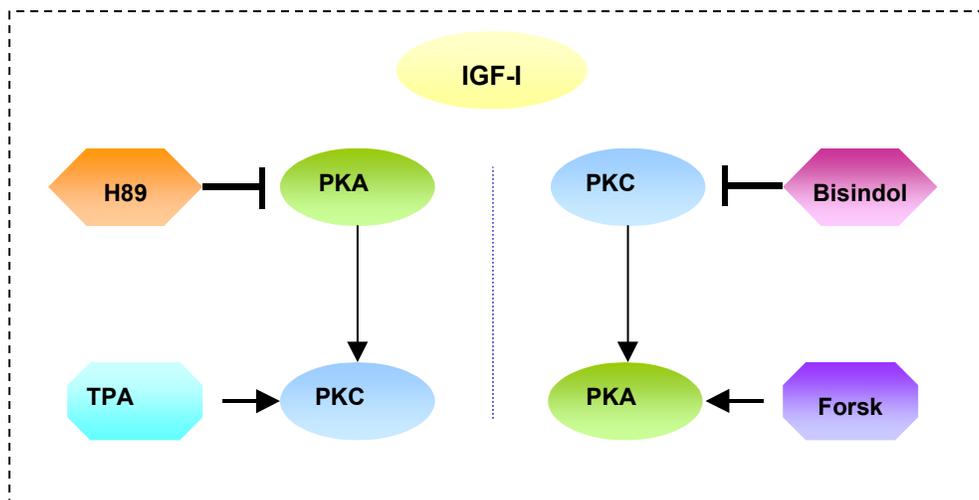
Las proteínas IRS como se ha mencionado anteriormente poseen más de 100 sitios potenciales de fosforilación en serina y treonina para quinasas como PKAs (quinasas dependientes de cAMP), PKC y MAP quinasa (Mothe et al., 1996). La disminución en la fosforilación en tirosina de IRS-I, o el aumento de la fosforilación en serina, parecía depender de las proteína quinasas PKA y PKC, ya que los inhibidores específicos de estos dos subtipos de treonina serina quinasas, el H89 y la bisindolymaleimide eran capaces de restaurar el nivel de fosforilación en tirosina del IRS-I tras la estimulación con IGF-I y glutamato; también si avanzábamos a lo largo de la vía de la PI3 quinasa podíamos comprobar que al añadir estos inhibidores junto al glutamato y el IGF-I los niveles de fosforilación de AKT volvían a los niveles normales de fosforilación por IGF-I.

Tras los resultados obtenidos con los inhibidores de PKA y PKC, nuestra investigación se centró en estas dos proteína quinasas.

En un segundo tipo de experimentos empleamos agonistas de PKA y PKC. El tratamiento con forskolin o con TPA imita el efecto del glutamato sobre la señalización del IGF-I, disminuyendo la fosforilación en tirosina de IRS-I, e incapacitando la unión de esta molécula con la subunidad p85 de la PI3 quinasa, que se traduce en una disminución en el grado de activación de Akt.

Otro punto a tener en cuenta fue que la incubación conjunta de los dos inhibidores

o de los dos agonistas de PKA y PKC no aumentaban sus efectos, lo que nos sugirió que estas moléculas no competían por la fosforilación en serina del IRS-I, sino que por el contrario estaban dispuestas de manera secuencial en la vía que el glutamato activaba produciendo resistencia al IGF-I. La comprobación del orden de colocación secuencial de estas quinasas en la fosforilación de IRS-1 fue sencilla combinando los inhibidores y los agonistas.



Esquema 1 de la discusión.

El esquema 1 resume de manera gráfica un experimento en el que se combinaron activadores e inhibidores de la PKA y la PKC. Cuando la PKC está inhibida por bisindolymaleimide y al mismo tiempo PKA es estimulada con forskolin, la fosforilación en tirosina de IRS-I y su la asociación a PI3 quinasa inducida a IGF-I no se ve afectada, Mientras que si PKA es inhibida por H89, y al tiempo se añade

al medio que contiene IGF-I el activador de PKC TPA, se inhibe por completo la fosforilación en tirosina del IRS-1 impidiendo así su asociación a la subunidad p85 de la PI3 quinasa.

Se comprueba con este experimento que en primer lugar se activa PKA y en segundo lugar algún subtipo de PKC que podría ser el encargado de fosforilar a IRS-I en uno o varios residuos de serina.

3. LA PKC ÉPSILON FOSFORILA A IRS-I TRAS LA ACTIVACIÓN POR GLUTAMATO:

La PKC implicada en la fosforilación en serina de IRS-1 debía ser independiente de calcio, ya que el quelante de calcio BAPTA-AM no parecía tener ningún efecto sobre su actividad, eso situaría a esta PKC dentro de 2 posibles subtipos, las noveles (independientes de calcio, pero dependientes de diacilglicerol) y las atípicas (independientes de calcio e independientes de diacilglicerol). Por otro lado como ya hemos descrito anteriormente la PKC implicada en esta fosforilación es dependiente de ésteres de forbol, por lo que las posibles candidatas se reducen al grupo de la PKC noveles.

Nuestros resultados con el inhibidor de PKC Ro 32-0432 muestran como esta droga es capaz de devolver al IRS-1 a su nivel de fosforilación en tirosina tras el tratamiento conjunto con IGF-I y glutamato a los niveles propios de un tratamiento exclusivo con IGF-I, ya que es capaz de inhibir por completo el efecto de negativo que el glutamato ejerce sobre la fosforilación en residuos de tirosina. Esta inhibición que Ro 32-0432 ejerce sobre el glutamato es dosis dependiente, siendo

ineficaz a las dosis que inhibe a los subtipos de PKC α y β II (subtipos clásicos), y siendo totalmente efectiva a la dosis de 100nM capaz de inhibir al subtipo de PKC novel ϵ , que es independiente de calcio y dependiente de ésteres de forbol.

Nuestros resultados muestran que el glutamato induce resistencia a IGF-I a través de la activación de PKA que a su vez activa PKC ϵ . Ésta última se encargaría de fosforilar en uno o varios residuos de serina al IRS-1 desacoplándolo así del receptor de IGF-I, esta propuesta es totalmente novedosa. Existían evidencias previas de que las proteínas de unión multifuncionales IRSs inducían a resistencia a IGF-I y a la insulina (Paz et al., 1997). Por ejemplo, no solo PKC alfa o ϵ (Kellerer et al., 1997; Ozes et al., 2001; Rosenzweig et al., 2002), sino también MAP quinasa (Rui et al., 2001) o PI3 quinasa (Ozes et al., 2001) median en la desensibilización de los receptores de insulina e IGF-I inducida por TNF-alfa. Otro ejemplo parecido del que ya se ha hablado en esta discusión, ocurre con PKC zeta (Liu et al., 2001) y PI3 quinasa (Ozes et al., 2001) que ha sido implicada en la autoregulación negativa de IGF-I e insulina. Otros resultados muestran que la estimulación de PKC inhibe la fosforilación de Akt debido a la fosforilación en serina del IRS-I. (Motley et al., 2001; Zheng et al., 2000). Todas estas observaciones parecen estar de acuerdo con nuestros datos, sugiriendo que el glutamato necesita la activación de la PKC ϵ como un efector final para la inactivación de IRS-I por fosforilación en serina.

Se han descrito varios inhibidores de PKCs capaces de bloquear la acción excitotóxica del glutamato (Favaron et al., 1990; Wagey et al., 2001). La diferencia fundamental entre estos estudios previos y el nuestro, es que, las rutas que se desencadenaban tras la activación de PKC se creía que necesitaban calcio e

implicaban al receptor de NMDA, mientras nosotros aportamos una evidencia directa de que PKC inhibe la señalización del IGF-I sin una necesaria activación por calcio, ya que comprobamos en una siguiente fase del estudio que el glutamato activa a la PKC épsilon fosforilado y también que el inhibidor de este subtipo de PKC, Ro 32-0432 es capaz de abolir no solo la activación de la PKC épsilon sino el efecto excitotóxico del glutamato implicando de una manera directa a esta proteína quinasa en los efectos excitotóxicos del glutamato. La PKC épsilon por tanto, una vez activada por dosis excitotóxicas de glutamato fosforila en serina al IRS-1 desacoplándolo de la ruta del IGF-I e impidiendo que esta avance y pueda ejercer su efecto promoviendo supervivencia. La fosforilación en serina del IRS-1 parece que se produce en su residuo 307 ya que con un anticuerpo fosfo-específico contra este residuo parece que se activa con glutamato y esta fosforilación es inhibida por Ro 32-0432 de manera dosis dependiente, coincidiendo con la dosis que inhibe al subtipo PKC épsilon. La fosforilación de PKC épsilon en la serina 729 (imprescindible para su activación) depende, en nuestro modelo, tanto de glutamato como de PKA. La inhibición de esta proteína quinasa disminuye de manera drástica el grado de activación de PKC épsilon lo que nos demostraría que el glutamato ejerce su efecto sobre la vía de supervivencia del IGF-I activando una PKA que a su vez activa a PKC épsilon que fosforila en serina al IRS-1 desacoplándolo de esta vía antiapoptótica.

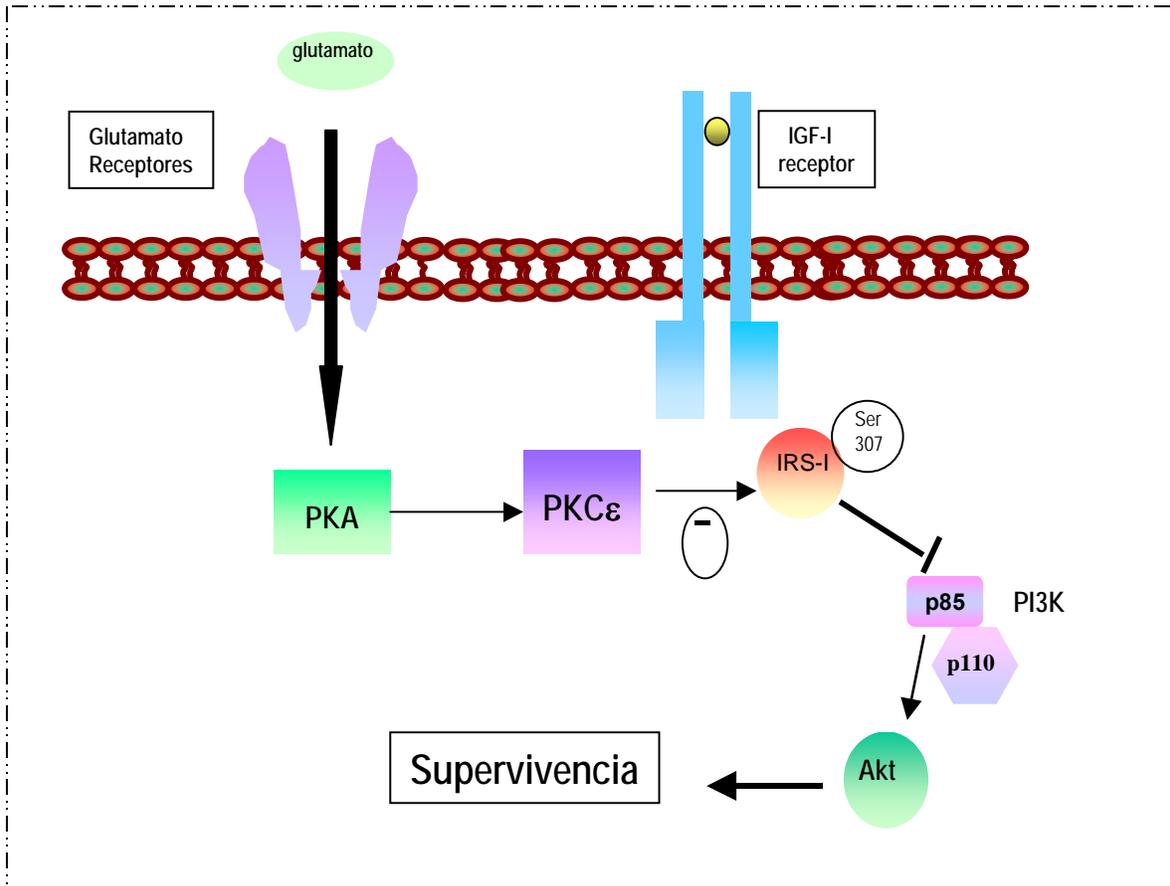
Tanto la estimulación de PKA (Beaver et al.,2001) como la de PKC (Calabresi et al., 2001; Pastorino et al., 2000; Schinkmann et al., 2000.) han sido descritas como pasos posteriores a la activación del receptor de glutamato. La activación simultanea de PKA y PKC ha sido también descrita recientemente en respuesta a

glutamato (Brandrowski et al., 2001; Huang et al., 1999). De cualquier forma, las rutas específicas ligadas al receptor de glutamato que activan PKA/PKC todavía necesitan ser estudiadas, aunque existan evidencias muy importantes que otorgan al subtipo de receptores glutamato metabotrópicos un papel previo en esta estimulación (Beaver et al., 2001; Schinkmann et al., 2000; Brandrowski et al., 2001). Debido a las altas dosis de glutamato utilizadas en nuestro estudio, que son capaces de interactuar con ambos subtipos de receptores de glutamato, ionotrópicos y metabotrópico, es complicado determinar que subtipo de receptor está implicado en estos efectos deleterios del glutamato (Sattler et al., 2001). De todas formas, existen estudios que muestran como los receptores de glutamato metabotrópicos son capaces de activar a la PKC ϵ (Pastorino et al., 2000). Esto podría sugerir que la resistencia al IGF-I inducida por el glutamato se podría producir a través de la activación de estos receptores.

Un dato importante, puesto de relieve con estos resultados es como la atenuación de la ruta de supervivencia inducida por IGF-I no implicaría a las rutas proapoptóticas implicadas en la excitotoxicidad del glutamato (Sattler et al., 2001). Para ser más exactos, la inhibición de la actividad de Akt es el ejemplo prototípico de bloqueo de la señalización antiapoptótica del IGF-I, suficiente para desencadenar la muerte neuronal (Dudek et al., 1997). De todas formas, la homeostasis implicada en la supervivencia neuronal debe incluir la activación de Akt y posiblemente otras rutas pro-supervivencia. Bajo condiciones patológicas, como altas concentraciones de glutamato, la inhibición de estas rutas pro-supervivencia que están íntimamente ligadas a rutas de muerte (Datta et al., 1997) haría que la balanza se inclinara a favor del proceso de muerte. Como se muestra

en el esquema 2 de esta discusión, este proceso de muerte podría muy bien coexistir con el proceso muy reconocido de aumento de calcio intracelular inducido por glutamato, ya que

PKC épsilon es capaz de estimular los niveles de calcio intracelular (Fahrman et al., 2002; Saiton et al., 2001) y la actividad de PKC es necesaria para la activación por parte de los receptores de NMDA de la NO sintasa (Marin et al., 1992), un conocido efector de la neurotoxicidad del calcio tras glutamato (Sattler et al., 2000). Una muerte celular alternativa en excitotoxicidad dependiente de NMDA podría predominar en tipos específicos de daño excitotóxico. Además, lo que sugerimos en este trabajo es que la activación de PKC épsilon por glutamato es una bifurcación hacia la excitotoxicidad del calcio (esquema 2 de la discusión) y señalización pro-apoptótica interfiriendo con la señalización que induce supervivencia. Nuestra propuesta está de acuerdo con descubrimientos anteriores que señalan que las PKCs son necesarias en los cambios intracelulares homeostáticos de calcio inducidos por glutamato y muerte neuronal (Favaron et al., 1990) y muestran como la inhibición de PKC épsilon es suficiente para inhibir la muerte neuronal inducida por glutamato.



Esquema 2 de la discusión. El receptor de glutamato a través de la activación secuencial de PKA y PKC ϵ fosforila en la serina 307 al IRS-1 desacoplándolo de la ruta de señalización y supervivencia de IGF-I, produciendo el fenómeno conocido como resistencia a IGF-I.

4. SIGNIFICADO PATOLÓGICO DE LA INHIBICIÓN DE IGF-I POR GLUTAMATO:

En un primer experimento *in vivo*, se demostró que el glutamato es capaz de reducir significativamente la fosforilación de Akt inducida por IGF-I, lo que sugiere que el glutamato anula la capacidad neuroprotectora del IGF-I. En una segunda aproximación, se comprobó que los inhibidores de PKA H89 y de PKC bisindolymaleimide eran capaces de revertir esta defosforilación, lo que implica a estas proteína quinasas en este proceso excitotóxico también *in vivo*. Un tercer paso sirvió para demostrar que la inyección intracarebroventricular del inhibidor específico de PKC Ro 32-0432 seguida de una de glutamato bloqueaba la acción deleterea de este último. Produciéndose así, en presencia de Ro 32-0432 la acción neuroprotectora del IGF-I aún cuando existan concentraciones altas de glutamato, ya que los niveles de Akt fosforilado vuelven a ser iguales al de los animales que solo recibieron como tratamiento de IGF-I.

Las lesiones isquémicas se piensa que están formadas al menos en parte por muerte neuronal debida a excitotoxicidad por glutamato (Benveniste., 1991). La obstrucción aguda de una de las mayores arterias cerebrales como la arteria cerebral media (ACM) produce una reducción inmediata del flujo cerebral en el área de irrigación correspondiente a la isquemia (isquemia focal). Las técnicas de isquemia en las que se logra una isquemia del territorio de la arteria cerebral media son las que presentan mayor similitud con los infartos focales en el humano, en los cuales la obstrucción de la arteria cerebral media se observa

hasta en el 80% de todas las lesiones vasculares cerebrales, por eso utilizamos en el estudio este modelo de lesión (Longa et al., 1989; Nagasawa et al., 1989). Nuestros resultados muestran una reducción en un 50% del área de infarto isquémico en los animales tratados con el inhibidor Ro 32-0432. Este resultado es parecido a los obtenidos con la administración de IGF-I dos horas después de producirse el daño isquémico en los que se reduce significativamente las secuelas producidas por el mismo (Johnston et al., 1996).

Si tomamos como referencia los datos que hemos obtenido con los experimentos in vitro se podría decir que la inhibición PKC épsilon disminuye el efecto negativo que el glutamato ejerce cuando es administrado en dosis excitotóxicas sobre la supervivencia de neuronas de cerebelo. Es posible que este mecanismo se de también en animales sometidos a isquemias, y las rutas de supervivencia de no solo el IGF-I, sino de otros factores tróficos que en procesos como la isquemia serían capaces de reducir los efectos nocivos que produce la falta de flujo sanguíneo en la zona infartada.

Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la activación de PKC mediada por glutamato unida a la pérdida de sensibilidad del IGF-I es un mecanismo patogénico en el daño isquémico, ya que su inhibición produce una reducción en el tamaño del infarto isquémico.

Nuestros resultados hacen pensar que algún inhibidor específico de PKC épsilon podría actuar como terapia coayuvante en el tratamiento con fármacos anti-isquémicos, anti-epilépticos y neuroprotectores en general, ya que facilitan su acción al frenar el efecto patogénico antineuroprotector, permitiendo así que los factores tróficos como el IGF-I ejerzan su función neuroprotectora y trófica.

Como resumen, añadir que nuestros resultados proponen que la pérdida de sensibilidad que el glutamato produce sobre las acciones del IGF-I en neuronas es un mecanismo patogénico común por lo menos en los procesos neurodegenerativos ligados a la excitotoxicidad tales como inflamación, encefalopatías relacionadas con el consumo de alcohol y puede que incluso en enfermedades neurodegenerativas hereditarias. Los niveles elevados de IGF-I en las lesiones cerebrales puede que reflejen procesos de compensación local, así como las altas o bajas concentraciones de IGF-I en suero que se observan en diferentes enfermedades neurodegenerativas (Busiguina et al., 1997; Schwab et al., 1997; Tham et al., 1993; Torres-Alemán et al., 1996; 1997; Vanhala et al., 2001) podrían reflejar los distintos estados de un proceso de resistencia/deficiencia de IGF-I, como ha sido con anterioridad sugerido en otros estudios (Torres-Alemán., 2000). Si nuestra hipótesis es correcta, la administración de IGF-I sería beneficiosa en condiciones de neurodegeneración donde se sospecha que existe pérdida de sensibilidad al IGF-I. Realmente, lo que está muy bien documentado es que en los modelos de excitotoxicidad en animales ligados a isquemia, el IGF-I es neuroprotector (Jonhston et al., 1996). Por otro lado, la modulación de la actividad de PKC épsilon podría convertirse en una nueva diana terapéutica contra el daño excitotóxico. Esta posibilidad parece muy atractiva si tenemos en cuenta que existen inhibidores de PKC épsilon como Ro 32-0432 que son activos mediante ingesta oral (Birchall et al., 1994). Si este u otros compuesto equivalentes pudieran atravesar la barrera hematoencefálica, su aplicación podría ser muy prometedora.

CONCLUSIONES:

1. El glutamato en dosis excitotóxicas es capaz de interferir la ruta de supervivencia del IGF-I.
2. Esta inhibición del glutamato se realiza mediante la estimulación específica de PKA y después de PKC épsilon.
3. La PKC épsilon fosforila en un residuo de serina al IRS-I probablemente desacoplándolo de la vía de señalización del IGF-I.
4. Esta nueva ruta que conecta excitotoxicidad con neuroprotección tiene un significado patológico en al menos la isquemia experimental.

1. Aguado F., Sánchez Franco F., Caicedo L., Fernández T., Rodrigo J., Martínez-Murillo R. 1992. Subcellular localization of insulin-like growth factor I (IGF-I) in purkinje cells of the adult rat: an immunocytochemical study. *Neurosci Lett* 135:171-174.
2. Aguirre V., Uchida T., Yenush L., Davis RJ., White MF. 2000. The c-jun NH₂-terminal kinase promotes insulin resistance with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser307. *J Biol Chem* 275: 9047-9054.
3. Aguirre V., Werner ED., Giraud J., Lee YH., Shoelson SE., White MF. 2002. Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *J Biol Chem* 277: 1531-1537.
4. Ahlgren SC., Levine JD. 1994. Protein kinase C inhibitors decrease hyperalgesia and C-fiber hyperexcitability in the streptozotocin-diabetic rat. *J Neurophysiol* 72: 684-692.
5. Alexi T., Hughes PE., Van Roon-Mom WM., Faull RL., Williams CE., Clark RG., Gluckman PD. 1999. The IGF-I amino-terminal tripeptide glycine-proline-glutamate (GPE) is neuroprotective to striatum in the quinolinic acid lesion animal model of Huntington's disease. *Exp Neurol* 59. 84-97.
6. Altman L. 1992. Programmed cell death: the paths to suicide. *Trends Neurosci* 15: 278-280.
7. Amaducci MS., Garaschuk O., Thoenen H., Konnerth A., Meyer M. 1997. Ataxia and altered dendritic calcium signalling in mice carrying a targeted null mutation of the calbindin D 28 k gene. *Proc Natl acad Sci U.S.A.* 94: 1488-1493.
8. Andersson LL., Edwall D., Ordest G., Rozell B., Skottner A., Hanson HA. 1998. Differing expression of insulin-like growth factor I in the developing and in the adult rat cerebellum. *Acta Physiol Scand* 132: 167-173.
9. Araujo DM., Lapchak PA., Collier B., Chabot JG., Quirion. 1989. Insulin-like growth factor-I (somatomedin-C) receptors in the rat brain: distribution and interaction with hippocamp cholinergic system. *Brain Res.* 484:130-138.
10. Assender J.W., Kontny E., Fredholm B.B. 1994. Expression of protein kinase C isoforms in smooth muscle cells in various states of differentiation. *FEBS Lett* 342: 76-80.
11. Avruch, J. 1998. Insulin signal transduction through protein kinase cascades. *Mol. Cell Biochem.* 182:31-48.

12. Azcoitia I., Sierra A., García-Segura LM. 1999. Neuroprotective effects of estradiol in the adult rat hippocampus: interaction with insulin-like growth factor-I. *J Neurosci Res* 58: 815-822.
13. Azzopardi D., Wyatt J S., Cady EB., Delpy DT., Baubin J., Stewart AL., Hope PL., Hamilton PA., Reynolds EO. 1989. Prognosis of newborn infants with hypoxic-ischemic brain injury assessed by phosphorus magnetic resonance spectroscopy. *Pediatr Res* 25: 445-451.
14. Back T. 1998. Pathophysiology of the ischemic penumbra-revision of a concept. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 18: 621-638
15. Backer J-M., Myers M.G. jr. Shoelson S.E. 1992. Phosphatidylinositol 3'kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. *EMBO J.* 11. 3469-3479.
16. Baeuerle EL., Baltimore D. NF-kappa B: ten years after. 1996. *Cell* 87: 13-20.
17. Bai M.Z., Pollman M.J., Inishi Y., Gibbons G.H. 1999. Regulation of vascular smooth muscle cell apoptosis. Modulation of bad by phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *Circ Res* 85:229-237.
18. Bandrowski AE., Ashe JH., Crawford CA. 2001. Tetanic stimulation and metabotropic glutamate receptor agonists modify synaptic responses and protein kinase activity in rat auditory cortex. *Brain Res* 894: 218-232.
19. Bandyopadhyay G., Standaert M., Kikkawa U., Ono Y., Moscat J., Farese RV. 1999. Effects of transiently expressed atypical (zeta, lambda), conventional (alpha, beta) and novel (delta, epsilon) protein kinase C isoforms on insulin-stimulated translocation of epitope-tagged GLUT4 glucose transporters in rat adipocytes: specific interchangeable effects of protein kinases C-zeta and C-lambda. *Biochem J.* 337: 461-470.
20. Bar R.S., Boes, M., Clemmons, D.R., Busby, W.H., Sandra, A., Dake, B.L., Booth, B.A. 1990. Insulin differentially alters transcapillary movement of intravascular IGFBP-1, IGFBP-2 and endothelial cell IGF binding proteins in rat heart. *Endocrinology* 127:497-99.
21. Barlett W. P., Li X. S.; Williams M., Benkovic S. 1991. Localization of insulin-like growth factor I mRNA in murine central nervous system during postnatal development. *Dev Biol* 147:239-250.
22. Barthel A., Nakatani K., Dandekar AA., Roth RA. 1998. Protein kinase C modulates the insulin-stimulated increase in Akt1 and Akt3 activity in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 243: 509-513.

23. Baskin D.G., Wilcox B.J., Figlewicz D.P., Dorsa D.M. 1988. Insulin and insulin-like growth factors in the CNS. *Trends Neurosci* 11:608-612.
24. Battaini F. 2001. Protein kinase C isoforms as therapeutic targets in nervous system disease states. *Pharmacol Res* 44: 353-361.
25. Baxter R.C., Martin J.L. 1986. Radioimmunoassay of growth-hormone-dependent insulin-like growth factor binding in human plasma. *J Clin Invest* 78:1504-1512.
26. Beal M.F. 1992. Mechanisms of excitotoxicity in neurologic diseases. *FASEB j.* 6. 3338-3344.
27. Beaver C.J., Fischer Q.S., Daw N.W. 2001. Cyclic AMP-dependent protein kinase mediates ocular dominance shifts in cat visual cortex. *Nat Neurosci* 4: 159-163.
28. Beck K.D., Powell-Braxton L., Widmer H.R., Valverde J., Hefti F. 1995. IGFI gene disruption results in reduced brain size, CNS hypomyelination, and loss of hippocampal granule and striatal parvalbumin-containing neurons. *Neuron* 14: 717-730.
29. Bednar M.M., Kohut J.J., Kimelberg H.K., Gross J.J., Gross C.E. 1992. In vitro evidence supporting two mechanisms of action for the anion transport inhibitor L-611,711 in cerebral ischemia. *Neurol res* 14:53-56.
30. Beilharz E.J., Russo V.C., Butler G., Baker N.L., Connor B., Sirimanne E.S., Dragunow M., Werther G.A., Gluckman P.D., Williams C.E., Scheepens A. 1998. Co-ordinated and cellular specific induction of the components of the IGF/IGFBP axis in the rat brain following hypoxic-ischemic injury. *Mol Brain Res* 59: 119-134.
31. Beilharz E.J., Klempt N.D., Klempt M., Sirimanne M., Dragunow M., Gluckman P.D. 1993. Differential expression of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP) 4 and 5 mRNA in the rat brain after transient hypoxic-ischemic injury. *Mol Brain Res* 18:209-215.
32. Belayeb L., Alonso O.F., Busto R., Zhao W., Ginsberg M. D. 1996. Occlusion in the rat by intraluminal suture. *Stroke*;27: 1616-1623.
33. Benveniste H. 1991. The excitotoxin hypothesis in relation to cerebral ischemia. *Cerebrovasc Brain Metb Rev* 3: 213-220.
34. Berg M., Brunh FF., Johansen F., Diemer N.H. 1993. Kainic acid induced seizures and brain damage in the rat: different effects of NMDA and AMPA receptors antagonists. *Pharmacol Toxicol* 73: 262-268.

35. Bergstedt K., Wieloch T. 1993. Changes in insulin-like growth factor 1 receptor density after transient cerebral ischemia in the rat: lack of protection against ischemic brain damage following injection of insulin-like growth factor 1. *J Cereb Blood Flow Metab* 13: 895-898.
36. Berlove D., Caday C., Moskowitz M., Finklestein S. 1991. Basal fibroblast growth factor (bFGF) protects against ischemic neuronal death in vivo. *Soc Neurosci Abstr* 17: 1267.
37. Bessho Y., Nawa H., Nakanishi S. 1994. Selective up-regulation of an NMDA receptor subunit mRNA in cultured cerebellar granule cells by K(+)-induced depolarization and NMDA treatment. *Neuron* 12: 87-95.
38. Bettler, B. and Mülle, C. 1995. Review: neurotransmitter receptors. II. AMPA and kainate receptors. *Neuropharmacology* 34:123-139.
39. Bezzi P., Carmignoto G., Pasti L., Vesce S., Rossi D., Rizzini BL., Pozzan T., Volterra A. 1998. Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature* 391: 281-285.
40. Bezzi P., Domercq M, Brambilla L, Galli R, Schols D, De Clercq E, Vescovi A, Bagetta G, Kollias G, Meldolesi J, Volterra A. 2001. CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNF α : Amplification by microglia triggers neurotoxicity. *Nature Neurosci*, 4:702-710.
41. Birchall AM., Bishop J., Bradshaw D., Cline A., Coffey J., Elliott LH., Gibson VM., Greenham A., Hallam TJ., Harris W. 1994. Ro 32-0432, a selective and orally active inhibitor of protein kinase C prevents T-cell activation. *J Pharmacol Exp Ther* 268: 922-929.
42. Birren S.J., anderson D.J. 1990. A v-myc-immortalized sympathoadrenal progenitor cell line in which neuronal differentiation is initiated by FGF but not NGF. *Neuron* 4:189-201.
43. Blass J.P., Sheu R.K., Gibson G.E. 2000. Inherent abnormalities in energy metabolism in Alzheimer disease. Interactions with cerebrovascular compromise. *Ann N Y Acad Sci* 692: 33-43.
44. Bondy C. A., 1991. Transient IGF-I gene expression during the maturation of functionally related central projection neurons. *J Neurosci* 11: 3442-3455.
45. Bondy C. A., Lee W. H. 1993. Correlation between insulin-like growth factor (IGF)-binding protein 5 and IGF-I gene expression during brain development. *J Neurosci* 13:5092-5104.

46. Bondy C. A., Werner G. A., LeRoith D. 1992. cellular pattern of type I insulin-like growth factor receptor gene expression during maturation of the rat brain: comparison with insulin-like growth factors I and II. *Neuroscience* 46: 909-923.
47. Bondy C.A., Werner H., Roberts C.T., Le Roith D. 1990. Cellular patten of insulin-like growth factor-1 (IGF-I) and type I IGF receptor gene expression in early organogenesis: comparison with IGF-II gene expression. *Mol Endocrinol* 4:1386-1398.
48. Bozycko-Coyne D., Glicksman M. A., Prantner J. E., McKenna B., Connors T., Friedman C., Dasgupta M. Neff NT. 1993. IGF-I supports the survival and/or differentiation of multiple types of central nervous system neurons. *Ann N Y Acad Sci.* Aug 27;692:311-3.
49. Brandoli C., Sanna A., DeBernardi M. A., Follesa P., brooker G., Micchetti I. 1998. Brain-derived neurotrophic factor and basic fibroblast growth factor downregulate NMDA receptor function in cerebellar granule cells. *J Neurosci.* Oct 1;18(19):7953-61.
50. Breese CR., D'Costa A., Rollins YD., Adams C., Booze RM., Sonntag WE., Leonard S. 1996. Expression of insulin-like growth factor-1 (IGF-I) and IGF-binding protein (IGF-BP2) in the hippocampus following cytotoxic lesion of the dentate gyrus. *J Comp Neurol* 369: 388-404.
51. Brunet A., Bonni A., Zigmond M.J. 1999. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96:857-868.
52. Buchner K., Adamee E., Beerman ML., Nixon RA. 1999. Isoform specific translocation of Protein Kinase C following glutamate administration in primary hippocampal neurons. *Brain Res Mol Brain Res* 64: 222-235.
53. Bulleit RF., Cui H. 1998. Methylmercury antagonizes the survival-promoting activity of insulin-like growth factor on developing cerebellar granule neurons. *Toxicol Appl Pharmacol* 153: 161-168.
54. Cacace A.M., Guadagno S.N., Krauss R.S., Fabbro D., Weinstein I.B. 1993. The epsilon isoform of protein kinase C is an oncogene when overexpressed in rat fibroblasts. *Oncogene* 8: 2095-2104.
55. Calabresi P., Saulle E., Marfia GA., Centonze D., Mulloy R., Picconi B., Hipskind RA., Conquet F., Bernandi G. 2001. Activation of metabotropic glutamate receptor subtype 1/protein kinase C/mitogen-activated protein kinase pathway is required for postischemic long-term potentiation in the striatum. *Mol Pharmacol* 60: 808-815.

56. Calingasan N.Y., Gibson G.E. 2000. Dietary restriction attenuates the neuronal loss, induction of heme oxygenase-I and blood-brain barrier breakdown induced by impaired oxidative metabolism. *Brain Res* 885: 62-69.
57. Calissano P., Ciotti M.P., Battistini L., Zona C., Angelini A., Merlo D., Mercanti D. 1993. Recombinant human insulin-like growth factor I exerts a trophic action and confers glutamate sensitivity on glutamate-resistant cerebellar granule cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 90:8752-8756.
58. Carafoli, E. 1987. Intracellular calcium homeostasis. *Annu Rev Biochem.*;56:395-433.
59. Carro E., Nuñez A., Busuguina S., Torres-Alemán I. 2000. Circulating insulin-like growth factor-I mediates effects of exercise on the brain. *J Neurosci* 20: 2926-2933.
60. Carro E., Trejo J.L, Busuguina S., Torres-Alemán I. 2001. Circulating insulin-like growth factor I mediates protective effects of physical exercise against brain insults of different etiology and anatomy. *J Neurosci* 21: 5678-5684.
61. Castro-Alamancos M.A., Torres-Alemán I. 1993. Long-term depression of glutamate-induced gamma amino butyric acid release in cerebellum by insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad sci U.S.A.* 90:7386-7390.
62. Castro-Alamancos M.A., Torres-Alemán I. 1994. Blockade of eyeblink conditioned responses by antisense oligonucleotide of insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad sci U.S.A.* 91.10,203-10,207.
63. Cenni V., Doppler H., Sonnenburg ED., Maraldi N., Newton A.C., Toker A. 2002. Regulation of novel protein kinase C epsilon by phosphorylation. *Biochem J* 363: 537-545.
64. Cheng B., Mattson M. 1991. NGF and bFGF protect rat hippocampal and human cortical neurons against hypoglycemic damage by stabilizing calcium homeostasis. *Neuron* 7: 1031-1041.
65. Cheng B., Mattson M. 1992. IGF-I and IGF-II protect cultured hippocampal and septal neurons against calcium-mediated hypoglycemic damage. *J Neurosci* 12: 1558-1566.
66. Cobb M.H., Goldsmith E.J. 1995. How Map kinase are regulated. *J Biol Chem* 270: 14843-14846.
67. Choi DW. 1985. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. *Neurosci Lett* 58: 293-297.
68. Choi DW. 1987. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci* 7: 369-379.

69. Choi DW. 1988. Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci* 11: 465-469.
70. Choi DW. 1995. Calcium: still centre-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *Trends Neurosci* 18: 58-60.
71. Combettes-Souverain M., Issad T., 1998. Molecular basis of insulin action. *Diabetes Metab* 24: 477-489.
72. Connor B., Dragunow M. 1998. The role of growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain. *Brain Res Rev* 27: 1-39.
73. Conover C.A., Rosenfeld R.G., Hintz R.L. 1989. Serum glucocorticoids have persistent and controlling effects on insulin-like growth factor I action under serum-free assay conditions in cultured human fibroblasts *in vivo*. *Cell dev. Biol* 25: 521-527.
74. Cox JA., Felder CC., Henneberry RC. 1990. Differential expression of excitatory amino acid receptor subtypes in cultured cerebellar neurons. *Neuron* 4:941-942.
75. Cross D.A., Alassi D.R., Vandenheere J.R., McDowell H.E., Hundal H.S., Cohen P. 1994. The inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin or Insulin-like growth factor in the rat skeletal muscle cell line L6 blocked by wortmannin, but not by rapamycin: evidence that wortmannin blocks activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in L6 between Ras and Raf. *Biochem J.* 303:21-26.
76. Cross T.G., Schell-Toellner D., Henriquez N.V., Deacon E., Salmon M., Lord J.M. 2000. Serine/threonine protein kinases and apoptosis. *Exp Cell Res* 256: 34-41.
77. Chalecka-Franaszek E., Chuang DM. 1999. Lithium activates the serine/threonine kinase Akt-1 and suppresses glutamate-induced inhibition of Akt-1 activity in neurons. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 96: 8745-8750.
78. Chen L, Huang, L-Y. M. 1992. Protein kinase C reduces Mg^{2+} block of NMDA-receptor channels as a mechanism of modulation. *Nature* 356; 521-523.
79. Cheng B, Mattson MP. Glucose deprivation elicits neurofibrillary tangle-like antigenic changes in hippocampal neurons: prevention by NGF and bFGF. *Exp Neurol.* 1992 Aug;117(2):114-23.
80. Cheng B., Mattson M.P. 1992. IGF-I and IGF-II protect cultured hippocampal and septal neurons against calcium-mediated hypoglycemic damage. *J Neurosci* 12: 1558-1566.

81. Chin J.E., Lui F., Roth R.A. 1994. Activation of protein kinase C alpha inhibits insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1. *Mol endocrinol.* 8: 51-58.
82. Choi D., Rothman S.M. 1990. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Ann Rev Neurosci.* 13:171-182.
83. Choi D.W. 1987. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity and cortical cell culture. *J Neurosci* 7, 369-379.
84. Choi D. 1988. Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci* 11, 465-469.
85. Chrysis D., Calikoglu A.S., Ye P., D'Ercole A.J. 2001. Insulin-like growth factor-I overexpression attenuates cerebellar apoptosis by altering the expression of Bcl family proteins in developmentally specific manner. *J Neurosci* 21: 1481-1489.
86. D'Ercole Aj., Ye P., Calikoglu AS., Gutierrez-Ospina G. 1996. The role of the insulin-like growth factors in the central nervous system. *Mol Neurobiol* 13:227-255.
87. D'Mello SR., Borodezt K., Soltoff SP. 1997. Insulin-like growth factor and potassium depolarization maintain neuronal survival by distinct pathways: possible involvement of PI-3-kinase in IGF-I signalling. *J Neurosci* 17: 1548-1560.
88. D'Mello SR., Galli C., Ciotti T., Calissano P. 1993. Induction of apoptosis in cerebellar granule neurons by low potassium: inhibition of death by insulin-like growth factor I and cAMP. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 90: 10989-10993.
89. Danielsen AG., Liu F., Hosomi Y., Shii K., Roth RA. 1995. Activation of protein kinase C alpha inhibits signaling by members of the insulin receptor family. *J Biol Chem* 270: 21600-21605.
90. Datta SR., Dudek H., Tao X., Masters S., Fu H., Gotoh Y., Greenberg ME. 1997. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91: 231-241.
91. Daughaday W.H., Rotwein P. 1989. Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and genes structures, serum, and tissue concentrations. *Endocr Rev.* 10:68-91.
92. Davies A. M. 1994 The role of neurotrophins in the developing nervous system.. *J. Neurobiol.* 25, 1334-1348.
93. Davies A.M. 1994. Switching neurotrophin dependence. *Curr Biol.* 4:273-276.

94. De Fea K., Roth RA. 1997. Protein kinase C modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation requires serine 612. *J Biochemistry* 36: 12939-12947.
95. De Fea K., Roth RA. 1997. Modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation and function by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 272: 31400-31406.
96. De Fea K., Roth RA. 1997. Protein kinase C modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation requires serine 612. *Biochemistry* 36:12939-12947.
97. De Pablo F., de la Rosa E.J. 1995 The developing CNS: a scenario for the action of proinsulin, insulin and insulin-like growth factors. *Trends Neurosci.* 18:143-150.
98. Dekker L.V., Parker P.J. 1994. Protein kinase C a question of specificity. *Trends Biochem Sci.* 19: 73-77.
99. Dempsey E.C., Newton A.C., Mochly-Rosen D., Fields A.P., Reyland M.E., Insel P.A., Messing R.O. 2000. Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am J Physiol* 279, L429-L438.
100. Dews M., Prisco M., Peruzzi F., Romano G., Morrione A., Baserga R. 2000 Domains of the insulin-like growth factor I receptor required for the activation of extracellular signal-regulated kinases. *Endocrinology* 141:1289-1300.
101. Diamond I., Wrubel B., Estrin W., Gordon A. 1987. Basal and adenosine receptor-stimulated levels of cAMP are reduced in lymphocytes from alcoholic patients. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 84: 1413-1416.
102. Dina OA., Barletta J., Chen X., Mutero A., Martin A., Messing RO., Levine JD. 2000. Key role for the epsilon isoform of protein kinase C in painful alcoholic neuropathy in the rat. *J Neurosci.* 15: 8614-8619.
103. Domanska-Janik J. 1996. Protein serine/threonine kinase (PKA, PKC, CaMKII) involved in ischemic brain pathology. *Acta Neurobiol Exp (Warsz)* 56: 579-585.
104. Dore S, Kar S, Quirion R. 1997. Insulin-like growth factor I protects and rescues hippocampal neurons against beta-amyloid and human amylin-induced toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 4772-4777.
105. Dore S., Kar S., Quirion R. 1997. Rediscovering an old friend, IGF-I: potential use in the treatment of neurodegenerative diseases *Trends. Neurosci* 20: 326-331.
106. Dragunow M., Prston k. 1995. The role of inducible transcription factors in apoptotic nerve cell death. *Brain Res Rev* 21: 1-28.

107. Drejer J., Benveniste IJ., Diemer X., Schouboe. 1985. Cellular origin of ischemia-induced glutamate release from brain tissue in vivo and in vitro .J Neurochem. 45: 145-151.
108. Drop S.I., Schuller A.G., Linderbergh-Kortleve D.J., Groffen C., Brinkman A., Zwarthoff E.C. 1992. Structural aspects of the IGFBP family. *Growth Regul* 2:69-79.
109. Dudek H., Datta SR., Franke TF., Birnbaum RY., Cooper GM., Segal RA., Kaplan DR., Greenberg ME. 1997. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* 275: 661-664.
110. Dutil E.M., Toker A., Newton A.C. 1998. Regulation of conventional protein kinase C isozymes by phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK-1). *Curr Biol* 8:1366-1375.
111. Eldar-Finkelman H., Krebs E.G. 1997. Phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by glycogen synthase kinase 3 impairs insulin action. *Prog. Natl Acad Sci U.S.A.* 94: 9660-9664.
112. Fahrmann M., Kaufhold M., Reig T., seidler U., 2002. Different actions of protein kinase C isoforms alpha and epsilon on gastric acid secretion. *Br J Pharmacol* 136: 938-946.
113. Favaron M., Manev H., Siman R., Bertolino M., Szekely AM., DeErasquin G., Guidotti A., Costa E. 1990. Down-regulation of protein kinase C protects cerebellar granule neurons in primary culture from glutamate-induced neuronal death. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:1983-1987.
114. Favaron M., Manev H., Alho H., Bertolino M., Ferret B., Guidotti A., Costa E. 1988. Gangliosides prevent glutamate and kainate neurotoxicity in primary neuronal cultures of neonatal rat cerebellum and cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85, 7351-7355.
115. Feinstein R., Kanety H., Papa M.Z., Lunenfeld B., Karasik A. 1993. Tumor necrosis factor- α suppresses phosphorylation of insulin receptor and its substrates. *J Biol Chem* 268, 35: 26055-26058.
116. Feldman EL., Sullivan KA., Kim B., Russell JW. 1997. Insulin-like growth factors regulate neuronal differentiation and survival. *Neurobiol Dis* 4: 201-214.
117. Fernandez AM, Gonzalez de la Vega A, Torres-Aleman I 1998. Insulin-like growth factor I restores motor coordination in a rat model of cerebellar ataxia. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 95: 1253-1258.

118. Fernandez AM., Gonzalez de la Vega A., Planas B., Torres-Alemán I. 1999. Neuroprotective actions of peripherally administered insulin-like growth factor-I in injured olivo-cerebellar pathway. *Eur J Neurosci* 11: 2019-2030.
119. Fernandez-Galaz MC., Morschl E., Chowen JA., Torres-Aleman I., Naftolin F., Garcia-Segura LM. 1997. Role of astroglia and insulin-like growth factor-I in gonadal hormone-dependent synaptic plasticity. *Brain Res Bull.* 44(4):525-31. Review.
120. Flavaron M, Manev H, Siman. R, Bertolino. M, Szekeley A. M, DeErasquin G. 1990. Down-regulation of protein kinase C protects cerebellar granule neurons in primary culture from glutamate-induced neuronal death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 1983-1987.
121. Fordyce D.E., Farrar R.P. 1991. Enhancement of spatial learning in F344 rats by physical activity and related learning-associated alterations in hippocampal and cortical cholinergic functions. *Behav Brain Res* 46: 123-133.
122. Fryer H.J.L., Wolf D.H., Knox R.J., Strittmatter S.M., Pennica D., O'Leary R.M., Russell D.S., Kalb R.G. 2000. Brain-derived neurotrophic factor induces excitotoxic sensitivity in cultured embryonic rat spinal motor neurons through activation of phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J. Neurochem.* 74: 582-595.
123. Galli C., Meucci O., Scoziello A., Werge TM., Calissano P., Schettini G. 1995. Apoptosis in cerebellar granule cells is blocked by high KCl, forskolin and IGF-I through distinct mechanisms of action: the involvement of intracellular calcium and RNA synthesis. *J Neurosci* 15: 1172-1179.
124. Gammeltoft S., Haselbacher G.K., Humbel R.E., Fehlmann M., Von Obberghen E. 1985. Two types of receptor for insulin-like growth factors in mammalian brain. *EMBO J.* 4:3407-3412.
125. García-Estrada J., García-Segura LM., Torres-Alemán I. 1992. Expression of insulin-like growth factor-I by astrocytes in response to injury. *Brain Res* 592: 343-347.
126. García-Segura L. M., Pérez J., Pons S., Rejas M. T., Torres-Alemán I.; 1991. Localization of insulin-like growth factor I (IGF-I) immunoreactivity in the brain. *Brain Res* 560: 167-174.
127. Ghayur T., Hugunin M., Talanian R.V., Ratnofsky S., Quinlan C., Emoto Y. Pandey P., Datta R., Huang Y., Kharbanda S., Allen H., Kamen R., Wong W., Kufe D. 1996. Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE/CED 3-like protease induces characteristics of apoptosis. *J Expec Med* 184: 2399-2404.

128. Gilman SC., Bonner MJ., Pellmar TC. 1994. Free radicals enhance basal release of D-[³H] aspartate from cerebral cortical synaptosomes. *J Neurochem* 62: 1757-1763.
129. Giulio AM., Germani E., Lesma E., Muller E., Gorio A. 2000. Glycosaminoglycans co-administration enhance insulin-like growth factor-I neuroprotective and neurodegenerative activity in traumatic and genetic models of motor neuron disease: a review, *int J Dev Neurosci* 18: 339-346.
130. Gluckman P., Klempt N., Guan J., Mallard C., Sirimanne E., Dragunow M., Klempt M., Singh K., Williams C., Nikolics K. 1992. A role for IGF-I in the rescue of CNS neurons following hypoxic-ischemic injury. *Biochem Biophys Res Commun* 182: 593-599.
131. Gonzalez de la Vega A., 1998 *Soc Neurosci Abs* 24, 1784.
132. Gonzalez de la Vega A., Buño W., Pons S., García Calderat MS., García-Galloway E., Torres-Alemán I. 2001. Insulin-like growth factor I potentiates kainate receptors through a phosphatidylinositol 3-kinase dependent pathway. *Neuroreport* 12. May 8;12(6):1293-6.
133. Gordon AS., Yao L., Wu ZL., Coe IR., Diamond I. 1997. Ethanol alters the subcellular localization of delta and epsilon protein kinases C NG 105-15 cells. *Mol Pharmacol* 52: 554-559.
134. Guan J., Williams CE., Skinner SJ., Mallard EC., Gluckman PD. 1996. The effects of insulin-like growth factor (IGF)-1, IGF-2, and des-IGF-1 on neural loss after hypoxic-ischemic brain injury in adult rats: evidence for a role for IGF binding proteins. *Endocrinology* 137: 893-898.
135. Guan J., Krishnamurthi R., Waldvogel HJ., Faull RL., Clark R., Gluckman PD. 2000. N-terminal tripeptide of IGF-I (GPE) prevent loss of TH positive neurons after 6-OHDA induced nigral lesion in rats. *Brain Res* 859: 286-292.
136. Guan J., Gunn AJ., Sirimanne ES., Tuffin J., Gunning R., Clark R., Gluckman PD. 2000. The window of opportunity for neuronal rescue with insulin-like growth factor-1 after hypoxia-ischemia in rats is critically modulated by cerebral temperature during recovery. *J Cereb Blood Flow Metab* 20: 513-519.
137. Guan J., Williams CE., Gunning M., Mallard EC., Gluckman PD. 1993. The effects of IGF-1 treatment after hypoxic-ischemic brain injury in adult rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 13: 609-616.

138. Guglielmotti F., Rattray M., Baldessari S., Butelli E., Samanin R., Bendotti C. 1997. Selective up-regulation of protein kinase C epsilon in granule cells after kainic acid induced seizures in rat. *Brain Res Mol Brain Res* 49: 188-196.
139. Gunn-Moore F. J., Tavaré J. M. 1998. Apoptosis of cerebellar granule cells induced by serum withdrawal, glutamate or β -amyloid, is independent of jun kinase or p38 mitogen activated protein kinase activation. *Neurosci Lett* 250: 53-56.
140. Hall K., Takano K., Fryklund L., Sievertsson H. 1975. The measurement of somatomedin A by radioreceptor assay. *Somatomedins. Adv Metab Disord* 8: 19-46.
141. Hassinger TD., Atkinson PB., Strecker GJ., Whalen LR., Dudek FE., Kossel AH., Kater SB. 1995. Evidence for glutamate-mediated activation of hippocampal neurons by glial calcium waves. *J Neurobiol* 28:159-170.
142. Heck S., Lezoualc'h F., engert S., Behl C. 1999. Insulin-like growth factor-I-mediated neuroprotection against oxidative stress is associated with activation of nuclear factor kappaB. *J Biol Chem* 274: 9828-9835.
143. Hoek JB., Rubin R., Thomas AP. 1988. Etanol-induced phospholipase C activation is inhibited by phorbol esters in isolated hepatocytes. *Biochem J* 251: 865-871.
144. Hoek JB., Thomas AP., Rooney TA., Higashi K., Rubin R.1992. Ethanol and signal transduction in the liver. *FASEB J* 6: 2386-2396.
145. Hoffman PL., Valverius P., Kwast M., Tabakoff B. 1987. Comparision of the effects of ethanol on beta-adrenergic receptors in heart and brain. *Alcohol alcohol [suppl]* 1: 749-754.
146. Hotamisligil G., Peraldi P., Budavanri A., Ellis R., White M.F., Spiegelman B. 1996. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science* 271:665-668.
147. Huang LQ., Rowan MJ., Anwyl R. 1999. Role of protein kinases A and C in the induction of mGluR-dependent long-term depression in the medial perforant path of the rat dentate gyrus in vitro. *Neurosci Lett* 274: 71-74.
148. Hug H., Sarre T.F. 1993. Protein kinase C enzymes: divergence in signal transduction? *Biochem J.* 291: 329-343.
149. Hwang JJ, Choi SY, Koh JY. 2002. The role of NADPH oxidase, neuronal nitric oxide synthase and poly(ADP ribose) polymerase in oxidative neuronal death induced in cortical cultures by brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-4/5. *J Neurochem.* Aug;82(4):894-902

150. Aldeacoa C. 1999. Mechanisms of cerebral ischemic damage cerebral ischemia. *Molecular and Cellular Pathophysiology*,3-32.
151. Le Mmerrer J., Nogues X. 2000. Cognitive neuropsychology: new perspectives for pharmacology of cognition. *Pharmacol Res* 41: 503-514.
152. Ikeda Y., Olsen GS., Ziv E., Hansen LL., Busch AK., Hansen BF., Shafir E., Mosthaf-Seedorf L. 2001. Cellular mechanism of nutritionally induced insulin resistance in *Psammomys Obesus*. *Diabetes* 50: 584-592.
153. Jacobson M.D., Weil M., Raff M.C. 1997. Programmed cell death in animal development. *Cell* 88: 347-354.
154. Jain S., Golde D. W., Bailey R., Geffner M. E. 1998. Insulin-like growth factor I resistance. *Endocrine Reviews* 19(5): 626-646.
155. Jaken S. 1996. Protein kinase C isoenzymes and substrates. *Curr Opin Cell Biol.* 8: 168-173.
156. Jin LW., Saitoh T. 1996. Changes in protein kinases in brain aging and Alzheimer's disease. *Drugs Aging* 6: 136-149.
157. Johnston BM., Mallard EC., Williams CE., Gluckman PD. 1996. Insulin-like growth factor-1 in a potent neuronal rescue agent after hypoxic-ischemic injury in fetal lambs. *J Clin Invest* 2: 300-308.
158. Jones J. L., Clemmons D. R. 1995. Insulin-like growth factors and their binding proteins. Biological actions. *Endocr Rev* 16:3-34.
159. Jones, J.I., Gockerman A., Busby W.H., Camacho-Hubner C., Clemmons D.R. 1993^a. Extracellular matrix contains insulin-like growth factor binding protein-5: potentiators of the effects of IGF-I. *J. Cell. Biol.* (1993a) 121:679-687.
160. Jones JI., Gockerman A., Busby WH., Wright G., Clemmons DR. 1993. Insulin-like growth factor binding protein 1 stimulates cell migration and binds to the 5-beta-1 integrin by means of its Arg-Gly-Asp sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:10553-57.
161. Kaasinen SK., Goldsteins G., Alhonen L., Jänne J., Koistinaho J. 2002. Induction and activation of protein kinase C δ in hippocampus and cortex after kainic acid treatment. *Exp Neurobiol* 176: 203-212.

162. Kanety H., Feinstein R., Papa M., Hemi R., Karasik A. 1995. Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1). Possible mechanism for suppression of insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1. *J Biol Chem* 270: 23780-23784.
163. Kapeller R., Cantley L.C. 1994. Phosphatidylinositol 3-kinase. *Bio Essays* 16: 565-576.
164. Kar S., Chabot J.G., Quirion R. 1993. Quantitative autoradiographic localization of [125] insulin-like growth factor I, [125] insulin-like growth factor II, and [125] insulin receptor binding sites in developing and adult brain. *J Comp Neurol* 333: 375-397.
165. Kar S., Quirion R., Parent A. 1994. An interaction between inositol hexakisphosphate (IP6) and insulin-like growth factor II receptor binding sites in the rat brain. *Neuroreport* 5: 625-628.
166. Kar S., Seto S., Dore J.G., Chabot R., Quirion R. 1997. Systemic administration of kainic acid induces selective time dependent decrease in [125]insulin-like growth factor I, [125]insulin-like growth factor II and [125]insulin receptor binding sites in adult rat hippocampal formation. *Neuroscience* 80: 1041-1055.
167. Katchman A., Hershkowitz X. 1993. Early anoxia-induced vesicular glutamate release results from mobilization of calcium from intracellular stores. *J Neurophysiol* 70:1-7.
168. Kato K., Puttfarcken P.S., Lyons W.E., Coyle J.T. 1991. Developmental time course and ionic dependence of kainate-mediated toxicity in rat cerebellar granule cell cultures. *J Pharmacol Exp Ther* 256: 402-411.
169. Kazanietz M.G., Bustelo X.R., Barbacid M., Kolch W., Mischak H., Wong G., Pettit G.R., Bruns J.D., Blumberg P.M. 1994. Zinc finger domains and phorbol ester pharmacophore. Analysis of binding to mutated form of protein kinase C zeta and the vav and c-raf proto-oncogene products. *J Biol Chem* 269:11590-11594.
170. Kellerer M., Mushak J., Mischak H., Häring H.U. 1997. Protein kinase C (PKC) epsilon enhances the inhibitory effect of TNF alpha on insulin signaling in HEK293 cells. *FEBS Lett* 418: 119-122.
171. Kellerer M., Mushak J., Seffer E., Mischak H., Ullrich A., Häring H.U. 1998. Protein kinase C isoforms α , δ and θ require insulin receptor substrate-1 to inhibit the tyrosine kinase activity of the insulin receptor in human kidney embryonic cells (HEK 293 cells). *Diabetologia* 41: 833-838.

172. Khasar SG., Lin YH., Martin A., Dadgar J., McMahon T., Wang D., Hundle B., Aley KO., Isenberg W., McCarter G., Green PG., Hodge CW., Levine JD., Messing RO. 1999. A novel nociceptor signalling pathway revealed in protein kinase C epsilon mutant mice. *Neuron* 24: 253- 260.
173. Kim B., Cheng H.L., Margolis B., Feldman E.L. 1998. Insulin receptor substrate 2 and Shc play different roles in insulin-like growth factor I signalling. *J Biol Chem* 273: 34543-34550.
174. Klocker N., Cellerino A., Bahr M. 1998. Free radical scavenging and inhibition of nitric oxide synthase potentiates the neurotrophic effects of brain-derived neurotrophic factor on axotomized retinal ganglion cells In vivo. *J Neurosci.* Feb 1;18(3):1038-46.
175. Koh J., Gwang B. J., Lobner D., Choi D. W. 1995. Potentiated necrosis of cultured cortical neurons by neurotrophins. *Science.* Apr 28;268(5210):573-5.
176. Komoly S., Hudson L.D. Webster H.F. Bondy C.A. 1992. Insulin-like factor I gene expression is induced in astricytes during experimental demyelination. *Proc Nant Acad Sci. U.S.A.* 89:1894-1998.
177. Kops G.J., Burgering B.M. 2000. Forkhead transcription factors are targets of signalling by pro-oncogene PKB (C-ATK). *J Anat* 197 (Pt 4):571-574.
178. Kramer A.F., Hahn S., Cohen N.J., Banich M.T., McAuley E., Harrison C.R., Chanson J., Vakil E., Bardell L., Boileau R.A., Colcombe A. 1999. Ageing, fitness and neurocognitive funtions. *Nature* 400: 418-419.
179. Krupinski J., Slevin MA., Kumar P., Gaffney J., Kaluza J. 1998. Protein kinase C expression and activity in the human brain after ischemic stroke. *Acta Neurobiol Exp (Warsz)* 56: 579-585.
180. Lamson G., Giudice L., Rosenfeld R.G. 1991. Insulin-like growth factor binding proteins: structural and molecular relationships. *Growth Factors* 5:19-28.
181. Lan JY., Skeberdis VA., Jover T., Grooms SY., Lin Y., araneda RC., Zheng X., Bennett VL., Zukin RS. 2001. Protein kinase C modulates NMDA receptor trafficking and gating. *Nature Neurosci* 4: 382-390.
182. Lanius RA., Paddon HB., Mezei M., Wagey R., Krieger C., Pelech SL., Shaw CA. 1995. A role for amplified PKC activity in the pathogenesis of amyothrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 65: 927-30.

183. Lee C.H., Li W., Nishimura R., Zhou M., Batzer AG., Myers MG Jr., White MF., Schlessinger J., Skolnik EY. 1993. Nck associates with the SH2 domain docking proteins IRS-1 in insulin stimulated cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 90:111713-11717.
184. Lee WH., Clemens JA., Bondy CA. 1992 Insulin-like growth factors in response to cerebral ischemia. *Mol Cell Neurosci* 3: 36-43.
185. Lee W. H., Javedan S., Bondy C. A.; 1992. Coordinate expresión of insulin-like growth factor system components by neurons and neuro-glia during retinal and cerebellar development. *J Neurosci* 12:4737-4744.
186. Lee WH., Wang GM., Seaman LB., Vannucci SJ. 1996. Coordinate IGF-I and IGFBP5 gene expression in perinatal rat brain after hypoxia-ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 16: 227-236.
187. Lerma J., Morales M., VicenteM.A., HerrerasO. 1997. Glutamate receptors of the kainate type and synaptic transmission. *Trends Neurosci.* 20:9-12.
188. LeRoith D. 2000. Insulin-like growth factor I receptor signaling-overlapping or redundant pathways? *Endocrinology.* Apr;141(4):1287-8. Review..
189. LeRoith D., Párrizas M., Blakesley V.A. 1998. The insulin-like growth factor-I receptor and the central nervous system: mechanisms involved in the prevention of apoptosis. *GFs in the nervous system.* Springer.17-27.
190. LeRoith D., Werner H., Beitner-Johnson D., Roberts C.T. 1995. Molecular and cellular aspects of insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev* 16: 143-163.
191. Leski ML., Stacey LV., Jesse DB., Coyle JT. 2000. Insulin-like growth factor I prevents the development of sensitivity to kainate neurotoxicity in cerebellar granule cells. *J Neurochem* 75: 1548-1556.
192. Leski ML., Valentine SL., Baer JD., Coyle JT. 2000. Insulin-like growth factor I prevents the development of sensitivity to kainate neurotoxicity in cerebellar granule cells. *J Neurochem* 75: 1548-1556.
193. Lesniak M.A., Hill J.M., Kiess W., Rojeski M., Pert C.B., Roth J. 1988. Receptors for insulin-like growth factors I and II: autoradiographic localization in the rat brain and comparison to receptors of insulin. *Endocrinology.* 123: 2089-2099.
194. Levene MI., Kornberg J., Williams HC. 1985. The incidence and severity of post asphyxial encephalopathy in fullterm infants. *Early Hum Dev* 11: 21-28.

195. Leverrier Y., Thomas J., Mathieu A.I., Low W., Blanquier B., Marvel J. 1999. Role of PI3-kinase in Bcl-X induction and apoptosis inhibition mediated by IL-3 or IGF-I in Baf-3 cells. *Cell Death Differ* 6:290-296.
196. Lewis ME., Neff NT., Contreras PC., Stong DB., Oppenheim RW., Grebow PE., Vaught JL. 1993. Insulin-like growth factor-I: potential for treatment of motor neuronal disorders. *Exp Neurol* 124: 73-88.
197. Li J., De Fea K., Roth RA. 1999. Modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation by an Akt/phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Biol Chem* 274: 9351-9356.
198. Li L., Oppenheim R. W., Lei M., Houenou L. J. 1994. Neurotrophic agents prevent motoneuron death following sciatic nerve section in the neonatal mouse. *J Neurobiol.* Jul;25(7):759-66.
199. Li W., Yu J.C., Shin D.Y., Pierce J.H. 1995. Characterization of a protein kinase C-delta (PKC-delta) ATP binding mutant. An inactive enzyme that competitively inhibits wild type PKC-delta enzymatic activity. *J Biol Chem* 270: 8311-8318.
200. Liu YF., Paz K., Herschkovitz A., Alt A., Tennenbaum T., Sampson SR., Ohba M., Kuroki T., LeRoith D., Zick Y. 2001. Insulin stimulates PKC- ξ -mediated phosphorylation of insulin receptor substrate-1(IRS-1). *J Biol Chem.* 276: 14459-14465.
201. Longa E.Z., Weinstein P.R., Carlson S., Cummins R. 1989. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*; 20: 84-91.
202. Lovinger DM., Zhou Q. 1994. Alcohols potentiate ion current mediated by recombinant 5-HT₃RA receptors expressed in mammalian cell line. *Neuropharmacology* 33: 1567-1572.
203. Lucas D.R., Newhouse, J.P. 1957. The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *Arch Ophthalmol.* 58, 193-201.
204. MacDonald R.G. 1991. Manose-6-phosphate enhances crosslinking efficiency between insulin-like growth factor-II (IGF-II) and IGF-II/manose-6-phosphate receptors in membranes. *Endocrinology.* 128: 413-421.
205. Man YH., Lin JW., Ju WH., Ahmadian G., Liu L., Becker LE., Sheng M., Wang YT. 2000. Regulation of AMPA receptor-mediated synaptic transmission by clathrin-dependent receptor internalization. *Neuron* 25: 649-662.

206. Maher P. 2001. How PKC activation protects nerve cells from oxidative-stress-induced cell death. *J Neurosci* 21: 2929-2938.
207. Manev H., Favaron M., Guidotti A., Costa E. 1989. Delayed increase of Ca²⁺ influx elicited by glutamate: role in neuronal death. *Mol. Pharmacol.* 36, 106-112.
208. Marin P., Lafon-cazal M., Bockaert J. 1992. A Nitric Oxide Synthase Activity Selectively Stimulated by NMDA Receptors Depends on Protein Kinase C Activation in Mouse Striatal Neurons. *Eur J Neurosci* 4, 425-432.
209. Matsushima H., Shimohama S., Chachin M., Taniguchi T. 1996. Calcium-dependent and independent protein kinase C changes in the brains of patients with Alzheimer's disease. *J Neurochem* 67: 317-323.
210. Mattson M. P., Cheng B., and Smith-Swintosky V. L. 1993. Mechanisms of neurotrophic factor protection against calcium- and free radical-mediated excitotoxic injury: implications for treating neurodegenerative disorders. *Exp Neurol.* Nov;124(1):89-95.
211. Mattson MP., Cheng B. 1993. Growth factors protect neurons against excitotoxic/ischemic damage by stabilizing calcium homeostasis. *Stroke* 24: I136-I140.
212. Mattson MP., Murrain M., Guthrie PB., Kater SB. 1989. Fibroblast growth factor and glutamate: opposing roles in the generation and degeneration of hippocampal neuroarchitecture. *J Neurosci* 9: 3728-3740.
213. McCusker R.H., Campion D.R., Clemmons D.R. 1998. The ontogeny and regulation of a 31,000 molecular weight insulin-like growth factor-binding protein in fetal porcine plasma and sera. *Endocrinology* 129: 1201-1206.
214. McDonald J.W., Althomsons S.P., Hyrc. K.I., Choi D., Goldberg M.P. 1998. Oligodendrocytes from the forebrain are highly vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated excitotoxicity. *Nature med.* 4: 291-297.
215. McIntosh TK., Weiloch T. 1998. Novel pharmacologic strategies in the treatment of experimental traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 15: 731-769.
216. Messing RO., Petersen PJ., Henrich CJ. 1991. Chronic ethanol exposure increases levels of protein kinase C delta and epsilon and protein kinase C-mediated phosphorylation in cultured neural cells. *J Biol Chem* 266: 23428-23432.
217. Mev., H., Favaron M., Vicini S., Guidotti A., Costa. 1990. Glutamate-induced neuronal death in primary cultures of cerebellar granule cells: protection by synthetic derivatives of endogenous sphingolipids. *J Pharmacol Exp Ther.* Jan;252(1):419-27.

218. Meyer J.S., terayama Y., Konno S., Akiyama H., Margishvili G.M., Mortel K.F. 1998. Risk factors for cerebral degenerative changes and dementia. *Eur Neurol* 39`suppl 1: 7-16.
219. Michaelis E.K. .1998. Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Progress in Neurobiol* 54: 369-415.
220. Miller TM., Tansey MG., Johnson EM., Creedon DJ. 1997. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity blocks depolarization and insulin-like growth factor I-mediated survival of cerebeller granule cells. *J Biol Chem*. 272: 9847-9853
221. Mischak H., Goodnigth J., Kolch W., Martiny-Baron G., Schaechtle C., Kazanietz M.G.1993. Overexpression of protein kinase C-delta and -epsilon in NIH 3T3 cells induces opposite effects on growth, morphology, anchorage dependence, and tumorigenicity. *J Biol Chem* 268: 6090-6096.
222. Mischak H., Pierce J.H., Goodnigth J., Kazanietz M.G., Blumberg P.M., Mushinski J.F. 1993. Phorbol ester-induced myeloid differentiation is mediated by protein kinase C-alpha and -delta and not by protein kinase C-beta II, -epsilon, -zeta, and -eta. *J Biol Chem* 268: 20110-20115.
223. Molinari G.F., Laurent J.P. 1976. A classification of experimental madels of brain ischemia. *Stroke*, 7: 14-17.
224. Mori H. MishinaM. 1995. Structure and function of the NMDA receptor channel. *Neuropharmacology* 34:1219-1237.
225. Morrison M. E., Manson C. A. 1998. Granule neuron regulation of Purkinje cell development: striking a balance between neurotrophin and glutamate signaling. *J Neurosci*. May 15;18(10): 3563-73.
226. Mothe I., Van Obberghen E. 1996. Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on multiple serine residues 612, 632, 662, and 731, modulates insulin action. *J Biol Chem* 271: 11222-11227.
227. Motley ED., Kabir SM., Eguchi K., Hicks AL., Gardner CD., Reynolds CM., Frank GD., Eguchi S. 2001. Protein kinase C inhibits insulin-induced Akt activation in vascular smooth muscle cells. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 47: 1059-1062.

228. Muizelaar JP., Marmaroe A., Young HF., Choi SC., Wolf A., Schneider RK., Komos HA. 1993. Improving the outcome of severe head injury with the oxygen radical scavenger polyethylene glycol conjugated superoxide dismutase: a phase II trial. *J Neurosurg* 78: 375-382.
229. Musashi M., Ota S., Shiroshita N. 2000. The role of protein kinase C isoforms in cell proliferation and apoptosis. *Int J hematol* 72: 12-19.
230. Myers M.G., and White M.F. 1996. Insulin signal transduction IRS proteins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36: 615-658.
231. Myers MG., White MF. 1993. The new elements of insulin signaling. Insulin receptor substrate-1 and proteins with SH2 domains. *Diabetes* 42: 643-650.
232. Myers MG., White MF. 1996. Insulin signal transduction and the IRS proteins. *Annu Pharmacol Toxicol* 36: 615-658.
233. Nagasawa H., Kogure K. 1989. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 20: 1037-1043.
234. Nakayama M., Uchimura K., Zhu RL., Nagayama ME., Rose ME., Steller RA., Isakson PC., Chen J., Graham SH. 1998. Cyclooxygenase-2 inhibition prevents delayed death of CA1 hippocampal neurons following global ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 10954-10959.
235. Neff N. T., Prevetie D., Houenou L. J., Lewis M. E., Glicksman M. A., Yin Q. W., Oppenheim R. W. 1993. Insulin-like growth factors: putative muscle-derived trophic agents that promote motoneuron survival. *J Neurobiol.* Dec;24(12):1578-88.
236. Nishizuka Y. 1986. Studies and perspectives of protein kinase C. *Curr Opin Cell Biol* 9: 161-167.
237. Novelli A., Reilly J. A., Lysko G., Henneberry P. 1988. Glutamate becomes neurotoxic via the N-methyl-D-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced *Brain Res* 451, 205-212.
238. Nystrom FH., Quon MJ. 1999. Insulin signalling: metabolic pathways and mechanisms for specificity. *Cell Signal* 11: 563- 574.
239. Ogata T., Nakamura Y., Shibata T., Kataoka K. 1992. Release of excitatory amino acids from cultured hippocampal astrocytes induced by hypoxic-hypoglycemic stimulation. *J Neurochem* 58: 1957-1959.

240. Ogura A., Miyamoto, M., Kudo, Y. 1988. Neuronal death in vitro: parallelism between survivability of hippocampal neurones and sustained elevation of cytosolic Ca²⁺ after exposure to glutamate receptor agonist. *Exp Brain Res.*;73(3):447-58.
241. Oh Y., Nagalla S.R., Yamanaka Y., Kim H.S., Wilson E., Rosenfeld R.G. 1996. Synthesis and characterization of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-7. *J Biol Chem.* 271: 30322-30325.
242. Onley J.W 1969. Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 164, 719-721.
243. Oppenheim R. W. 1989. The neurotrophic theory and naturally occurring motoneuron death. *Trends Neurosci* 12,252-255.
244. Ozes ON., akca H., Mayo LD., Gustin JA., Maehama T., Dixon JE., Donner DB. 2001. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR pathway mediates and PTEN antagonizes tumor necrosis factor inhibition of insulin signaling through insulin receptor substrate-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 4640-44645.
245. Ozkan ED., Ueda T. 1998. Glutamate transport and storage in synaptic vesicles. *Jpn J Pharmacol* 77: 1-10.
246. Padmaperuma B., Mark R., Dhillon HS., Mattson MP., Prasad MR. 1996. Alterations in brain protein kinase C after experimental brain injury. *Brain Res* 714: 19-26.
247. Parekh D.P., Ziegler W., Parker P. 2000. Multiple pathways control protein kinase C. *EMBO J.* 19: 496-503.
248. Parpura V., Basarsky TA., Liu F., Jefciniya K., Jefciniya S., Haydon PG.1994. Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* 369: 711-717.
249. Pastorino L., Colciaghi F., Gardoni F., Albani-Torregrossa S., Pellegrini-Giampietro DE., Moroni F., De Graan PN., Cattabeni F., Di Luca M. 2000. (+)-MCPG induces PKCepsilon translocation in cortical synaptosomes through a PLD-coupled mGluR. *Eur J Neurosci* 12:1310-1318.
250. Paz K., Hemi R., LeRoith D., Karasik A., Elhanany E., Kanety H., Zick Y. 1997. A molecular basis for insulin resistance. *J Biol Chem* 272: 29911-29918.
251. Paz K., Liu YF., Shorer H., Hemi R., LeRoith D., Quon MJ., Kanety H., Seger R., Zick Y. 1999. Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1) by protein kinase B positively regulates IRS-1 function. *J Biol Chem.* 274: 28816-28822.

252. Peretz S., Jensen R., Baserga R., Glazer PM. 2001. ATM-dependent expression of the insulin-like growth factor-I receptor in a pathway regulating radiation response. *Prog Natl Acad Sci USA*. 98: 1676-1681.
253. Peruzzi F., Prisco M., Morrione A., Valentinis B., Baserga R. 2001. Anti-apoptotic signaling of the insulin-like growth factor I receptor required for the activation of extracellular signal-regulated kinase. *J Biol Chem* 276: 25990-25996.
254. Peruzzi F., Prisco M., Dews M., Salomoni P., Grassilli E., Romano G., Calabretta B., Baserga R. 1999. Multiple signaling pathways of the insulin-like growth factor 1 receptor in protection from apoptosis. *Mol. Cell Biol*. 19:7203-7215.
255. Piani D., Frei K., Do K.Q., Cuenod M., Fontana A. 1991. Murine brain macrophages induce NMDA receptor mediated neurotoxicity in vitro by secreting glutamate. *Neurosci Lett*. 133: 159-162.
256. Pin J. P., Duvoisin, R. 1995. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology* 34:1-26.
257. Pitt D., Werner P., Raine C.S. 2000. Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis. *Nature Med* 6 (1): 67-70.
258. Poli A., Contestabile A., Migani P., Rossi L., Rondelli C., Virgili M., Bissoli R., Barabei O. 1985. Kainic acid differentially affects the synaptosomal release of endogenous and exogenous amino acid neurotransmitters. *J Neurochem* 45: 1677-1686.
259. Pons S., Asano T., Glasheen E., Miralpeix M., Zhang Y., Fisher TL., Myers MG., Sun XJ., White MF. 1995. The structure and function of p55^{PIK} reveal a new regulatory subunit for phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Cell Biol* 15: 4453-4465.
260. Pons S., Torres-Aleman I. 2000. Insulin-like growth factor-I stimulates dephosphorylation of I κ B through the serine phosphatase calcineurin (protein phosphatase 2B). *J Biol Chem* Dec 8; 275(49): 38620-5.
261. Prehn J. M. 1996. Marked diversity in the action of growth factors on N-methyl-D-aspartate-induced neuronal degeneration. *Eur J Pharmacol*. Jun 13;306(1-3):81-8.
262. Prineas J.W., McDonald J.W. 1997. In *Greenfield's neuropathology* (eds. Graham D.I. & Lantos P.L.) 813-881 (Arnold, New York).
263. Pronk GJ., Medema RH., Burgering BM., Clark R., McCormick F., Bos JL. 1992. Interaction between the p21ras GTPase activating protein and the insulin receptor. *J Biol Chem* 267: 24058-24063.

264. Randall R. D., Ad Thayer S. A. 1992. Glutamate-induced calcium transient triggers delayed calcium overload and neurotoxicity in rat hippocampal neurons. *J Neurosci* 12, 1882-1895.
265. Ravichandran L.V, Espósito DL., Chen J., Quon MJ. 2001. Protein kinase C- ξ phosphorylates insulin receptor substrate-1 and impairs its ability to activate phosphatidylinositol 3-kinase in response to insulin. *J Biol Chem*. 276: 3543-3549.
266. Recio-Pinto E., Rechler M. M., Ishii D. N. 1986. Effects of insulin, insulin-like growth factor-II, and nerve growth factor on neurite formation and survival in cultured sympathetic and sensory neurons. *J Neurosci*. May;6(5):1211-9.
267. Rechler M.M. 1993. Insulin-like growth factor binding proteins. *Vitam Horm* 47: 1-144.
268. Reinhard CCT, Bondy CA. 1994. Insulin-like growth factors cross the blood-brain barrier. *Endocrinology*. Nov;135(5):1753-61.
269. Rinderknecht E., Humbel R. E. 1978. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem* 253: 2769-2776.
270. Robinson-White A., Stratakis CA. 2002. Protein kinase A signaling: "cross-talk" with other pathways in endocrine cells. *Ann NY Acad Sci* 968: 256-270.
271. Rodriguez-Moreno A., Lerma J. 1998. Kainate receptor modulation of GABA release involves a metabotropic function. *Neuron* 20: 1211-1218.
272. Rosenfeld R.G., Lamson G., Pham H., Oh Y., Conover C., De León D. D., Donovan S.M., Ocran I., Giudice L. 1990. Insulin-like growth factor binding proteins. *Recent prog Horm Res* 46: 99-159.
273. Rosenzweig T., Braiman L., Bak A., Alt A., Kuroki T., Sampson SR. 2002. Differential effects of tumor necrosis factor-alpha on protein kinase C isoforms alpha and delta mediate inhibition of insulin receptor signaling. *Diabetes* 51: 1921-1930.
274. Rossi D., Oshima T., Attwell D. 2000. Glutamate release in severe brain ischemia is mainly by reversed uptake. *Nature* 403: 316-321.
275. Rothman S.M 1984. Synaptic release of excitatory amino acid neurotransmitter mediates anoxic neuronal death. *J. Neurosci* 4, 1884-1891.
276. Rotwein P., Burgess S. K., Milbrant J. D., Krause J. E. 1988. differential expression of insulin-like growth factor genes in rat central nervous system. *Prog Nat Acad Sci (USA)* 85: 265-269.

277. Rui L., Aguirre V., Kim JK., Shulman GI., Lee A., Corbould A., Dunaif A., White MF. 2001. Insulin/IGF-1 and TNF- α stimulate phosphorylation of IRS-1 at inhibitory Ser³⁰⁷ via distinct pathways. *J Clin invest* 107: 181-189.
278. Ryu B. R., Ko H. W., Noh J. S., Gwag B. J. 1999. Phosphatidylinositol 3-Kinase-mediated regulation of neuronal apoptosis and necrosis by insulin and IGF-I. *J Neurobiol* 39: 536-346.
279. Rzeski W., Turski L., Ikonomidou C. 2001. Glutamate antagonists limit tumor growth. *Prog Natl Acad Sci. U.S.A.* 98: 6572-6377.
280. Saatman KE., Contreras PC., Smith DH., Raghupathi P., McDermott KL., Fernández SC., Sanderson L., Voddi M., McIntosh TK. 1997. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) improves both neurological motor and cognitive outcome following experimental brain injury. *Exp Neurol* 147: 418-427.
281. Saitoh N., Hori T., Takahashi T. 2001. Activation of the epsilon isoform of protein kinase C in the mammalian nerve terminal. *Proc Acad Sci USA* 98: 14017-14021.
282. Sandberg Nordqvist AC., von Holst H., Holmin S., Sara VR., Bellander BM., Schalling M. 1996. Increase of insulin-like growth factor (IGF)-1, IGF binding protein-2 and -4 mRNAs following cerebral contusion. *Mol Brain Res* 38: 285-293.
283. Salmon W.D., Daughaday W.H. 1957. A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage *in vitro*. *J Lab Clin Med* 49: 825-836.
284. Saltiel AR. 2001. New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Cell* 104: 517-529.
285. Samdani A. F., Newcamp C., Resink A., Facchinetti F., Hoffman B. E., Dawson V. L., Dawson T. M. 1997. Differential susceptibility to neurotoxicity mediated by neurotrophins and neuronal nitric oxide synthase. *J Neurosci.* Jun 15;17(12): 4633-41.
286. Sattler R., Tymianski M. 2001. Molecular mechanisms of glutamate receptor-mediated excitotoxic neuronal cell death. *Mol Neurobiol* 24: 107-129.
287. Sattler R., Tymianski M., 2000. Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *J Mol Med* 78: 3-13.
288. Schäbitz WR., Hoffmann TT., Heiland S., Kollmar R., Bardutzky J., Sommer C., Schawab S. 2001. Delayed neuroprotective effect of insulin-like growth factor-I after experimental transient focal cerebral ischemia monitored with MRI. *Stroke* 32: 1226-1233.

289. Schafer M, Erdo S. L. 1992. Insulin-specific sensitization of cultured cerebrocortical neurons to glutamate excitotoxicity. *Brain Res.* May 15;580(1-2):331-3.
290. Schramm, M., Eimerl, S., Costa, E. 1990. Serum and depolarizing agents cause acute neurotoxicity in cultured cerebellar granule cells: role of the glutamate receptor responsive to N-methyl-D-aspartate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Feb;87(3):1193-7.
291. Schwab S., Spranger M., Krempien S., Hacke W., Bettendorf M. 1997. Plasma insulin-like growth factor I and IGF binding protein 3 levels in patients with acute cerebral ischemic injury. *Stroke* 28: 1744-1748.
292. Seeburg P. H. 1997. TINS/TIPS lecture: The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *TINS* .
293. Shigeno T., Mima T., Takakura K., Graham DI., Kato G., Hashimoto Y., Furukawa S. 1991. Amelioration of delayed neuronal death in the hippocampus by nerve growth factor. *J Neurosci* 11:2914-2919.
294. Singleton JR, Dixit VM, Feldman EL (1996) Type I insulin-like growth factor receptor activation regulates apoptotic proteins. *J Biol Chem* 271: 31791-31794.
295. Skal M.M., Kies W., Thomas C.L., Nissley S.P. 1989. Developmental expression of the tissue insulin-like growth factor II/manose-6-phosphate receptor in the rat. *J Biol Chem.* 264: 16733-16738.
296. Skal M.M., Kies W., Thomas C.L.,Municchi G., Roberts C.T., LeRoith D., Kiess W., Nissley S.P. 1992. Developmental expression of rat insulin-like growth factor II/manose-6-phosphate receptor messenger ribonucleic acid. *Endocrinology* 130: 3484-3491.
297. Skaper SD., Facci L., Strijbos PJ. 2001. Neuronal protein kinase signaling cascades and excitotoxic cell death. *Ann N.Y.Acad Sci* 939:11-22.
298. Sortino MA., Canonico PL. 1996. Neuroprotective effect of insulin-like growth factor I in immortalized hypothalamic cells. *Endocrinology* 137: 1418-1422.
299. Standaert M., Galloway L., Karnam P., Bandyopadhyay G., Moscat J., Farese RV. 1997. Protein kinase C-zeta as a downstream effector of phosphatidylinositol 3-kinase during insulin stimulation in rat adipocytes. Potential role in glucose transport. *J Biol Chem* 272: 30075-30082.
300. Szatkowski M., Attewell D. 1991. Triggering and execution of neuronal death in brain ischemia: two phases of glutamate release by different mechanisms. *Trends Neurosci* 17: 359-365.

301. Szatkowski M., Barbour B., Attewell D. 1990. Nonvesicular release of glutamate from glial cells by reserved eletrogenic glutamate uptake. *Nature* 348: 113-116.
302. Tagami M., Yamagata K., Nara YH., Kubota A., Fujino Numano F., Yamori Y. 1997. Insulin-like growth factors prevent apoptosis in cortical neurons isolated from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Lab Invest* 76: 603-612.
303. Tagami M., Ikeda K., Nara Y., Fujino H., Kubota A., Numano F., Yamori Y. 1997. Insulin-like growth factor-1 attenuates apoptosis in hippocampal neurons caused by cerebral ischemia and reperfusion in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Lab Invest* 76: 613-617.
304. Taiwo YO., Coderre TJ., Levine JD., 1989. Mediation of primary afferent peripheral hyperalgesia by cAMP second messenger system. *Neuroscience* 32: 577-580.
305. Taiwo YO., Levine JD. 1991. Further confirmation of the role of adenylyl cyclase and of cAMP-dependent protein kinase in primary afferent hyperalgesia. *Neuroscience* 44: 131-135.
306. Takano T., Lin JH., Arcuino G., Gao Q., Yang J., Nedergaard M. 2001. Glutamate release promotes growth of malignant gliomas. *Nature Med* 7: 1010-1015.
307. Tanaka C., Nishizuka Y. 1994. The protein kinase C family for neuronal signalling. *Annu Rev Neurosci* 17: 551-567.
308. Tham A., Nordberg A., Grisom F., Carlsson-Skwirut C., Viitanen M., Sara VR. 1993. Insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding proteins in cerebrospinal fluid and serum of patients with dementia of the Alzheimer type. *J Neural Transm Park Dement Sect* 5: 165-176.
309. Thomas RJ. 1995. Excitatory amino acids in health and disease. *J Amer Geriatr Soc* 43: 1279-1289.
310. Thompson C.B. 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267: 1456-1462.
311. Torres-Aleman I. 1999. Insulin-like growth factors as mediators of functional plasticity in the adult brain. *Horm Metab Res* 31: 114-119.
312. Torres-Aleman I. 2000. Serum growth factors and neuroprotective surveillance. *Mol Neurobiol* 21: 153-160.
313. Torres-Alemán I. 1999. Insulin-like growth factors as mediators of functional plasticity in the adult brain. *Metab Res* 31: 114-119.

314. Torres-Alemán I. 2000. Serum growth factors and neuroprotective surveillance: focus on IGF-1. *Mol Neurobiol* 21: 153-160.
315. Torres-Alemán I., Barrios V., Berciano J. 1998. The peripheral insulin-like growth factor system in amyotrophic lateral sclerosis and in multiple sclerosis. *Neurology* 50: 772-776.
316. Torres-Aleman I., Barrios V., Liedo A., Berciano J. 1996. The insulin-like growth factor I system in cerebellar degeneration. *Ann Neurol* 39: 335-342.
317. Torres-Alemán I., Naftolin F., Robbins R. J. 1990. Trophic effects of basic fibroblast growth factor on fetal rat hypothalamic cells: interactions with insulin-like growth factor I. *Brain Res Dev Brain Res.* 1;52(1-2):253-7.
318. Torres-Alemán I., Naftolin F., Robbins RJ. 1990. Trophic effects of insulin-like growth factor-I on fetal rat hypothalamic cells in culture. *Neuroscience* 35: 601-608.
319. Torres-Alemán I., Pons S., Santos-Benito F.F. 1992. Survival of purkinje cells in cerebellar cultures is increased by insulin-like growth factor-I. *Eur J Neurosci* 4: 864-869.
320. Torres-Alemán I., Pons S., Arévalo MA. 1994. The insulin-like growth factor I system in the rat cerebellum: developmental regulation and role in neuronal survival and differentiation. *J Neurosci Res* 39: 117-126.
321. Torres-Alemán I., Villalba M., Nieto-Bona M.P. 1998. Insulin-like growth factor-I modulation of cerebellar cell populations in developmentally stage-dependent and mediated by specific intracellular pathways. *Neurosci.*83, 2: 321-334.
322. Trapp BD., Peterson J., Ransohoff RM., Rudick R., Mork S., Bo L. 1998. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl. J Med* 338: 278-285.
323. Trejo JL., Carro E., Torres-Alemán I. 2001. Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-mediated increases in the number of new neurons in the adult hippocampus. *J Neurosci* 21: 1628-1634.
324. Troker A. 1998. Signaling through protein kinase C. *Front biosci* 3, D1134-D1147.
325. Tymianski M. 1996. Cytosolic calcium concentrations and cell death in vitro. In: Siesjo BK, Wieloch T (eds) *Advances in neurology*. Lippincott-Raven, Philadelphia, pp 85-105.

326. Ullrich A., Gray A., Tam A. W., Yang-Feng T., Tsubokawa M., Collins C., Henzel W., Le bon T., Kathuria S., Chen E., Jacobs S., Francke U., Ramachandran J., Fujita-Yamaguchi Y. 1986. Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggest structural determinants that define functional specificity. *EMBO J* 5: 2503-2512.
327. Vaccarino F., Guidotti, A., Costa, E. 1987. Ganglioside inhibition of glutamate-mediated protein kinase C translocation in primary cultures of cerebellar neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec;84(23): 8707-11.
328. Vahala R., Turpeinen U., Riihonen R. 2001. Low levels of insulin-like growth factor-I in cerebrospinal fluid in children with autism. *Dev Med Child Neurol* 43: 614-616.
329. Valentinis B., Morrione A., Peruzzi F., Prisco M., Reiss K., Baserga R. 1999. Anti-apoptotic signalling of the IGF-I receptor in fibroblasts following loss of matrix adhesion. *Oncogene* 18: 1827-1836.
330. Van Evercooren A.B., Olichon-Berthe. 1991. Expression of IGF-I and insulin receptor genes in the rat central nervous system. A developmental, regional, and cellular analysis. *J Neurosci Res*. 28: 244-253.
331. Van Wyk J. J., Underwood L. E., Hintz R. L., Clemmons D.R., Voina S. J., Weaver R. P.; 1974. Somatomedins: a family of insulin-like hormones under growth hormone control. *Recent Prog Horm Res* 30: 259-318.
332. Vannucci RC. 1993. Mechanisms of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Semin Perinatol* 17: 330-337.
333. Verters HD., Tang O., Liu Q., VanHoy RW., Dantzer Kelley KW. 1999. A new mechanism of neurodegeneration: a proinflammatory cytokine inhibits receptor signalling by survival peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 9879-9884.
334. Virgili M., Migani P., Contestabile A., Barnabei O. 1992. Protection from kainic acid neuropathological syndrome by NMDA receptor antagonists: effect of MK-801 and CGP 39551 on neurotransmitter and glial markers. *Neuropharmacology* 31: 469-474.
335. Vincent M., Feldman E.L. 2002. Control of cell survival by IGF signaling pathways. *Growth horm & IGF Res*, 12: 193-197.
336. Volpe JJ. 1992. Brain injury in the premature infant Current concepts of pathogenesis and prevention. *Biol Neonate* 62: 231-242.
337. Wagey R., Hu J., Pelech SL., Raymond LA., Krieger C., 2001. Modulation of NMDA-mediated excitotoxicity by protein kinase C.. *J Neurochem* 78: 715-726.

338. Wang YT., Linden DJ. 2000. Expression of cerebellar long-term depression requires postsynaptic clathrin-mediated endocytosis. *Neuron* 25:635-647.
339. Walter HJ., Berry M., Hill DJ Logan A.1997. Spatial and temporal changes in the insulin-like growth factor (IGF) axis indicate autocrine/paracrine actions of IGF-I within wounds of the rat brain. *Endocrinology* 138: 3024-3034.
340. Wang JM., Hayashi T., Zhang WR., Sakai K., Shiro Y., Abe K. 2000. Reduction of ischemic brain injury by topical application of insulin-like growth factor-I after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res* 859: 381-385.
341. Wang HY., Pisano MR., Friedman E. 1994. Attenuated protein kinase C activity and translocation in Alzheimer's disease brain. *Neurobiol Aging* 15: 293-298.
342. Watanabe T., Ono Y., Taniyama Y., Hazama K., Igarashi K., Ogita K., Kikkawa U., Nishizuka Y. 1992. Cell division arrest induced by phorbol ester in CHO cells overexpressing protein kinase C-delta subspecies. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 89: 10159-10163.
343. Webb P.R., Wang K.Q., Scheel-Telner D., Pongracz J., Salmon M., Lord J.M. 2000. Regulation of neutrophil apoptosis: a role for protein kinase C and phosphatidylinositol-3-kinase. *Apoptosis* 5:451-458.
344. Wre F.C., Santee S., Glass A (eds).1988. *The cytokine handbook*. Pp 549-580.
345. Werner G. A., Wolsschak M., Adamo M., Shen-Orr Z., Roberts C. T. Jr, LeRoith D. 1989. Developmental regulation of the rat insulin-like growth factor I receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 5936-5941.
346. Wert M.M., Palfrey H.C. 2000. Divergence in the anti-apoptotic signalling pathways used by nerve growth factor and basic fibroblast growth factor (bFGF) in PC12 cells: rescue by bFGF involves protein kinase C delta. *Biochem J* 352: 175-182.
347. White M.F, Kahn C.R. 1994. The insulin signaling system. *J.Biol. chem.* 270 :13091-13098.
348. Wieloch T. 1985.Hypoglycemia-induced neuronal damage prevent by an N-methyl-D-aspartate antagonist. *Science.* 230: 681-683.
349. Williams CE., Gunn AJ., Gluckman PD. 1991. The time course of intracellular edema epileptiform activity following prenatal cerebral ischemia in sheep. *Stroke* 22: 516-521.

350. Williams CE., Gunn AJ., Gluckman PD., Synek B. 1990. Delayed seizures occurring with hypoxic-ischemic encephalopathy in the fetal sheep. *Pediatr Res* 27: 561-565.
351. Wooten MW. 1999. Function for NF- κ B in neuronal survival: Regulation by atypical protein kinase C. *J Neurosci Res* 58: 607-611.
352. Wyatt JS., Edwards AD., Azzopardi D., Reynolds EO. 1989. Magnetic resonance and near infrared spectroscopy for investigation of perinatal hypoxic-ischaemic brain injury. *Arch Dis Child* 64: 953-963.
353. Yamaguchi F., Itano T., Miyamoto O., Janjua NA., Ohmoto T., Hosokawa K., Hatase O. 1991. Increase of extracellular insulin-like growth factor I (IGF-I) concentration following electrolytical lesion in rat hippocampus. *Neurosci Lett* 128: 273-276.
354. Yao H., Ooboshi H., Ibayashi S., Uchimura H., Fujishima M. 1993. Cerebral blood flow and ischemia-induced neurotransmitter release in the striatum of aged spontaneously hypertensive rats. *Stroke* 24: 577-580.
355. Ye Z.C., Sontheimer H. 1999. Glioma cells release excitotoxic concentrations of glutamate. *Cancer Res* 59: 4383-4391.
356. Yenush L., White M.F. 1997. The IRS-signalling system during insulin and cytokine action. *Bioessays* 19: 491-500.
357. Zackenfels K., Oppenheim R. W., Rohrer H. 1995. Evidence for an important role of IGF-I and IGF-II for the early development of chick sympathetic neurons. *Neuron*. Apr;14(4): 731-41.
358. Zackenfels K., Oppenheim RW., Rohrer H. 1995. Evidence for a important role of IGF-I and IGF-II for the early development of chick sympathetic neurons. *Neuron* 14: 731-741.
359. Zeevalk GD., Hyndman AG., Nicklas WJ. 1989. Excitatory amino acid-induced toxicity in chick retina: amino acid release, histology, and effects of chloride channel blockers. *J Neurochem* 53: 1610-1619.
360. Zhang Y., Tatsuno T., Carney JM., Mattson MP. 1993. Basic FGF, NGF and IGFs protects hippocampal and cortical neurons against iron-induced degeneration. *J Cereb Blood Flow Metab* 13: 378-388.

361. Zheng WH., Kar S., Quirion R. 2000. Stimulation of protein kinase C modulates insulin-like growth factor 1 induced AKT activation in P12 cells. *J Biol Chem* 18: 13377-13385.
362. Zheng WH., Kar S., Quirion R. 2000. Insulin-like growth factor-1-induced phosphorylation of the forkhead family transcription factor FKHRL1 is mediated by Akt kinase in PC12 cells. *J Biol Chem* 275: 13377-13385.
363. Zhu C. Z., Auer R. N. 1994. Centrally administered insulin and IGF-1 in transient forebrain ischaemia in fasted rats. *Neurol Res.* Apr;16(2): 116-20.
364. Zhu C.Z., Auer R.N. 1994. Intraventricular administration of insulin and IGF-I intransient forebrain ischemia. *J Cereb blood flow metab* 14: 237-242.