

Artículo de revisión-Articles-Review

Muerte celular: blanco terapéutico en neurodegeneración y sepsis

Apoptosis: Therapeutic target in neurodegeneration and sepsis

Gonzalo Arboleda*, Luisa M. Matheus†

Resumen

La apoptosis celular se considera el principal mecanismo fisiopatológico asociado a la pérdida neuronal en las enfermedades neurodegenerativas. También durante la fase aguda de sepsis en que se presenta disfunción orgánica, se ha encontrado que existe un incremento en la tasa apoptótica del endotelio parenquimal y microvascular. De tal forma que las estrategias para prevenir la apoptosis (anti-apoptóticas) representan una valiosa herramienta para prevenir y/o retardar la aparición de la sintomatología en estos desórdenes, los cuales ocasionan una gran carga en morbi-mortalidad social y económica a nivel mundial.

En la presente revisión se busca evidenciar que las estrategias anti-apoptóticas poseen un gran potencial terapéutico. En tal sentido, se revisarán algunas de estas potenciales terapias como los inhibidores de caspasas, la proteína C activada, la familia Bcl-2 y la vía de señalización mediada por PI3K/Akt.

Palabras clave: apoptosis, degeneración nerviosa, sepsis, protección, caspasas, proteína C.

Abstract

Cellular apoptosis has been considered as the main physiological mechanism underlying neuronal demise associated to neurodegenerative diseases. Apoptosis has also been described in parenchymal and microvascular endothelium in the acute phase of sepsis during multi-organic dysfunction. Therefore, strategies aimed to

prevent apoptosis (anti-apoptotic) represent a valuable tool for prevention and/or retardation of the appearance of clinical symptoms in these disorders, which generate a large morbidity-mortality, social and economic burden worldwide. The present review is aim to show that anti-apoptotic strategies hold a great therapeutic potential. In this sense, we will review some of these potential therapies such as caspase inhibitors, activated protein C, Bcl-2 family and the PI3K/Akt signalling pathway.

Key words: Apoptosis, nerve degeneration, sepsis, protection, caspases, protein C.

Abreviaturas: $\Delta\psi_m$, potencial de membrana mitocondrial; ANT, transportador de nucleótidos de adenosina; EA, enfermedad de Alzheimer; EP enfermedad de Parkinson; EPCR, receptores endoteliales de proteína C; HSP, proteínas de choque térmico; I κ B, inhibidor kappa B; mPTP, poro de permeabilidad transicional mitocondrial; NF κ B factor nuclear kappa B; PAR-1, receptor-1 activado por proteasa; PCA, proteína C activada; SN, sustancia nigra; TNF, factor de necrosis tumoral; VDAC, canal aniónico dependiente de voltaje.

Recibido: mayo de 2005.

Aceptado: agosto de 2005.

* MD, MSc, PhD, Instituto de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina, Universidad del Rosario. Correo electrónico: gonzalo.arboledabu@urosario.edu.co

† BSc, MSc, PhD, Instituto de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina, Universidad del Rosario. Correo electrónico: luisa.matheus@urosario.edu.co

INTRODUCCIÓN

La muerte celular programada o apoptosis celular se considera el principal mecanismo fisiopatológico asociado a la pérdida neuronal en las enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la enfermedad de Alzheimer (EA) y la enfermedad de Parkinson (EP). En la fase aguda de sepsis en la que se presenta disfunción orgánica, también se ha encontrado un incremento en la tasa apoptótica del endotelio parenquimal y microvascular.

Las enfermedades neurodegenerativas representan la consecuencia final de un grupo de interacciones complejas a lo largo de la vida de un individuo, en que intervienen la predisposición genética, algunas características innatas de poblaciones neuronales específicas y la exposición a toxinas endógenas y exógenas (1) Estas enfermedades se caracterizan por ocasionar una gran discapacidad y un aumento de la morbilidad entre las personas afectadas, por las grandes pérdidas económicas y por las graves consecuencias sociales y familiares que generan. En población mayor de 65 años se incrementa dramáticamente el impacto de la neurodegeneración primaria, ya que el envejecimiento es el principal factor de riesgo. La distribución de las enfermedades neurodegenerativas es mundial, estimándose que afectan el 1% de la población general. En Colombia afecta a unos 200.000 individuos, y su tendencia es al aumento debido al envejecimiento de la población. Aunque la fisiopatología y la etiopatogenia de las enfermedades neurodegenerativas primarias permanecen en gran medida inciertas, diversas evidencias sugieren que la apoptosis es la causa primaria o secundaria que contribuye a la muerte neuronal. La detección temprana de los procesos neurodegenerativos y los riesgos asociados a ellas están íntimamente relacionados con la identificación de factores neuroprotectores con potencial terapéutico. Las estrategias

neuroprotectoras/neurorestauradoras buscan detener o prevenir la progresión de la enfermedad al bloquear la muerte de células en riesgo en una fase preclínica o inicial de la misma.

Estadísticas del Medicare Database and National Census Projections estiman que en Estados Unidos se presentan al menos 750.000 casos anuales de sepsis severa con una tasa de mortalidad que fluctúa entre el 28 y el 59% (2). Así mismo, la Society of Critical Care Medicine (Society of Critical Care Medicine (SCCM) (homepage en Internet); c2001-2005 (consultado junio 16 de 2005). (1 pantalla). (Disponible en: http://www.sccm.org/press_room/sepsis_statistics.asp) reporta que las tasas de incidencia se han incrementado en un 91,3% en la última década, de manera que en el año 2010 se presentarán alrededor de un millón de casos de sepsis severa. En Norteamérica muchas más personas mueren a causa de sepsis que por cáncer de seno, colón, páncreas y próstata combinados.

En tal sentido, las terapias encaminadas a prevenir la apoptosis (antiapoptóticas) poseen un gran potencial terapéutico. Dentro de las estrategias que se han venido utilizando como herramientas protectoras, incluso en ensayos clínicos, se encuentran la utilización de factores de crecimiento, los inhibidores de caspasas, los trasplantes celulares, la proteína C activada, entre otros. Aunque muchos de los procesos moleculares subyacentes permanecen desconocidos (3-7), se han empezado a aclarar los mecanismos involucrados en los procesos de muerte/supervivencia celular.

MECANISMOS GENERALES DE MUERTE CELULAR

Clásicamente se han descrito dos mecanismos fundamentales, bioquímicamente distinguibles y que representan los dos extremos de

una variedad de posibles mecanismos de muerte celular: la necrosis y la apoptosis (8-11). La necrosis constituye un proceso patológico, poco controlado y desordenado, no requiere de ATP para su progresión y causa una explosión de la célula asociada a un proceso inflamatorio. La apoptosis es una forma de muerte celular programada, morfológica y bioquímicamente bien caracterizada. Es un proceso activo, es decir, requiere de ATP, y se manifiesta con retracción celular, fragmentación nuclear, preservación de los organelos intracelulares, cambios en la asimetría de los fosfolípidos de membrana, formación de cuerpos apoptóticos, y fagocitosis de la célula apoptótica, que es llevado a cabo por una maquinaria intrínseca y específica de "suicidio celular" (12).

Algunos de los eventos que subyacen a la cascada molecular en la apoptosis se subdividen en dos vías: la vía extrínseca (disparada por activación de receptores de la superfamilia de CD95L o de muerte celular por acción de TNF α , FasL, IL-1 y otros) y la vía intrínseca (particularmente asociada a daño al ADN) (figura 1) (13). Las alteraciones en la fisiología mitocondrial han sido consideradas como el punto coordinador clave y vía final común que define el punto de no retorno de la apoptosis, y que es un área reciente de amplio estudio en los eventos de muerte y de supervivencia celular (14). En los procesos que ocurren corriente arriba de los cambios mitocondriales participan una multitud de proteínas pro-apoptóticas (caspasa 8 y 10, Bax, Bad, Bid, Bak, Bcl-xs) y anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL, PI3K/Akt) (13), algunas de las cuales están localizadas en la membrana externa mitocondrial y otras en el citosol. Estas proteínas realizan su función mediante la regulación directa de la permeabilidad mitocondrial (familia Bcl-2, como se explica más adelante) o

mediante otros mecanismos que involucran la regulación de sustratos mitocondriales y la regulación de las proteínas de la familia Bcl-2 (vía PI3K/Akt).

Las proteínas unidas a la mitocondria se encargan de regular su homeostasis por diversos mecanismos tales como inserción y formación directa de un poro transmembranal, interacción y regulación del canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) y del transportador de nucleótidos de adenosina (ANT), que conllevan a la alteración del poro de permeabilidad transicional mitocondrial (mPTP). Estos cambios generan la liberación al citoplasma de proteínas pro-apoptóticas confinadas dentro de la mitocondria como el citocromo C, Apaf-1 y ATP, que forman un complejo de proteínas denominado el apoptosoma, el cual activa las caspasas efectoras que dirigen el desmantelamiento final de la célula (13).

Las alteraciones mitocondriales surgen del delicado balance entre los niveles de las proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas, dependientes a su vez de la naturaleza e intensidad del estímulo apoptótico desencadenante, del estado y del tipo celular, de algunas condiciones del microambiente celular externo (15) y, de manera "autónoma", de procesos de regulación que modifican las formas activas y/o inactivas de las distintas vías de señalización corriente arriba. Por ejemplo, la fosforilación, inactivación y secuestro de la proteína Bad por acción de Akt, es contrarrestada por la defosforilación inducida por ceramidas, causando su translocación a la mitocondria y la inhibición de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-xL y Bcl-2, conllevando apoptosis (figura 2) (16). Por consiguiente, es importante determinar cómo estos procesos de modificación postraduccional están implicados en la regulación de la supervivencia/muerte celular (17).

MUERTE CELULAR EN SEPSIS

En sepsis, el endotelio juega un papel importante en la generación de trombina mediada por el factor tisular (TF), la vía anticoagulante disfuncional y el bloqueo de la fibrinólisis (18). En condiciones fisiológicas el endotelio cumple su función en el proceso homeostático, mediante el control del tono vasomotor, el tráfico celular y de nutrientes, y el mantenimiento del flujo sanguíneo a través de la expresión y síntesis de anticoagulantes naturales (proteína C activada, inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) y antitrombina) y fibrinolíticos (activador de plasminógeno tisular) (19, 20).

En la cascada de eventos que llevan al choque séptico se encuentran involucrados monocitos, leucocitos, plaquetas y el endotelio. Como resultado de la acción de las citoquinas y de la activación celular, se inducen las vías del complemento y de la coagulación, se metaboliza el ácido araquidónico y es liberado el factor activador plaquetario, ocasionando fiebre, hipotensión, filtración capilar, coagulación intravascular diseminada, disminución de la función miocárdica, disfunción cardiovascular, renal, respiratoria, hepática, hematológica y del sistema nervioso central, acidosis metabólica y finalmente muerte (21). Las secuelas clínicas de la sepsis pueden variar de acuerdo con el balance de mediadores inflamatorios y antiinflamatorios. Una respuesta inflamatoria excesiva (SIRS) puede producir choque y disfunción orgánica, mientras que una respuesta antiinflamatoria excesiva (CARS) puede llevar a una inmunosupresión. Algunos pacientes pueden morir con inflamación mínima como resultado de apoptosis (20), en particular de los órganos linfoides (22). Durante la fase aguda de sepsis en que se presenta disfunción orgánica, se ha encontrado que existe un incremento en la tasa apoptótica del endotelio parenquimal y

microvascular, así como una amplificación del efecto coagulante ya que el endotelio en apoptosis es pro coagulante (23). Aunque existen evidencias de apoptosis endotelial inducida por patógenos, no está claro si la apoptosis es un mecanismo fisiopatológico importante en sepsis ya que no existen estudios *in vivo*. Dichos estudios son complicados debido a que las células que sufren apoptosis se desprenden, pasan al torrente sanguíneo y son rápidamente eliminadas dificultando así su detección (24). El endotelio funciona como célula blanco de apoptosis y como mediador de la misma por medio de la generación de radicales libres de oxígeno y proteínas de choque térmico. La insuficiencia metabólica asociada a la disfunción multiorgánica lleva a la remoción del factor de crecimiento, lo que estimula la apoptosis celular. La apoptosis endotelial permite la translocación de las bacterias a zonas internas favoreciendo la diseminación bacteriana (25).

MUERTE CELULAR EN ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

El término neurodegeneración denota la muerte neuronal patológica característica de las enfermedades neurodegenerativas primarias como la EA y EP, o secundarias como la isquemia cerebral. Aunque la etiología de la muerte neuronal en la mayoría de estos desórdenes permanece desconocida, diversas evidencias sugieren que en estas enfermedades las neuronas podrían morir por apoptosis (12, 26, 27).

En la dinámica causal compleja que caracteriza las enfermedades neurodegenerativas, la genética y el componente medioambiental no son eventos mutuamente excluyentes sino que podrían ser complementarios en el proceso subyacente. Diversos paradigmas neurotóxicos han sido propuestos como potenciales mediadores de

esta muerte neuronal (28-31). Entre otros se incluyen toxinas exógenas como el MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) (32), rotenona (33), 6-OH-dopamina (34), y endógenas como la ceramida (35), el péptido amiloide-(β) (36, 37), y procesos como el estrés oxidativo (38), alteraciones mitocondriales (39), alteraciones del sistema ubiquitina-proteosoma (SUP) (40), y el envejecimiento (41).

En EP por ejemplo, dada la escasez de cambios necróticos en la sustancia nigra (SN), y el patrón topográfico y temporalmente específico de la pérdida celular, la apoptosis emerge como el principal mecanismo de muerte neuronal. Algunos reportes indican que el 12% de las neuronas dopaminérgicas que se pierden durante la EP expresan proteínas proapoptóticas, y además se ha determinado que la activación de caspasas precede la muerte celular (42). Otros reportes resaltan la importancia de los elevados niveles de proteínas antiapoptóticas en los ganglios basales y la SN de pacientes con EP (43), aunque la evidencia es aún controversial. Una correlación positiva entre la pérdida celular, el porcentaje de células de la SN positivas para caspasa 3 y una disminución del 76% en EP, sugiere que esta enzima es el principal efector de la apoptosis en EP y contribuye a la vulnerabilidad regional observada (44).

Teniendo en cuenta la importancia de la mitocondria durante la apoptosis, y basados en el hecho de que los procesos que favorecen la apertura del mPTP se consideran proapoptóticos, y aquellos que favorecen su cierre se consideran antiapoptóticos (44, 45), la ceramida surge como un neurotoxina endógena importante en neurodegeneración. Se ha demostrado que la ceramida modula la función mitocondrial mediante la formación directa de canales (46) e indirectamente mediante la inhibición del

complejo I y III de la cadena respiratoria (47, 48), lo que induce la liberación de citocromo C, genera radicales libres, altera la homeostasis de calcio, extingue el ATP, colapsa el $\Delta\psi_m$ (49) y conduce la célula a apoptosis.

Adicionalmente, el estudio de los efectos de algunas neurotoxinas utilizadas en modelos de EP como el MPTP, 6-hidroxidopamina y rotenona, han mostrado que su acción sobre la viabilidad celular está mediada por cambios en el $\Delta\psi_m$ (50, 51), y de manera interesante estos modelos pueden ser evitados y/o revertidos modulando las vías corriente arriba de la mitocondria (52). Esto sugiere que las proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2 interactúan específicamente con proteínas o con vías de supervivencia celular distintas, y que regulándolas diferencialmente se podría determinar su papel como un modulador positivo o negativo en la muerte celular (53).

ESTRATEGIAS ANTIAPOPTÓTICAS

La protección celular se refiere a los mecanismos por los cuales se busca prevenir la pérdida celular para retardar y/o prevenir la progresión de enfermedades asociadas a muerte celular como las neurodegenerativas y la sepsis. El rescate celular se refiere a los procesos para salvar células que se encuentran en proceso de degeneración y se considera parte del proceso protector. Una de las principales herramientas en la protección es por medio de inhibición de la apoptosis. La restauración celular hace referencia al incremento del número de células, por ejemplo mediante trasplantes, y no será tratada en esta revisión.

Las estrategias antiapoptóticas son variadas y se basan en la inhibición de vías de señalización involucradas en el proceso apoptótico y/o en el fortalecimiento de vías de supervivencia

neuronal antiapoptótica, ya sea por métodos genéticos y/o farmacológicos. La mayoría de estos estudios se han realizado en modelos experimentales (54) y algunos ya han llegado al nivel clínico.

LA FAMILIA BCL-2

La familia Bcl-2 está constituida por un grupo de proteínas involucradas en la regulación de la muerte celular, que incluye miembros tanto con actividad proapoptótica como antiapoptótica (55-58). Las proteínas Bcl-2 antiapoptóticas se localizan principalmente a nivel de membranas, en particular en la membrana mitocondrial externa (59-61), mientras que la mayoría de los miembros proapoptóticos se encuentran en el citosol, pero sufren un proceso de translocación a las membranas, particularmente a la mitocondria y retículo endoplásmico, luego de un estímulo apoptótico (62-64). Diversos estudios han demostrado que los miembros pro y antiapoptóticos de la familia Bcl-2 alteran o mantienen la homeostasis mitocondrial respectivamente, mediante la formación de canales o mediante el control de canales preexistentes en la mitocondria. Así, miembros antiapoptóticos como Bcl-2 y Bcl-xL previenen la pérdida de la homeostasis mitocondrial y la liberación de mediadores proapoptóticos confinados dentro de la mitocondria, mientras que los miembros proapoptóticos alteran tal homeostasis y permiten la liberación de mediadores pro-apoptóticos hacia el citosol (figura 2) (56, 60, 62, 65-68). De acuerdo con este modelo de "reóstató" de las Bcl-2, el balance entre los miembros proapoptóticos y antiapoptóticos definen la sensibilidad celular hacia estímulos apoptóticos particulares (56, 69).

Un miembro de la familia Bcl-2 lo constituye la proteína A1, que se expresa en células endoteliales en respuesta a estímulos proinfla-

matorios. Además de proteger el endotelio contra la apoptosis mediada por TNF y ceramidas (figura 3), A1 también inhibe la activación endotelial y, por consiguiente, la expresión de proteínas proinflamatorias mediante la inhibición del factor transcripcional NFkB (70, 71). Además la expresión de A1 también depende de NFkB, por lo tanto A1 se encarga de su autorregulación.

Diversos estudios han demostrado que la sobreexpresión de miembros antiapoptóticos o la deficiencia de miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2 protegen contra estímulos apoptóticos variados. En modelos de EP, la deficiencia de Bax protege las células dopaminérgicas contra el efecto tóxico de la toxina MPTP (72), de igual forma que la sobreexpresión de Bcl-2 (73, 74).

INHIBIDORES DE CASPASAS

Las caspasas son un grupo de proteasas de cisteína importantes en la progresión de la apoptosis (75). Varios estudios han demostrado el potencial protector de la inhibición de las caspasas por métodos farmacológicos o genéticos como neuroprotectores (54, 76-79). Sin embargo, la protección conferida por estrategias inhibitoras de caspasas, por ejemplo en neuronas, es limitada, temporal y los resultados son contradictorios. En algunos casos se ha demostrado protección en diversos modelos (80-84) mientras no en otros (85-88). Estos estudios sugieren que aunque existe cierta protección mediante la utilización de inhibidores de caspasas, sus efectos son específicos del tipo celular y el paradigma utilizado, y no siempre favorecen la supervivencia a largo plazo, ni la preservación de terminales nerviosas, ni la función celular normal, que son dos pilares claves en neuroprotección (3, 54, 78, 87).

La combinación de inhibidores de caspasas y factores de crecimiento, como neurotrofinas, han

demostrado su potencial neuroprotector, favoreciendo la supervivencia celular a largo plazo (54, 82, 87, 89, 90).

LA VÍA PI3K/AKT

La vía PI3K/Akt puede participar en la supervivencia celular y neuroprotección mediante el bloqueo de la apoptosis, al promover la proliferación celular y al regular vías adicionales de señalización celular. En neuronas la fosfatidil-inositol-3-quinasa (PI3K) y su mediador corriente abajo, proteína quinasa B o Akt (PKB/Akt), median señales de supervivencia, diferenciación y proliferación neuronal (91, 92).

Estas vías activadas por diversos factores de crecimiento (FC) son un punto crucial en el cual convergen diversas señales de supervivencia celular (93, 94). La unión de FC a los receptores tirosina quinasa causa autofosforilación de sus residuos tirosina, reclutamiento de proteínas adaptadoras como Shc, acoplamiento corriente abajo y activación de las vías PI3K/Akt y Raf/MEK/ERK (95-98).

PI3K consiste en una subunidad reguladora (85 kDa) y una catalítica (100 kDa) encargada de la fosforilación de lípidos de inositol para generar 3-fosfoinositoles (PI(3)P, PI(3,4)P₂ y PI(3,4,5)P₃). Éstos se unen a un dominio homólogo a plekstrina presente en una variedad de moléculas de señalización, alterando su actividad y localización subcelular (99). La función de supervivencia de PI3K en particular está mediada por la activación Akt (99-101). Recientemente se ha demostrado que la activación de Akt requiere su translocación a la membrana plasmática y la fosforilación en treonina 308 (Thr³⁰⁸) y serina 473 (Ser⁴⁷³) (102, 103). Los blancos corriente abajo de Akt son diversos, y se asocian a respuestas metabólicas y de supervivencia celular (104, 105). En neuronas, se ha

demostrado que Akt regula la supervivencia pero no el crecimiento y la diferenciación (94).

Los sustratos de Akt incluyen la inactivación por fosforilación de mediadores pro-apoptóticos (Bad, Bax, caspasa-9, factor de transcripción Forkhead, GSK-3, p53), y activación de proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL, IAP y mTOR) (figura 3) (100, 106-110). Por otro lado, algunas vías implicadas en la supervivencia celular como Akt y la hexoquinasa interfieren con la capacidad de Bax de alterar el $\Delta\psi_m$, abrir el PTP y liberar el citocromo C, e inducir muerte celular (111-113).

Probablemente Akt media la supervivencia neuronal a diferentes niveles dependiendo del tipo celular, de la disponibilidad de blancos y del requerimiento de eventos transcripcionales o postranscripcionales (114). El desarrollo de terapias dirigidas contra componentes específicos de la vía PI3K/Akt y sus blancos corriente abajo, puede constituir una de las principales opciones para la regulación de la muerte celular y un blanco terapéutico para favorecer la supervivencia neuronal de las poblaciones más susceptibles.

Adicional a su función en supresión de la muerte celular, los factores de crecimiento (FC) vía PI3K/Akt también regulan el metabolismo celular modulando la captación de glucosa (115-119). Poco se conoce acerca de la función de la vía PI3K/Akt en la regulación del metabolismo de la glucosa (glucólisis) y cómo ésta contribuye a las decisiones de supervivencia/muerte celular (120, 121).

A diferencia de las proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2, que mantienen la homeostasis mitocondrial en respuesta a remoción de FC al promover el transporte continuo de metabolitos a través de la membrana mitocondrial externa aún en presencia de metabolismo celular dismi-

nuido (122, 123), la supervivencia mediada por PI3K/Akt requiere de un suplemento continuo de sustratos metabólicos y, por ende, depende del metabolismo celular (116).

En modelos de ausencia de FC y de glucosa, la disminución en la glucólisis se ha asociado de forma consistente con estadios iniciales de apoptosis (depleción de ATP, translocación mitocondrial de Bax, activación de JNK, disminución $\Delta\psi_m$, y liberación de citocromo C al citoplasma). Estos cambios se generan debido a la ausencia de sustratos metabólicos derivados de la glucosa, ya que la sobreexpresión de Glut1 (transportador de glucosa) previene tales alteraciones (116, 124, 125). La sobreexpresión de Akt previene también las alteraciones asociadas a ausencia de FC y mantiene la supervivencia celular al estabilizar la bioenergética celular vía incremento en el transporte y metabolismo de glucosa (126). Se ha demostrado que Akt incrementa la actividad hexoquinasa, de tal forma que la hexoquinasa permanece asociada a la mitocondria y disminuye la muerte celular (127). Estos estudios sugieren que el acoplamiento entre glucólisis y la función mitocondrial es un prerrequisito para que los FC, y en particular Akt, medien sus efectos en supervivencia. Además, la actividad hexoquinasa es suficiente para que Akt inhiba la apoptosis (127). La forma como la vía PI3K/Akt regula la función hexoquinasa, su asociación/desplazamiento de VDAC, y la función mitocondrial, y cómo la actividad hexoquinasa contribuye a la supervivencia celular mediada por los FC, requieren mayor análisis. Así, la inhibición de la vía glucolítica a través de inhibición de la vía PI3K/Akt puede determinar eventos que dirigen las neuronas a muerte celular, y constituyen un blanco terapéutico poco explorado en EP.

En la EP, algunos estudios han evaluado el papel de la vía AKT y su relación directa con

algunas proteínas implicadas en esta enfermedad como las sinucleínas. Se ha reportado que éstas estabilizan Akt y favorecen su acción promoviendo la supervivencia celular (128). Además, su relación con algunas de las toxinas implicadas en la etiopatogénesis de la EP, como el MPTP, el rotenona, la OH-Dopamina parecen regular corriente abajo y negativamente la actividad Akt, favoreciendo así el proceso apoptótico de manera selectiva (129-131). Por otro lado, proteínas implicadas en fenómenos de neuroprotección, neurodegeneración como son la HSP o chaperonas moleculares (132-134), se han visto que regulan y estabilizan Akt evitando su defosforilación y, por ende, evitan la apoptosis y promueven la supervivencia celular (135, 136). Se plantea que de esta manera median su papel neuroprotector. Así mismo, algunos agonistas de los receptores dopaminérgicos que han mostrado evidencia en modelos experimentales de neuroprotección, también ejercen su efecto a través de la vía PI3K/Akt (137-139).

En el endotelio Akt promueve la supervivencia inhibiendo la apoptosis mediada por Fas al regular la expresión de FLIP (proteína inhibitoria de FLICE), FLIP interactúa con FADD (Dominio de muerte asociado a FAS), inhibiendo la activación de la caspasa 8 (figura 3C) (140). Además, Akt suprime la vía apoptótica mitocondrial al fosforilar Bad y la pro-caspasa 9 (figura 3B); Akt también promueve la degradación de I κ B incrementando así la actividad del NF κ B y estimulando la síntesis endotelial de óxido nítrico inhibiendo de esta manera las caspasas por nitrosilación (figura 3C) (140-142).

LA PROTEÍNA C ACTIADA

La proteína C es una serina proteasa y un anticoagulante natural que al unirse (en exceso de trombina) a la trombomodulina y a los re-

ceptores endoteliales de proteína C (EPCR) presentes en la superficie endotelial, produce la proteína C activada. Esta última interacciona con la proteína S inhibiendo los factores Va y VIII, limitando así la trombosis. Una segunda acción antitrombótica la realiza al formar un complejo con el inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1), facilitando así la fibrinólisis (143). La acción antiinflamatoria la realiza atenuando la expresión de factor de necrosis tumoral α (TNF α) y el factor nuclear κ B (NF κ B) (144). Estudios *in vitro* han demostrado que la proteína C se une a un receptor en los macrófagos e inhibe la producción del factor de necrosis tumoral (144). La proteína C activada también reduce la interacción neutrófilos-selectinas, y la inflamación mediada por citoquinas y trombina.

Estudios epidemiológicos han demostrado que la PCA es un factor de protección contra isquemia cerebral (145). En modelos de isquemia cerebral se ha demostrado efecto protector de la PCA al endotelio cerebral, a través de la regulación de la proteína P53 (dependiente de la inhibición de la transcripción), modulación de la tasa Bax/Bcl-2 y regulación de la actividad de caspasa 3. El efecto de la PCA depende de la activación inicial del receptor de proteína C endotelial (EPCR) seguida de la activación del receptor-1 activado por proteasa (PAR-1) (146). Adicionalmente, se ha demostrado que la protección conferida al endotelio cerebral por la PCA se relaciona con la capacidad de PAR-1 de regular los niveles intracelulares de calcio (147). Esta función protectora es diferente a la reportada para células endoteliales de otras fuentes, en las cuales el efecto protector de PCA se da a través de una reducción en la expresión de la subunidad p50 del NF κ B, inhibición de la síntesis de citoquinas (incluyendo TNF y moléculas de adhesión de la superficie celular tales como CX3C,

moléculas de adhesión intracelular-1, E-selectinas y moléculas de adhesión vascular-1), expresión de proteínas antiapoptóticas y de sobrevivencia celular (A1, inhibidor de apoptosis-1, sintetasa de óxido nítrico endotelial y A20) y disminución en la expresión de proteínas inductoras de apoptosis tales como calreticulina y TRMP-2 (148). Sin embargo, el efecto protector directo de la PCA en neuronas ha sido poco explorado. Recientemente, un estudio tanto *in vitro* como *in vivo* ha demostrado que la PCA neuroprotege contra la acción tóxica de la estaurosporina y contra la excitotoxicidad mediada por NMDA, en forma dependiente de PAR-1 y PAR-3 e independiente de EPCR (149). El rol antiapoptótico de la PCA contra ceramida permanece sin ser explorado.

CONCLUSIONES

La apoptosis celular se considera uno de los principales mecanismos fisiopatológicos involucrados en diversas enfermedades humanas, en particular en procesos neurodegenerativos y sépticos, que comprometen la muerte de grupos neuronales específicos y del endotelio respectivamente. La comprensión de los procesos de regulación de las vías de señalización intracelular implicadas en supervivencia/muerte celular, pueden generar nuevas herramientas farmacológicas o la implementación en nuevos paradigmas patológicos de algunas ya existentes, que permitan la regulación de la apoptosis (antiapoptosis) y el potenciamiento de las vías de supervivencia celular que favorezcan los procesos de viabilidad específica. El análisis de diferentes grupos de células permite una visión diferencial de los procesos celulares particulares a cada una, como la muerte celular, y la definición de vías célula-específicas involucradas en estos procesos, que contribuyen al mejor entendimiento de tales mecanismos.

La correlación funcional y patológica endotelio-neuronas, en el contexto de la función de la barrera hemato-encefálica, se convierte en la actualidad en un área de amplio análisis dada su importancia como regulador de la fisiología normal del sistema nervioso y de su compromiso en el marco de enfermedades neurodegenerativas y procesos sépticos. De tal forma que el análisis de los procesos de muerte endotelial en los procesos sépticos y neuronales en neurodegeneración, permitirá ayudar a la comprensión de mecanismos, ya sean similares o no, que desencadenan la muerte de estos tipos celulares y que pudieran desembarcar en novedosas estrategias protectoras similares. En tal sentido, es interesante mencionar que la proteína C activada aparece como una estrategia terapéutica en casos severos de sepsis mediante su acción

antiapoptótica en endotelio. Sin embargo, su acción en neuronas ha sido poco explorada y podría convertirse en una alternativa como agente neuroprotector, ya sea mediante su acción directa en las neuronas o indirectamente mediante la protección endotelial.

Dentro del grupo de Ciencias Básicas Médicas de la Facultad de Medicina de la Universidad del Rosario se viene consolidando una línea de investigación en el campo de la muerte celular, la cual busca realizar investigación básica a nivel celular y molecular de potenciales terapias para prevenir la muerte celular en modelos *in vitro* de neuronas mesencefálicas y endotelio, con la mira, a corto plazo, de ampliar los hallazgos *in vitro* a modelos animales de experimentación de enfermedad de Parkinson, barrera hemato-encefálica y sepsis.

BIBLIOGRAFÍA

1. Olanow CW, Tatton WG. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci* 1999;22:123-44:123-144.
2. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001;29(7):1303-1310.
3. Alexi T, Borlongan CV, Faull RL, Williams CE, Clark RG, Gluckman PD et al. Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases. *Prog Neurobiol* 2000;60(5):409-470.
4. Bjorklund A, Lindvall O. Parkinson disease gene therapy moves toward the clinic. *Nat Med* 2000;6(11):1207-1208.
5. Dawson TM, Dawson VL. Neuroprotective and neurorestorative strategies for Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 2002;5 Suppl:1058-61:1058-1061.
6. Bjorklund LM, Sanchez-Pernaute R, Chung S, Andersson T, Chen IY, McNaught KS et al. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(4):2344-2349.
7. Isacson O. Models of repair mechanisms for future treatment modalities of Parkinson's disease. *Brain Res Bull* 2002;57(6):839-846.
8. Clarke PG. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol (Berl)* 1990;181(3):195-213.
9. Portera-Cailliau C, Hedreen JC, Price DL, Koliatsos VE. Evidence for apoptotic cell death in Huntington disease and excitotoxic animal models. *J Neurosci* 1995;15(5 Pt 2):3775-3787.

Figura 1. Vías generales de apoptosis

Se han caracterizado dos vías generales de iniciación de apoptosis: la vía extrínseca dirigida por la estimulación de receptores de muerte y la activación de caspasas iniciadoras que activan caspasas ejecutoras directamente o a través de alteraciones mitocondriales mediadas por miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2 como Bax y Bid; y la vía intrínseca iniciada por alteraciones celulares como daño al ADN y estrés del retículo endoplásmico, que dirigen alteraciones en la homeostasis mitocondrial y la subsecuente activación de caspasas ejecutoras. Las alteraciones mitocondriales a través de cualquiera de las dos vías parece ser el determinante clave del compromiso de muerte celular. La perturbación de la permeabilidad mitocondrial causa la liberación de moléculas proapoptóticas como el citocromo C, Apaf-1, Smac/Diablo entre otras, que conducen a la formación del apoptosoma de una manera dependiente de ATP. El apoptosoma a su vez dirige el clivaje y la activación de la caspasa 9, y la inhibición de las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP). De esta manera se asegura la activación de las caspasas ejecutoras (caspasa 3, 7), el clivaje de diversos sustratos celulares y la apoptosis.

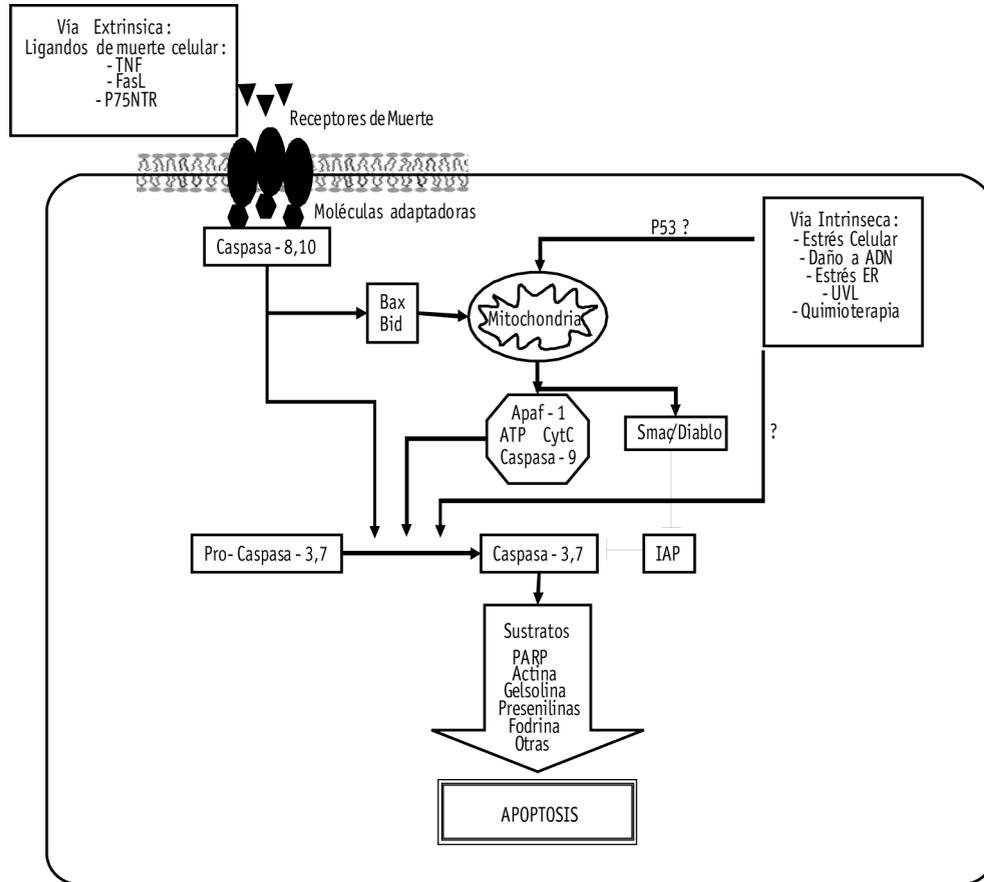


Figura 2. Consecuencias generales de la apertura del poro de permeabilidad transicional mitocondrial (mPTP) en apoptosis

El PTP controla la liberación de mediadores pro-apoptóticos de la mitocondrial al citosol y se encarga de mantener el potencial de membrana mitocondrial (pmm). El PTP es regulado por las proteínas de la familia Bcl-2: (A) proteínas antiapoptóticas (Bcl-2 y Bcl-xL) inhiben la apertura del PTP, mientras (B) proteínas proapoptóticas (Bax y Bad) causan apertura del PTP.

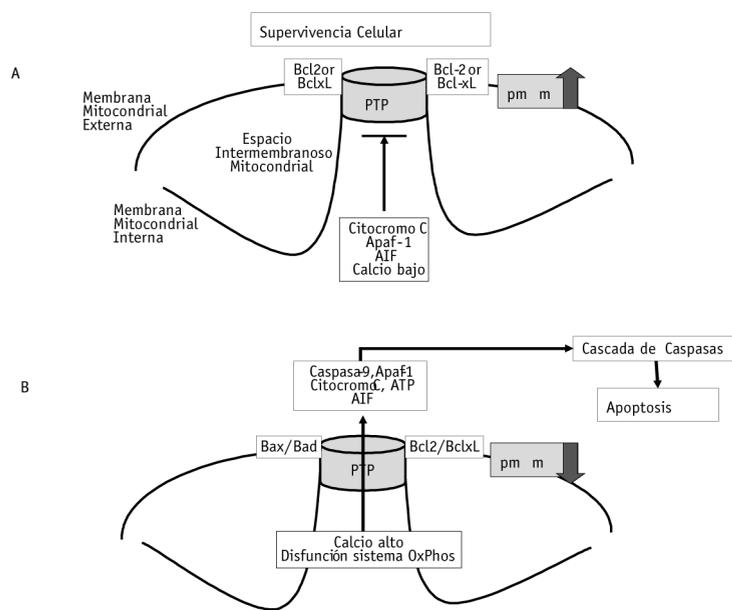
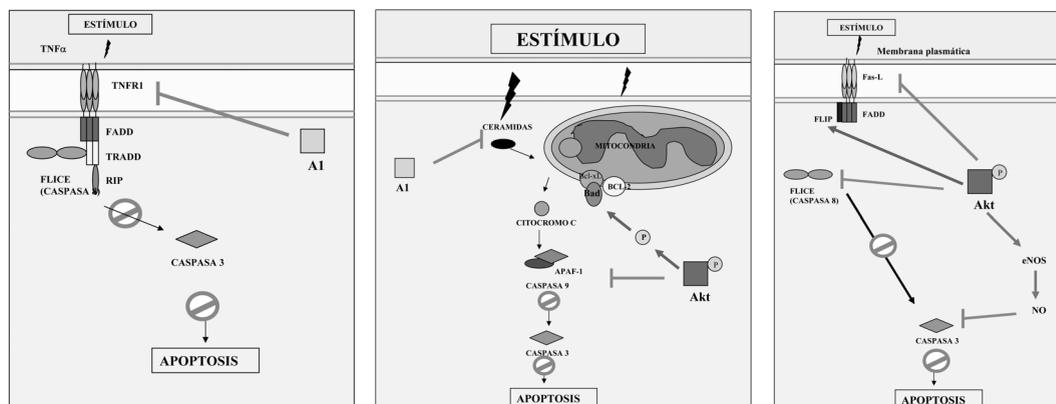


Figura 3. Estrategias antiapoptóticas en endotelio

A. Inhibición de la apoptosis mediada por TNF por la proteína A1 (miembro de la familia de la Bcl-2). B. Inhibición de la apoptosis mediada por ceramida por acción de la proteína A1. Akt inhibe la vía apoptótica mitocondrial por medio de la fosforilación de Bad y la procaspasa 9. C. Akt inhibe la apoptosis mediada por Fas y la activación de caspasa 8 (izquierda). Akt estimula la síntesis de óxido nítrico (derecha) que genera nitrosilación e inhibición de caspasa 3.



10. Kuan CY, Roth KA, Flavell RA, Rakic P. Mechanisms of programmed cell death in the developing brain. *Trends Neurosci* 2000;23(7):291-297.
11. Wyllie AH, Golstein P. More than one way to go. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(1):11-13.
12. Mattson MP. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000; 1(2):120-129.
13. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407(6805):770-776.
14. Haeblerlein SL. Mitochondrial function in apoptotic neuronal cell death. *Neurochem Res* 2004;29(3):521-530.
15. Mattson MP, Kroemer G. Mitochondria in cell death: novel targets for neuroprotection and cardioprotection. *Trends Mol Med* 2003;9(5):196-205.
16. Stoica BA, Movsesyan VA, Lea PM, Faden AI. Ceramide-induced neuronal apoptosis is associated with dephosphorylation of Akt, BAD, FKHR, GSK-3beta, and induction of the mitochondrial-dependent intrinsic caspase pathway. *Mol Cell Neurosci* 2003; 22(3):365-382.
17. Zhang HG, Wang J, Yang X, Hsu HC, Mountz JD. Regulation of apoptosis proteins in cancer cells by ubiquitin. *Oncogene* 2004;23(11):2009-2015.
18. Levi M. The imbalance between tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in sepsis. *Crit Care Med* 2002;30(8):1914-1915.
19. Aird WC. Vascular bed-specific hemostasis: role of endothelium in sepsis pathogenesis. *Crit Care Med* 2001; 29(7 Suppl):S28-S34.
20. Jacobi J. Pathophysiology of sepsis. *Am J Health Syst Pharm* 2002; 59 Suppl 1:S3-8.:S3-S8.
21. Lowy FD. Staphylococcus aureus infections. *N Engl J Med* 1998; 20;339(8):520-532.
22. Oberholzer C, Oberholzer A, Clare-Salzler M, Moldawer LL. Apoptosis in sepsis: a new target for therapeutic exploration. *FASEB J* 2001;15(6):879-892.
23. Grinnell BW, Joyce D. Recombinant human activated protein C: a system modulator of vascular function for treatment of severe sepsis. *Crit Care Med* 2001; 29(7 Suppl):S53-S60.
24. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Karl IE. Endothelial cell apoptosis in sepsis. *Crit Care Med* 2002;30(5 Suppl):S225-S228.
25. Papanthassoglou ED, Moynihan JA, Ackerman MH. Does programmed cell death (apoptosis) play a role in the development of multiple organ dysfunction in critically ill patients? a review and a theoretical framework. *Crit Care Med* 2000; 28(2):537-549.
26. Honig LS, Rosenberg RN. Apoptosis and neurologic disease. *Am J Med* 2000; 108(4):317-330.
27. Yuan J, Yankner BA. Apoptosis in the nervous system. *Nature* 2000; 407(6805):802-809.
28. Ariga T, Jarvis WD, Yu RK. Role of sphingolipid-mediated cell death in neurodegenerative diseases. *J Lipid Res* 1998; 39(1):1-16.
29. Kim MY, Linardic C, Obeid L, Hannun Y. Identification of sphingomyelin turnover as an effector mechanism for the action of tumor necrosis factor alpha and gamma-interferon. Specific role in cell differentiation. *J Biol Chem* 1991; 266(1):484-489.
30. Kolesnick R. Signal transduction through the sphingomyelin pathway. *Mol Chem Neuropathol* 1994; 21(2-3):287-297.
31. Tanner CM, Ottman R, Goldman SM, Ellenberg J, Chan P, Mayeux R et al. Parkinson disease in twins: an etiologic study. *JAMA* 1999; 281(4):341-346.
32. Langston JW. The etiology of Parkinson's disease with emphasis on the MPTP story. *Neurology* 1996; 47(6 Suppl 3):S153-S160.

33. Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 2000; 3(12):1301-1306.
34. Soto-Otero R, Mendez-Alvarez E, Hermida-Ameijeiras A, Munoz-Patino AM, Labandeira-Garcia JL. Autoxidation and neurotoxicity of 6-hydroxydopamine in the presence of some antioxidants: potential implication in relation to the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neurochem* 2000; 74(4):1605-1612.
35. France-Lanord V, Brugg B, Michel PP, Agid Y, Ruberg M. Mitochondrial free radical signal in ceramide-dependent apoptosis: a putative mechanism for neuronal death in Parkinson's disease. *J Neurochem* 1997; 69(4):1612-1621.
36. Verdile G, Fuller S, Atwood CS, Laws SM, Gandy SE, Martins RN. The role of beta amyloid in Alzheimer's disease: still a cause of everything or the only one who got caught? *Pharmacol Res* 2004; 50(4):397-409.
37. Cribbs DH, Poon WW, Rissman RA, Blurton-Jones M. Caspase-mediated degeneration in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 2004; 165(2):353-355.
38. Jenner P. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2003; 53 Suppl 3:S26-36; discussion S36-8.:S26-S36.
39. Schapira AH, Gu M, Taanman JW, Tabrizi SJ, Seaton T, Cleeter M et al. Mitochondria in the etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1998; 44(3 Suppl 1):S89-S98.
40. McNaught KS, Olanow CW. Proteolytic stress: a unifying concept for the etiopathogenesis of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2003; 53 Suppl 3:S73-84; discussion S84-6.:S73-S84.
41. Le Couteur DG, Muller M, Yang MC, Mellick GD, McLean AJ. Age-environment and gene-environment interactions in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Rev Environ Health* 2002; 17(1):51-64.
42. Tatton NA. Increased caspase 3 and Bax immunoreactivity accompany nuclear GAPDH translocation and neuronal apoptosis in Parkinson's disease. *Exp Neurol* 2000; 166(1):29-43.
43. Marshall KA, Daniel SE, Cairns N, Jenner P, Halliwell B. Upregulation of the anti-apoptotic protein Bcl-2 may be an early event in neurodegeneration: studies on Parkinson's and incidental Lewy body disease. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 240(1):84-87.
44. Tatton WG, Olanow CW. Apoptosis in neurodegenerative diseases: the role of mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1410(2):195-213.
45. Jordan J, Cena V, Prehn JH. Mitochondrial control of neuron death and its role in neurodegenerative disorders. *J Physiol Biochem* 2003; 59(2):129-141.
46. Siskind LJ, Colombini M. The lipids C2- and C16-ceramide form large stable channels. Implications for apoptosis. *J Biol Chem* 2000; 275(49):38640-38644.
47. Garcia-Ruiz C, Colell A, Mari M, Morales A, Fernandez-Checa JC. Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione. *J Biol Chem* 1997; 272(17):11369-11377.
48. Di Paola M, Cocco T, Lorusso M. Ceramide interaction with the respiratory chain of heart mitochondria. *Biochemistry* 2000; 39(22):6660-6668.
49. Birbes H, Bawab SE, Obeid LM, Hannun YA. Mitochondria and ceramide: intertwined roles in regulation of apoptosis. *Adv Enzyme Regul* 2002; 42:113-29.:113-129.
50. Hartley A, Stone JM, Heron C, Cooper JM, Schapira AH. Complex I inhibitors induce dose-dependent apoptosis in PC12 cells: relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem* 1994; 63(5):1987-1990.

51. Glinka Y, Tipton KE, Youdim MB. Mechanism of inhibition of mitochondrial respiratory complex I by 6-hydroxydopamine and its prevention by desferrioxamine. *Eur J Pharmacol* 1998; 351(1):121-129.
52. Jordan J, Galindo ME, Tornero D, Gonzalez-Garcia C, Cena V. Bcl-xL blocks mitochondrial multiple conductance channel activation and inhibits 6-OHDA-induced death in SH-SY5Y cells. *J Neurochem* 2004; 89(1):124-133.
53. Jellinger KA. Cell death mechanisms in Parkinson's disease. *J Neural Transm* 2000; 107(1):1-29.
54. Arboleda G, Waters C, Gibson RM. Metabolic Activity: A Novel Indicator of Neuronal Survival in the Murine Dopaminergic Cell Line CAD. *J Mol Neurosci* 2005; 27(1):65-78.
55. Brown R. The bcl-2 family of proteins. *Br Med Bull* 1997; 53(3):466-477.
56. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; 281(5381):1322-1326.
57. Allen RT, Cluck MW, Agrawal DK. Mechanisms controlling cellular suicide: role of Bcl-2 and caspases. *Cell Mol Life Sci* 1998; 54(5):427-445.
58. Kidd VJ. Proteolytic activities that mediate apoptosis. *Annu Rev Physiol* 1998; 60:533-73.:533-573.
59. Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990; 348(6299):334-336.
60. Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Susin SA, Beutner G, Brdiczka D et al. The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and BCL-2-related proteins. *J Exp Med* 1998; 20;187(8):1261-1271.
61. Zamzami N, Brenner C, Marzo I, Susin SA, Kroemer G. Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins. *Oncogene* 1998; 16(17):2265-2282.
62. Vander Heiden MG, Thompson CB. Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nat Cell Biol* 1999; 1(8):E209-E216.
63. Gao CF, Ren S, Zhang L, Nakajima T, Ichinose S, Hara T et al. Caspase-dependent cytosolic release of cytochrome c and membrane translocation of Bax in p53-induced apoptosis. *Exp Cell Res* 2001; 265(1):145-151.
64. Putcha GV, Deshmukh M, Johnson EM, Jr. BAX translocation is a critical event in neuronal apoptosis: regulation by neuroprotectants, BCL-2, and caspases. *J Neurosci* 1999; 19(17):7476-7485.
65. Brenner C, Cadiou H, Vieira HL, Zamzami N, Marzo I, Xie Z et al. Bcl-2 and Bax regulate the channel activity of the mitochondrial adenine nucleotide translocator. *Oncogene* 2000; 20;19(3):329-336.
66. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 1999; 13(15):1899-1911.
67. Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 2000; 6(5):513-519.
68. Banasiak KJ, Xia Y, Haddad GG. Mechanisms underlying hypoxia-induced neuronal apoptosis. *Prog Neurobiol* 2000; 62(3):215-249.
69. Korsmeyer SJ, Gross A, Harada H, Zha J, Wang K, Yin XM et al. Death and survival signals determine active/inactive conformations of pro-apoptotic BAX, BAD, and BID molecules. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1999; 64:343-50.:343-350.
70. Noble KE, Wickremasinghe RG, DeCornet C, Panayiotidis P, Yong KL. Monocytes stimulate expression of the Bcl-2 family member, A1, in endothelial cells and confer protection against apoptosis. *J Immunol* 1999; 162(3):1376-1383.
71. Stroka DM, Badrichani AZ, Bach FH, Ferran C. Overexpression of A1, an NF-kappaB-inducible anti-apoptotic bcl gene, inhibits endothelial cell activation. *Blood* 1999; 93(11):3803-3810.

72. Vila M, Jackson-Lewis V, Vukosavic S, Djaldetti R, Liberatore G, Offen D et al. Bax ablation prevents dopaminergic neurodegeneration in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(5):2837-2842.
73. Yang L, Matthews RT, Schulz JB, Klockgether T, Liao AW, Martinou JC et al. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity is attenuated in mice overexpressing Bcl-2. *J Neurosci* 1998; 18(20):8145-8152.
74. Offen D, Beart PM, Cheung NS, Pascoe CJ, Hochman A, Gorodin S et al. Transgenic mice expressing human Bcl-2 in their neurons are resistant to 6-hydroxydopamine and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(10):5789-5794.
75. Cryns V, Yuan J. Proteases to die for. *Genes Dev* 1998; 12(11):1551-1570.
76. Bilsland J, Harper S. Caspases and neuroprotection. *Curr Opin Investig Drugs* 2002; 3(12):1745-1752.
77. Holtzman DM, Deshmukh M. Caspases: a treatment target for neurodegenerative disease? *Nat Med* 1997; 3(9):954-955.
78. Nicholson DW. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature* 2000; 407(6805):810-816.
79. Robertson GS, Crocker SJ, Nicholson DW, Schulz JB. Neuroprotection by the inhibition of apoptosis. *Brain Pathol* 2000; 10(2):283-292.
80. Deshmukh M, Vasilakos J, Deckwerth TL, Lampe PA, Shivers BD, Johnson EM, Jr. Genetic and metabolic status of NGF-deprived sympathetic neurons saved by an inhibitor of ICE family proteases. *J Cell Biol* 1996; 135(5):1341-1354.
81. Amarante-Mendes GP, Finucane DM, Martin SJ, Cotter TG, Salvesen GS, Green DR. Anti-apoptotic oncogenes prevent caspase-dependent and independent commitment for cell death. *Cell Death Differ* 1998; 5(4):298-306.
82. Eberhardt O, Coelln RV, Kugler S, Lindenau J, Rathke-Hartlieb S, Gerhardt E et al. Protection by synergistic effects of adenovirus-mediated X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis and glial cell line-derived neurotrophic factor gene transfer in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 2000; 20(24):9126-9134.
83. Bilsland J, Roy S, Xanthoudakis S, Nicholson DW, Han Y, Grimm E et al. Caspase inhibitors attenuate 1-methyl-4-phenylpyridinium toxicity in primary cultures of mesencephalic dopaminergic neurons. *J Neurosci* 2002; 22(7):2637-2649.
84. Viswanath V, Wu Y, Boonplueang R, Chen S, Stevenson FF, Yantiri F et al. Caspase-9 activation results in downstream caspase-8 activation and bid cleavage in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinson's disease. *J Neurosci* 2001; 21(24):9519-9528.
85. McCarthy NJ, Whyte MK, Gilbert CS, Evan GI. Inhibition of Ced-3/ICE-related proteases does not prevent cell death induced by oncogenes, DNA damage, or the Bcl-2 homologue Bak. *J Cell Biol* 1997; 136(1):215-227.
86. Gibson RM. Caspase activation is downstream of commitment to apoptosis of Ntera-2 neuronal cells. *Exp Cell Res* 1999; 251(1):203-212.
87. Von Coelln R, Kugler S, Bahr M, Weller M, Dichgans J, Schulz JB. Rescue from death but not from functional impairment: caspase inhibition protects dopaminergic cells against 6-hydroxydopamine-induced apoptosis but not against the loss of their terminals. *J Neurochem* 2001; 77(1):263-273.
88. Hartmann A, Troadec JD, Hunot S, Kikly K, Faucheux BA, Mouatt-Prigent A et al. Caspase-8 is an effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease, but pathway inhibition results in neuronal necrosis. *J Neurosci* 2001; 21(7):2247-2255.

89. Deshmukh M, Kuida K, Johnson EM, Jr. Caspase inhibition extends the commitment to neuronal death beyond cytochrome c release to the point of mitochondrial depolarization. *J Cell Biol* 2000; 150(1):131-143.
90. Zaman V, Shetty AK. Combined neurotrophic supplementation and caspase inhibition enhances survival of fetal hippocampal CA3 cell grafts in lesioned CA3 region of the aging hippocampus. *Neuroscience* 2002; 109(3):537-553.
91. Zhou H, Summers SA, Birnbaum MJ, Pittman RN. Inhibition of Akt kinase by cell-permeable ceramide and its implications for ceramide-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1998; 273(26):16568-16575.
92. Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 2001; 24:677-736.:677-736.
93. Kandel ES, Hay N. The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp Cell Res* 1999; 253(1):210-229.
94. Kaplan DR, Cooper E. PI-3 kinase and IP3: partners in NT3-induced synaptic transmission. *Nat Neurosci* 2001; 4(1):5-7.
95. Bibel M, Barde YA. Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev* 2000; 14(23):2919-2937.
96. Chao MV. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci* 2003; 4(4):299-309.
97. Huang EJ, Reichardt LF. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* 2003; 72:609-42. Epub; 2003 Mar 27.:609-642.
98. Kaplan DR, Miller FD. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 2000; 10(3):381-391.
99. Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* 1997; 88(4):435-437.
100. Dudek H, Datta SR, Franke TF, Birnbaum MJ, Yao R, Cooper GM et al. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* 1997; 275(5300):661-665.
101. Kennedy SG, Wagner AJ, Conzen SD, Jordan J, Bellacosa A, Tsichlis PN et al. The PI 3-kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal. *Genes Dev* 1997; 11(6):701-713.
102. Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P et al. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J* 1996; 15(23):6541-6551.
103. Scheid MP, Marignani PA, Woodgett JR. Multiple phosphoinositide 3-kinase-dependent steps in activation of protein kinase B. *Mol Cell Biol* 2002; 22(17):6247-6260.
104. Tanti JE, Grillo S, Gremeaux T, Coffier PJ, Van Obberghen E, Marchand-Brustel Y. Potential role of protein kinase B in glucose transporter 4 translocation in adipocytes. *Endocrinology* 1997; 138(5):2005-2010.
105. Marte BM, Downward J. PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond. *Trends Biochem Sci* 1997; 22(9):355-358.
106. Brunet A, Datta SR, Greenberg ME. Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Curr Opin Neurobiol* 2001; 11(3):297-305.
107. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 1997; 91(2):231-241.
108. Kennedy SG, Kandel ES, Cross TK, Hay N. Akt/Protein kinase B inhibits cell death by preventing the release of cytochrome c from mitochondria. *Mol Cell Biol* 1999; 19(8):5800-5810.

109. Gao N, Zhang Z, Jiang BH, Shi X. Role of PI3K/AKT/mTOR signaling in the cell cycle progression of human prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 310(4):1124-1132.
110. Zheng WH, Kar S, Quirion R. Insulin-like growth factor-1-induced phosphorylation of transcription factor FKHL1 is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase/Akt kinase and role of this pathway in insulin-like growth factor-1-induced survival of cultured hippocampal neurons. *Mol Pharmacol* 2002; 62(2):225-233.
111. Pastorino JG, Shulga N, Hoek JB. Mitochondrial binding of hexokinase II inhibits Bax-induced cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem* 2002; 277(9):7610-7618.
112. Tsuruta F, Masuyama N, Gotoh Y. The phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt pathway suppresses Bax translocation to mitochondria. *J Biol Chem* 2002; 277(16):14040-14047.
113. Yamaguchi H, Wang HG. The protein kinase PKB/Akt regulates cell survival and apoptosis by inhibiting Bax conformational change. *Oncogene* 2001; 20(53):7779-7786.
114. Rokudai S, Fujita N, Hashimoto Y, Tsuruo T. Cleavage and inactivation of antiapoptotic Akt/PKB by caspases during apoptosis. *J Cell Physiol* 2000; 182(2):290-296.
115. Hajduch E, Alessi DR, Hemmings BA, Hundal HS. Constitutive activation of protein kinase B alpha by membrane targeting promotes glucose and system a amino acid transport, protein synthesis, and inactivation of glycogen synthase kinase 3 in L6 muscle cells. *Diabetes* 1998; 47(7):1006-1013.
116. Vander Heiden MG, Plas DR, Rathmell JC, Fox CJ, Harris MH, Thompson CB. Growth factors can influence cell growth and survival through effects on glucose metabolism. *Mol Cell Biol* 2001; 21(17):5899-5912.
117. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 1995; 378(6559):785-789.
118. Zheng WH, Kar S, Dore S, Quirion R. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1): a neuroprotective trophic factor acting via the Akt kinase pathway. *J Neural Transm Suppl* 2000;(60):261-272.
119. Plas DR, Thompson CB. Cell metabolism in the regulation of programmed cell death. *Trends Endocrinol Metab* 2002; 13(2):75-78.
120. Hajduch E, Litherland GJ, Hundal HS. Protein kinase B (PKB/Akt)—A key regulator of glucose transport? *FEBS Lett* 2001; 492(3):199-203.
121. Coffey PJ, Jin J, Woodgett JR. Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Biochem J* 1998; 335(Pt 1):1-13.
122. Vander Heiden MG, Chandel NS, Li XX, Schumacker PT, Colombini M, Thompson CB. Outer mitochondrial membrane permeability can regulate coupled respiration and cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(9):4666-4671.
123. Vander Heiden MG, Chandel NS, Schumacker PT, Thompson CB. Bcl-xL prevents cell death following growth factor withdrawal by facilitating mitochondrial ATP/ADP exchange. *Mol Cell* 1999; 3(2):159-167.
124. Rathmell JC, Vander Heiden MG, Harris MH, Frauwirth KA, Thompson CB. In the absence of extrinsic signals, nutrient utilization by lymphocytes is insufficient to maintain either cell size or viability. *Mol Cell* 2000; 6(3):683-692.
125. Moley KH, Mueckler MM. Glucose transport and apoptosis. *Apoptosis* 2000; 5(2):99-105.
126. Plas DR, Talapatra S, Edinger AL, Rathmell JC, Thompson CB. Akt and Bcl-xL promote growth factor-independent survival through distinct effects on mitochondrial physiology. *J Biol Chem* 2001; 276(15):12041-12048.

127. Gottlob K, Majewski N, Kennedy S, Kandel E, Robey RB, Hay N. Inhibition of early apoptotic events by Akt/PKB is dependent on the first committed step of glycolysis and mitochondrial hexokinase. *Genes Dev* 2001; 15(11):1406-1418.
128. Hashimoto M, Bar-On P, Ho G, Takenouchi T, Rockenstein E, Crews L et al. Beta-synuclein regulates Akt activity in neuronal cells. A possible mechanism for neuroprotection in Parkinson's disease. *J Biol Chem* 2004; 279(22):23622-23629.
129. Halvorsen EM, Dennis J, Keeney P, Sturgill TW, Tuttle JB, Bennett JB, Jr. Methylpyridinium (MPP(+))- and nerve growth factor-induced changes in pro- and anti-apoptotic signaling pathways in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Brain Res* 2002; 952(1):98-110.
130. Ha KS, Kim KM, Kwon YG, Bai SK, Nam WD, Yoo YM et al. Nitric oxide prevents 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in PC12 cells through CGMP-dependent PI3 kinase/Akt activation. *FASEB J* 2003; 17(9):1036-1047.
131. Shimoke K, Chiba H. Nerve growth factor prevents 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced cell death via the Akt pathway by suppressing caspase-3-like activity using PC12 cells: relevance to therapeutical application for Parkinson's disease. *J Neurosci Res* 2001; 63(5):402-409.
132. Auluck PK, Chan HY, Trojanowski JQ, Lee VM, Bonini NM. Chaperone suppression of alpha-synuclein toxicity in a *Drosophila* model for Parkinson's disease. *Science* 2002; 295(5556):865-868.
133. Warrick JM, Chan HY, Gray-Board, Chai Y, Paulson HL, Bonini NM. Suppression of polyglutamine-mediated neurodegeneration in *Drosophila* by the molecular chaperone HSP70. *Nat Genet* 1999; 23(4):425-428.
134. Klucken J, Shin Y, Masliah E, Hyman BT, McLean PJ. Hsp70 Reduces alpha-Synuclein Aggregation and Toxicity. *J Biol Chem* 2004; 279(24):25497-25502.
135. Sato S, Fujita N, Tsuruo T. Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(20):10832-10837.
136. Nakagomi S, Suzuki Y, Namikawa K, Kiryu-Seo S, Kiyama H. Expression of the activating transcription factor 3 prevents c-Jun N-terminal kinase-induced neuronal death by promoting heat shock protein 27 expression and Akt activation. *J Neurosci* 2003; 23(12):5187-5196.
137. Nair VD, Sealfon SC. Agonist-specific transactivation of phosphoinositide 3-kinase signaling pathway mediated by the dopamine D2 receptor. *J Biol Chem* 2003; 278(47):47053-47061.
138. Kihara T, Shimohama S, Sawada H, Honda K, Nakamizo T, Kanki R et al. Protective effect of dopamine D2 agonists in cortical neurons via the phosphatidylinositol 3 kinase cascade. *J Neurosci Res* 2002; 70(3):274-282.
139. Brami-Cherrier K, Valjent E, Garcia M, Pages C, Hipskind RA, Caboche J. Dopamine induces a PI3-kinase-independent activation of Akt in striatal neurons: a new route to cAMP response element-binding protein phosphorylation. *J Neurosci* 2002; 22(20):8911-8921.
140. Suhara T, Mano T, Oliveira BE, Walsh K. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling controls endothelial cell sensitivity to Fas-mediated apoptosis via regulation of FLICE-inhibitory protein (FLIP). *Circ Res* 2001; 89(1):13-19.
141. Khwaja A. Akt is more than just a Bad kinase. *Nature* 1999; 401(6748):33-34.
142. Nofer JR, Levkau B, Wolinska I, Junker R, Fobker M, von Eckardstein A et al. Suppression of endothelial cell apoptosis by high density lipoproteins (HDL) and HDL-associated lysosphingolipids. *J Biol Chem* 2001; 276(37):34480-34485.

143. Faust SN, Heyderman RS, Levin M. Coagulation in severe sepsis: a central role for thrombomodulin and activated protein C. *Crit Care Med* 2001; 29(7 Suppl):S62-S67.
144. White B, Schmidt M, Murphy C, Livingstone W, O'Toole D, Lawler M et al. Activated protein C inhibits lipopolysaccharide-induced nuclear translocation of nuclear factor kappaB (NF-kappaB) and tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) production in the THP-1 monocytic cell line. *Br J Haematol* 2000; 110(1):130-134.
145. Griffin JH, Fernandez JA, Liu D, Cheng T, Guo H, Zlokovic BV. Activated protein C and ischemic stroke. *Crit Care Med* 2004; 32(5 Suppl):S247-S253.
146. Cheng T, Liu D, Griffin JH, Fernandez JA, Castellino F, Rosen ED et al. Activated protein C blocks p53-mediated apoptosis in ischemic human brain endothelium and is neuroprotective. *Nat Med* 2003; 9(3):338-342.
147. Domotor E, Benzakour O, Griffin JH, Yule D, Fukudome K, Zlokovic BV. Activated protein C alters cytosolic calcium flux in human brain endothelium via binding to endothelial protein C receptor and activation of protease activated receptor-1. *Blood* 2003; 101(12):4797-4801.
148. Joyce DE, Gelbert L, Ciaccia A, DeHoff B, Grinnell BW. Gene expression profile of antithrombotic protein c defines new mechanisms modulating inflammation and apoptosis. *J Biol Chem* 2001; 276(14):11199-11203.
149. Guo H, Liu D, Gelbard H, Cheng T, Insalaco R, Fernandez JA et al. Activated protein C prevents neuronal apoptosis via protease activated receptors 1 and 3. *Neuron* 2004; 19;41(4):563-572.