



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

VI. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2025eko maiatzaren 28, 29 eta 30a
Bilbo, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)



Aitortu-PartekatuBerdin 4.0

OSASUN ZIENTZIAK

**Kaspasa-8 eta Biden aktibazioa
AMPAk oligodendroitoetan
bideraturiko apoptosi-
mekanismoetan**

*Laura Bayón-Cordero,
Irene Luengas-Escuza,
Blanca Isabel Ochoa-Bueno,
Uxue Balantzategi,
Manuel Canedo-Antelo,
Carlos Matute eta
María Victoria Sánchez-Gómez*

241-248 or.
<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.vi.04.29>

ANTOLATZAILEA



BABESLEAK



LAGUNTZAILEAK



Kaspasa-8 eta Bide aktibazioa AMPAk oligodendroitoetan bideraturiko apoptosi-mekanismoetan

Laura Bayón-Cordero^{*,#}, Irene Luengas-Escuza^{*}, Blanca Isabel Ochoa-Bueno, Uxue Balantzategi, Manuel Canedo-Antelo, Carlos Matute, María Victoria Sánchez-Gómez[#]

1. Neurozientziak Saila, Euskal Herriko Unibertsitatea, Sarriena auzoa, Leioa.
2. Achucarro Basque Center for Neuroscience, Sarriena auzoa, Leioa.

**Ikerlari hauen parte-hartzea berdina izan da*

#Kontakturako e-posta: laura.bayon@ehu.eus, vicky.sanchez@ehu.eus

Laburpena

Glutamatoak eragindako eszitotoxikotasunak oligodendroitoen heriotza eragiten du, eta esklerosi anizkoitza bezalako gaixotasun desmielinizatzaileen garapenean laguntzen du. Ikerketa honetan, arratoien garun-azaleko oligodendroitoetan, AMPA hartzaileen bidez bideratutako eszitotoxikotasunean kaspasa-8k eta haren iturria den Bid elementu apoptotikoak jokatzen duten papera aztertu dugu. Gure emaitzek erakusten dute AMPA hartzaileen aktibazioak kaspasa-8ren aktibazioa eragiten duela, eta horrek, aldi berean, Bide truncakzioa eta ondorengo oligodendroito-heriotza dakarrela. Aurkikuntza hauek adierazten dute Bid iturria baliogarria izan daitekeela gaixotasun desmielinizatzaileetan gertatzen den oligodendroito-galerari aurre egiteko.

Hitz gakoak: oligodendroitoa, eszitotoxikotasuna, kaspasa-8, Bid

Abstract

Glutamate-induced excitotoxicity leads to oligodendrocyte death and contributes to the progression of demyelinating diseases, such as multiple sclerosis. In this study, we investigated the role of the apoptotic elements caspase-8 and its downstream target Bid in AMPA receptor mediated excitotoxicity in rat cortical oligodendrocytes. Our results demonstrate that AMPA receptor activation triggers caspase-8 activation, leading to Bid truncation and oligodendrocyte death. These findings identify Bid as a promising target to develop strategies to prevent oligodendrocyte loss in demyelinating disorders.

Keywords: oligodendrocyte, excitotoxicity, caspase-8, Bid

1. Sarrera eta motibazioa

Eszitotoxikotasuna aminoazido kitzikatzailerik batzuekiko gehiegizko esposizioaren ondorioz zelula mota batzuetan gertatzen den prozesu bat da. Horren eraginez, zelula-heriotza gertatzen da (Lucas eta Newhouse, 1957). Nerbio-sistema zentrolean, glutamatoa da neurotransmisore kitzikatzailerik nagusia, eta haren homeostiaren aldaketek eszitotoxikotasun-prozesuak susta ditzakete (Michaelis, 1998). Hots, glutamatoaren homeostiaren aldaketek zelula-kalteak eta zelula-heriotza eragiten dituzte.

Oligodendroitoak, nerbio-sistema zentrolean mielina sortzen duten zelulak, neurotransmisore ugariren hartzaileak adierazten dituzte. Hori dela eta, eszitotoxikotasun-kalteekiko sentikorrak dira. Adierazten dituzten hartzaileen artean glutamatoarenak ere badaude, hala nola, AMPA (azido α -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazolpropioniko bidez aktibatzen den hartzailea) (Yoshioka et al., 1995; Matute et al., 1997). AMPA-hartzaileen etengabeko aktibazioak oligodendroitoen eszitotoxikotasuna eragiten du (Alberdi et al., 2002; Matute, 2011). Horren ondorioz, gertatzen den kalte-eszitotoxikoak oligodendroitoen heriotza sustatzeaz gain, nerbio-sistema zentroleko gaixotasunen patogenesis ere bultzatzen du. Gaixotasun horien artean esklerosi anizkoitza nabarmentzen da, oligodendroitoak funtsezkoak baitira esklerosi anizkoitzean sortzen diren kalteak konpontzeko (Sánchez-Gómez eta Matute, 1999; Matute et al., 2007).

Heriotza eszitotoxikoak harreman estua du apoptosi-prozesuekin, eta apoptosi-mekanismoen artean garrantzia handia du kaspasa-8ren parte-hartzeak. Kaspasa-8k Bid (ingelesezko *BH3 interacting-domain death agonist*) molekula moztendu haren forma aktiboa, t-Bid (ingelesezko *truncated Bid*), sortzeko (Garibal et al., 2010; Kaufmann et al., 2012). Behin aktibatuta, t-Bidek mitokondrioaren mintzaren iragazkortasunean eraginez apoptosi bidezko zelula-heriotza parte

hartzen du (Kantari eta Walczak, 2011). Hortaz, ezinbestekoa da oligodendrozitoen eszitotoxikotasun- eta apoptosi-mekanismoetan parte hartzen duten molekula horiek ikertzea. Izan ere, horrek lagun lezake esklerosi anizkoitza bezalako desmielinizazio-gaixotasunen tratamendurako ito terapeutikoak identifikatzen (Bernal-Chico et al., 2015; Bayón-Cordero et al., 2022).

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Aurreko lanetan egiaztatu da oligodendrozitoetako AMPA-hartzaileen estimulazioak zelula horien heriotza sustatzen duela, bai nerbio optikotik eratorritako oligodendrozito helduetan (Alberdi et al., 2002; Sánchez-Gómez et al., 2003), bai arratoiaren garun-azaleko oligodendrozitoen zelula aitzindarietan (Bayón-Cordero et al., 2022). Gainera, ezaguna da oligodendrozitoen eszitotoxikotasunaren bidezko heriotzan apoptosi-mekanismoek parte hartzen dutela, hala nola kaltzioaren sarrera masiboak, zitokromo c molekularen askapenak eragindako mitokondrio-disfuntzioak eta kaspasa-8, -9 eta -3ren aktibazioak (Leuchtmann et al., 2003; Sánchez-Gómez et al., 2003; Sánchez-Gómez et al., 2011).

Hala ere, oraindik ez da ezaguna kaspasa-8k duen parte-hartzea garun-azaletik lortutako eta diferentziazio egoeran dauden oligodendrozitoen zelula aitzindarietan gertatzen den AMPA bidezko eszitotoxikotasun-mekanismoetan. Gainera, oso gutxi ikertu dira eszitotoxikotasunak eragindako oligodendrozito-heriotzan aktibatzen diren elementuak.

Horregatik, lan honen helburu nagusia da kaspasa-8k eta haren ito den Bid proteinak oligodendrozitoen eszitotoxikotasunaren modulazioan duten garrantzia aztertzea, izan ere, bi molekula horien arteko oreka funtsezkoa izan daiteke zelularen amaierako patua erabakitzaile.

3. Ikerketaren muina

3.1 Kaspasa-8 funtsezkoa da eszitotoxikotasunak oligodendrozitoetan eragindako apoptosi-prozesuan

Lehenago azaldu bezala, kaspasa-8k izugarritzko garrantzia du arratoi nerbio optikotik lortutako oligodendrozito helduen apoptosi- eta eszitotoxikotasun-prozesuetan (Sánchez-Gómez et al., 2003; 2011). Hori dela eta, lehenik eta behin, kaspasa-8ren parte-hartzea aztertu dugu oligodendrozitoen zelula aitzindariaren heriotza eszitotoxikoan. Horretarako, oligodendrozitoen zelula aitzindariak isolatu genituen arratoi jaioberrien (P0-P2) garun-azaletik. Lehenik, zelulen hazkundera sustatzeko, bi egunez mantendu genituen ugartze-ingurunean. Ondoren, oligodendrozito helduak lortzeko, beste bi egunez desberdintze-ingurunean mantendu genituen (**1A irudia**). Behin oligodendrozito helduak eskuratuta, estimulu eszitotoxikoa aplikatu genien: lehenik, ziklotiazida gehitu (100 μ M, 5 min), eta gero, AMPArekin inkubatu genituen (10 μ M, 30 min). Era horretan, AMPA molekulak AMPA-hartzaileen agonista (farmako aktibatzaile) gisa jokatzen du, eta ziklotiazidak hartzaileen etengabeko aktibazioa ahalbidetzen du.

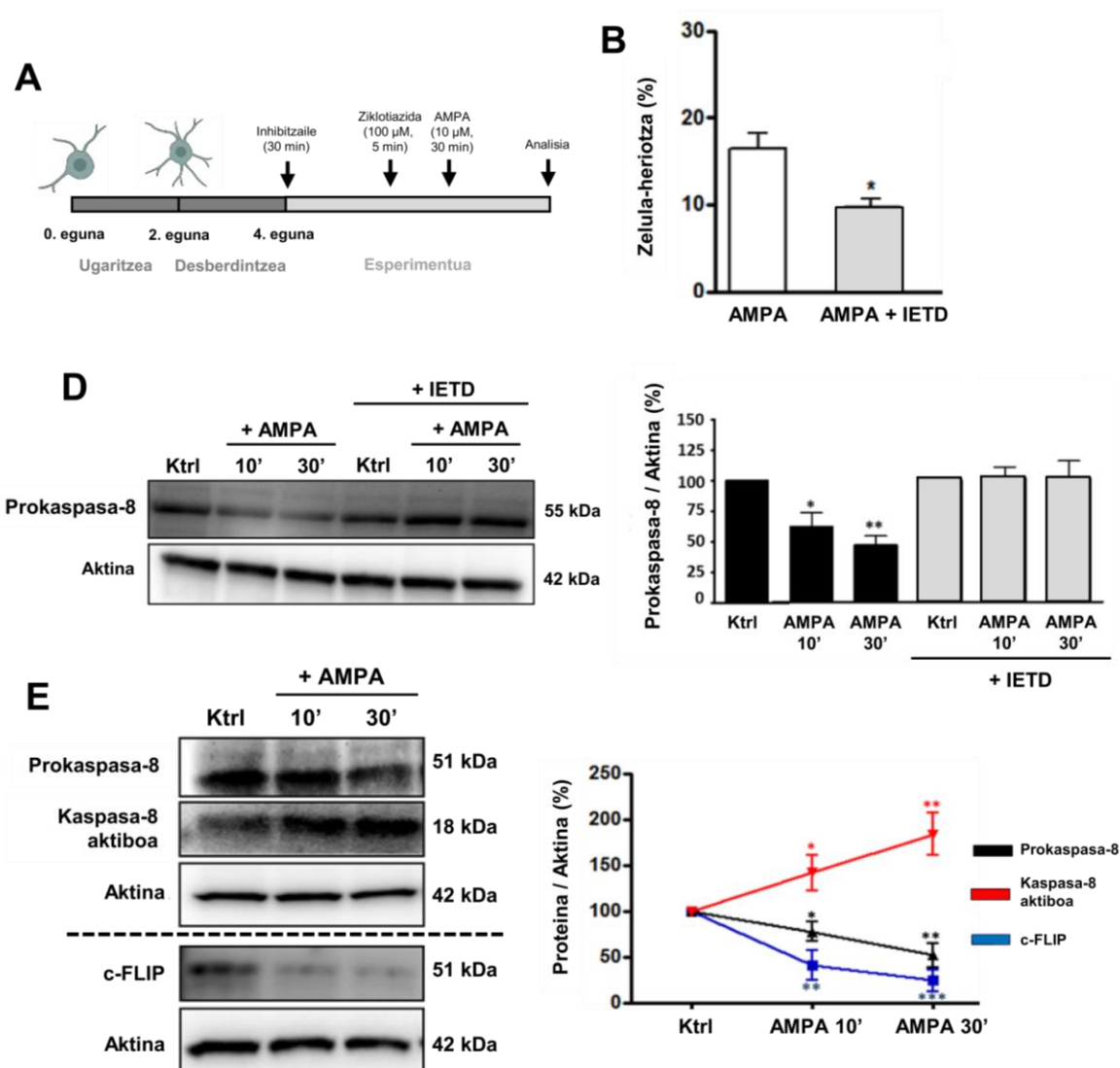
Kaspasa-8ren eginkizuna aztertzeko, IETD farmakoa erabili genuen, hau da, kaspasa-8ren inhibitzaile espezifikoa. Oligodendrozitoak IETDrekin (100 μ M, 30 min) tratatu ondoren, estimulu eszitotoxikoarekin tratatu genituen. 24 ordu igarota, zelula-bideragarritasuna neurtu genuen (**1B irudia**). Horretarako, kalzeina-AM zunda fluoreszenteduna erabili genuen, zelulak bizirik daudenean fluoreszentsia igortzen duena. IETD bidezko kaspasa-8ren inhibizioak murriztu egin zuen AMPA-hartzaileen estimulazioak eragindako zelula-heriotza. Horrek adierazten du kaspasa-8k parte hartzen duela eszitotoxikotasunak eragindako heriotzan.

Ondoren, kaspasa-8ren portaera aztertu nahi izan genuen AMPA estimuluaren aurrean (**1D irudia**). Western blot teknikaren bidez, kaspasa-8 totalaren adierazpen-maila neurtu genuen. Horretarako, 55 kDa pisatzen dituen kaspasa-8 ez-aktiboa (prokaspasa-8) eta 18 kDa pisatzen dituen kaspasa-8 aktiboa detektatzen dituen antigorputz espezifiko bat erabili genuen. Alde batetik, ikusi genuen AMPA-hartzaileen aktibazioaren ondoren kaspasa-8 ez-aktiboaren adierazpena murriztu egin zela. Beste alde batetik, IETD bidez kaspasa-8 inhibititu genuenean eta

AMPA hartzaileak aktibatu ostean, ez zen kaspasa-8 totalaren inolako aldaketarik ikusi. Beraz, emaitza horiek iradokitzen dute kaspasa-8 ez-aktiboaren murrizketak kaspasa-8 aktiboaren gehikuntza eragin dezakeela AMPA-hartzaileen aktibazioaren ondorioz.

Kaspasa-8 totalaren murrizketa kaspasa-8 aktiboaren gehikuntzaren ondoriozkoa zela egiaztatzeko, Western blot bidezko beste analisi bat egin genuen (**1 Irudia**). Bertan, berriz ere kaspasa-8 ez-aktiboaren murrizketa ikusi genuen AMPA-hartzaileen aktibazioaren ostean, eta, gainera, kaspasa-8 aktiboaren maila esanguratsuki handitu zela baieztatu genuen. Horrek berresten du kaspasa-8ren aktibazioa beharrezkoa dela oligodendrozitoen eszitotoxikotasun-prozesua gertatzeko.

1. irudia. Kaspasa-8ren parte-hartzea oligodendrozitoen eszitotoxikotasunean. (A) Arratoiaren garun-azaletik isolatutako oligodendrozitoetan estimulu eszitotoxikoa eragiteko diseinu esperimentalak: ziklotiazida (100 μ M, 5 min) eta AMPA (10 μ M, 30 min) erabilita. (B) Oligodendrozitoen zelula-heriotzaren azterketa, kaspasa-8ren IETD inhibitzailea (100 μ M, 30 min) erabilita edo gabe, estimulu eszitotoxikoa aplikatu eta 24 ordu igaro ondoren. (D) Western blot bidezko irudi adierazgarriak eta kaspasa-8 ez-aktiboaren (prokaspasa-8ren) kuantifikazioa, AMPA eta IETDrekin estimulaturako oligodendrozitoetan, 10 eta 30 min igaro ondoren aztertuta. (E) Western blot bidezko irudi adierazgarriak eta kaspasa-8 ez-aktiboaren, kaspasa-8 aktiboaren eta c-FLIP proteinaren kuantifikazioa, AMPArekin trataturako oligodendrozitoetan, 10 eta 30 minutu igaro ondoren aztertuta. Datuak aktinaren adierazpenaren arabera normalizatu ziren. Emaitzak kontrolarekiko portzentaje gisa adierazi ziren (tratatu gabeko zelulak; B: %0; D, E: %100). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ kontrolarekiko, t test. Datuak gutxienez 3 esperimentu independenteren batezbestekoaren $\pm$ errore estandarra gisa adierazten dira.



Kontuan hartuta kaspasa-8ren parte-hartzea AMPAk eragindako oligodendrozito-heriotzan, kaspasa honen erregulatzaile negatiboa den c-FLIP (ingelesezko *FADD-like interleukin-1 β -converting enzyme inhibitory protein*) molekulak prozesu horretan duen eragina ere aztertu genuen. c-FLIP apoptosiaren aurkako molekula bat da: c-FLIPEk kaspasa-8ren aktibazioa inhibitzen du, baina haren maila gutxitzen denean, kaspasa-8 aktibatu egiten da. Horregatik, AMPA bidezko estimuluaren osteko c-FLIPen adierazpen-patroia aztertu genuen Western blot bidez (**1E irudia**). Analisiaren denbora-tarte osoan zehar, zelulak AMPAren eraginpean egoteak c-FLIPen etengabeko jaitsiera eragin zuen. Emaita horiek indartu egiten dute AMPAk kaspasa-8ren bidezidorraren bitartez oligodendrozitoetan jarduten duenaren ideia, c-FLIPen kopurua murrizteak kaspasa-8ren aktibazioa sustatzen baitu.

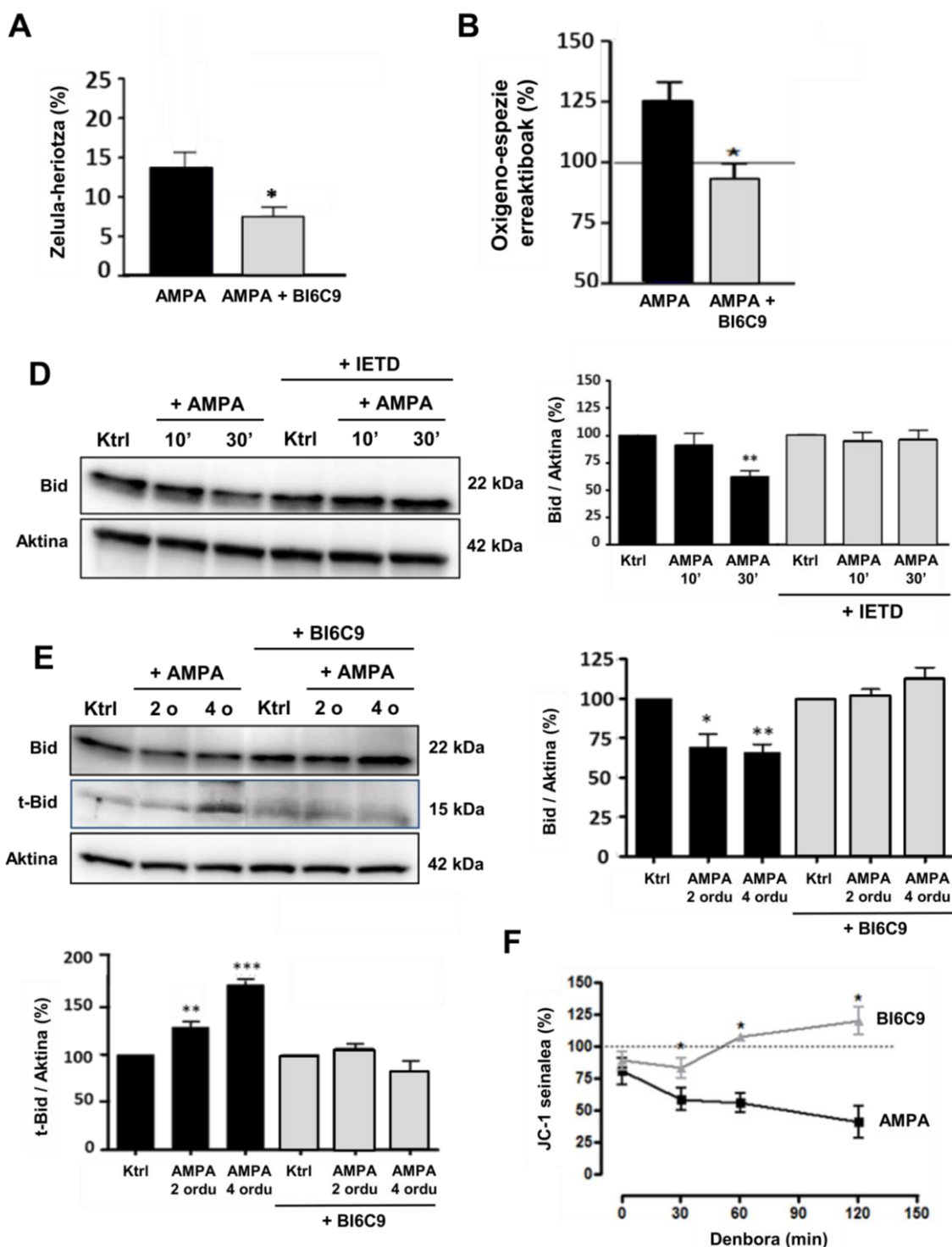
3.2 Biden prozesamenduak parte hartzen du AMPAk bideraturiko oligodendrozitoen heriotza eszitotoxikoa

Lehenago azaldu bezala, kaspasa-8ren aktibitateak harreman estua du bere itu molekularren aktibazioarekin, Bid proteinarekin, hain zuzen ere (Kaufmann et al., 2012). AMPAk eragindako heriotzan Bidek duen garrantzia zehazteko, BI6C9 farmakoa -Biden inhibitzaile espezifiko-erabili genuen. Oligodendrozitoak BI6C9rekin (50 μ M, 30 min) tratatu ziren lehenik, eta ondoren AMPArekin (**2A irudia**). Tratamendu horien ostean, zelula-bideragarritasuna aztertu genuen. Kaspasa-8ren inhibizioaren ostean gertatu bezala, Biden inhibizioak AMPAk eragindako heriotza murriztu zuen. Era berean, CM-H2DCFDA zundaren bidez oxigeno-espezie errektiboen agerpena aztertzean ondorengo ikusi genuen: BI6C9 inhibitzailearekin egindako inkubazioak AMPAk sortutako oxigeno-espezie errektiboen sorrera murriztu zuen (**2B irudia**). Oro har, gure emaitzek frogatzen dute Bidek parte hartzen duela eszitotoxikotasun-prozesuan. Gainera, erakusten dute Bid proteina garrantzitsua dela itu terapeutiko gisa, izan ere, eszitotoxikotasunaren markatzaile nagusiak, hots, zelula-heriotza eta oxigeno-espezie errektiboak, murrizteko gai da.

AMPA bidezko aktibazioaren ostean kaspasa-8k eta Bidek duten harremanean sakontzeko, Western blot bidez Biden adierazpen-maila aztertu genuen (**2D Irudia**). Horretarako, 22 kDa-ko pisua duen egoera ez-trunkatuan (ez-aktiboan) dagoen Bid eta 15 kDa-ko egoera trunkatuan (aktiboan) dagoen t-Bid detektatzen dituen antigorputz espezifiko bat erabili genuen. Kaspasa-8rekin gertatu bezala, AMPA-hartzaileak aktibatu ondoren Bid ez-trunkatuaren kopurua murriztu egin zen. Kaspasa-8ren IETD inhibitzailea gehitu ostean, ordea, ez zen aldaketarik gertatu Bid ez-trunkatuaren adierazpenean. Emaita horiek iradokitzen dute kaspasa-8ren aktibazioa beharrezkoa dela ondoren gertatzen den Biden aktibazio-aldaketarako.

Ostean, AMPAk Biden aktibitatean duen efektua ikertu genuen. Horretarako, Western blot bidez Bid eta t-Biden adierazpena aztertu genuen denbora-tarte berantiaragoetan, BI6C9 inhibitzailearekin edo gabe (**2E Irudia**). Bid ez-trunkatuaren murrizketa mantendu egin zen AMPA gehitu eta 2 eta 4 ordu igaro ondoren, eta t-Biden adierazpena areagotu egin zen. Hala ere, nahiz eta zelulak AMPArekin tratatu, BI6C9 inhibitzailearen erabilerak Biden aktibazioa eragotzi zuen. Beraz, emaitzek baieztatzen dute AMPA-hartzaileen aktibazioak Biden aktibazioa eragiten duela.

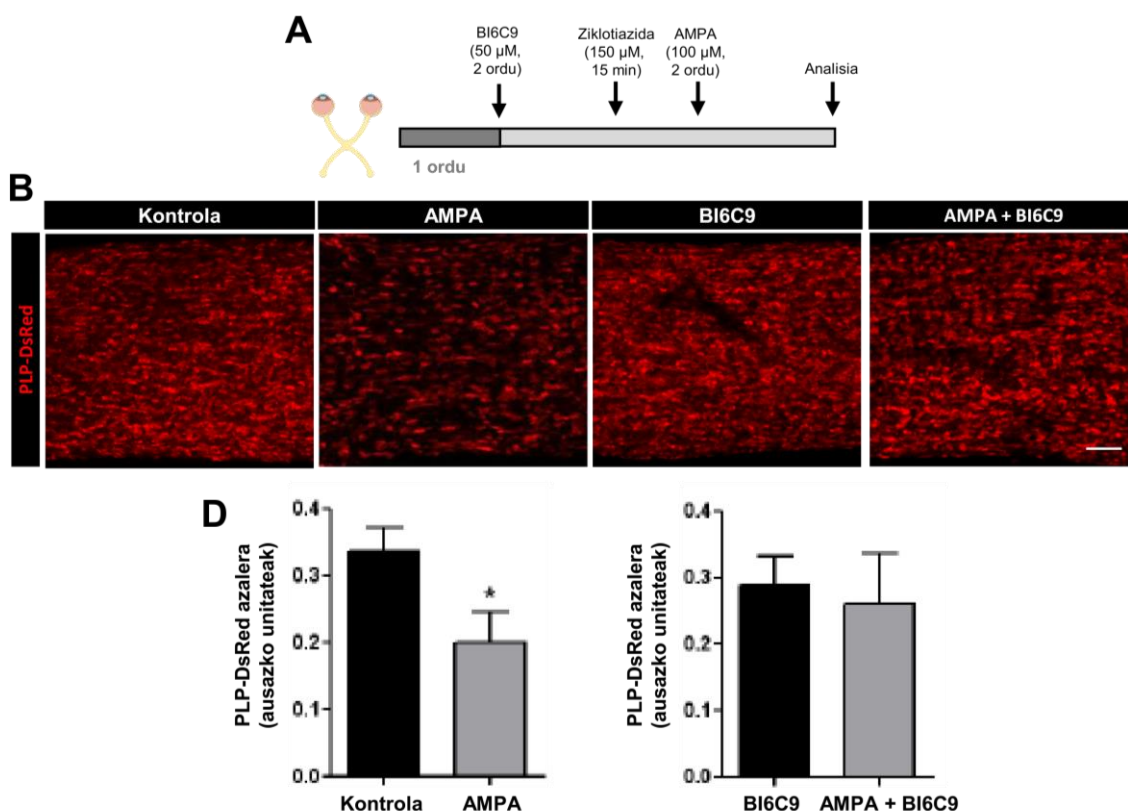
2. irudia. Biden papera oligodendrozitoen eszitotoxikotasunean. (A) Oligodendrozitoen zelula-heriotza Biden BI6C9 (50 μ M, 30 min) inhibitzailearekin edo gabe, estimulu eszitotoxikoa gertatu eta 24 ordu igaro ondoren aztertuta. **(B)** AMPA eta BI6C9rekin tratatutako oligodendrozitoetan sortutako oxigeno-espezie errektiboen zelula barmeko kopurua, estimulu eszitotoxikoa gertatu eta 30 min igaro ondoren neurtuta. **(D)** Western blot-eko irudi adierazgarriak eta Bid totalaren kuantifikazioa, AMPA eta IETDrekin tratatutako oligodendrozitoetan, 10 eta 30 min igaro ostean aztertuta. **(E)** Western blot-eko irudi adierazgarriak eta Bid totalaren, Bid aktiboaren eta t-Biden kuantifikazioa, AMPA eta BI6C9rekin tratatutako oligodendrozitoetan, estimulu eszitotoxikoa ondorengo 2 eta 4 orduetan aztertuta. Datuak Aktinaren balioen arabera normalizatu ziren. **(F)** AMPA eta BI6C9rekin tratatutako oligodendrozitoen mitokondrioko mintz potentzialaren monitorizazioa, estimulu eszitotoxikoa gertatu eta 0 eta 120 min bitartean aztertuta. Kasu guztietan, emaitzak kontrolarekiko portzentaje gisa adierazi ziren (tratatu gabeko zelulak; A: %0; B, D, E, F: %100). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ kontrolarekiko, t test. Datuak gutxienez 3 esperimendu independenteren batezbestekoaren $\pm$ errore estandarra gisa adierazten dira.



Gainera, Bidek mitokondrioko kanpo-mintzaren aldaketan parte hartzen du, eta hori gertaera erabakigarria da apoptosi bidezko heriotzan (Lovell et al., 2008; Shelton et al., 2009; Grohm et al., 2010; Cabon et al., 2012). Hori dela eta, AMPAk eragindako mitokondrio-asaldura aztertu genuen, BI6C9 inhibitzailearen presentziarekin eta gabe (**2F Irudia**). Horretarako, JC-1 zunda erabili genuen, mitokondrio-kaltea bereizteko aukera ematen duen bi fluoreszentzia mota igortzen baititu: zelula osasuntsuetan, fluoreszentzia gorria; kalteturiko zeluletan, ordea, fluoreszentzia berdea. Horrela, aurkitu genuen AMPAk mitokondrio-mintzaren potentzialaren galera jarraitua eragiten zuela, zeinek mitokondrio-kaltea adierazten duen. BI6C9 gehituz Bid inhibitzean, aldiz, ez zen kalterik gertatu mitokondrioaren mintzean. Hortaz, badirudi Bidek parte hartzen duela bai zelula-heriotzan, bai AMPAekin lotutako mitokondrio-disfuntzioan.

Azkenik, konplexutasun handiagoko eredu batean ere Biden inhibizioaren efektu babeslea egiaztatu genuen (**3A Irudia**). Horretarako, PLP-DsRed sagu transgenikoak erabili genituen, zeintzuk PLP (ingelesezko *glial proteolipid protein*) proteinaren adierazpen fluoreszentea duten. Ezaugarri horri esker, oligodendrozito helduak identifika daitezke animalia hauetatik lortutako ehunetan. Saguen nerbio optikoak isolatu genituen eta oxigenoz asetutako ingurune zerebrospinal artifizialean inkubatu genituen (126 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 26 mM NaHCO₃, 1,25 mM NaH₂PO₄, 2 mM CaCl₂ y 10 mM glukosa). Estimulu eszitotoxikoa eragiteko, ziklotiazidarekin (150 μ M, 15 min) eta AMPArekin (100 μ M, 2 ordu) inkubatu ziren. Biden parte-hartzea ikertzeko, lehenago BI6C9 inhibitzailea gehitu zen (100 μ M, 2 ordu). Tratamenduen ondoren, oligodendrozitoen populazioa fluoreszentsiako mikroskopia konfokalean aztertzeo, nerbio optikoak paraformaldehidoarekin finkatu eta porta batean muntatu ziren (**3B, D Irudia**). Oligodendrozito heldu bideragarrien presentzia zehazteko, PLP-zelula positiboen fluoreszentsia-seinalen azalera kuantifikatu zen. PLP-DsRed seinalea murriztuta zegoela aurkitu genuen, zeina BI6C9 inhibitzailearekin lehengoratu zena. Beraz, emaitza horiek berriz ere indartzen dute Biden parte-hartzea prozesu eszitotoxikoan.

3. irudia. Biden BI6C9 bidezko inhibizioak saguen nerbio optikoko oligodendrozitoen heriotza eszitotoxikoa arintzen du. (A) Saguen nerbio optikoan ziklotiazida (150 μ M; 15 min) eta AMPA (100 μ M, 2 ordu) bidezko estimulu eszitotoxikoa eragiteko diseinu esperimental. (B) AMPA eta BI6C9ekin (50 μ M, 1 ordu) tratatutako saguen nerbio optikoko luzetarako ebaketen irudi adierazgarriak, mikroskopia konfokal bidez lortutakoak, non oligodendrozito helduei dagokien PLP-DsRed fluoreszentsia-seinalea ageri den (gorriz). Barra-eskala: 200 μ M. (D) PLP-DsRed seinalearen azaleraren kuantifikazioa. * $p < 0.05$ kontrolarekiko, t test. Datuek gutxienez 3 esperimentu independenteren batezbestekoaren $\pm$ errore estandarra adierazten dute.



4. Ondorioak

Eszitotoxikotasuna blokeatzea funtsezkoa izan daiteke oligodendrozitoen heriotza saihesteko gaixotasun desmielinizatzaileen testuinguruan; halaber, animalia-ereduetan desmielinizazioa prebenitu dezake. Hortaz, gaixotasun horiek hobeto ulertzeko, ezinbestekoa da eszitotoxikotasunak eragindako heriotzan parte hartzen duten mekanismoak ikertzea.

Lan honetan, aurreko aurkikuntzak berretsi ditugu; hots, kaspasa-8ren aktibazioa oligodendrozitoen eszitotoxikotasunerako oinarritzko mekanismo gisa identifikatu dugu. Horrez gain, frogatu dugu prozesu horretan Bidek duen parte-hartzea, eta nabarmendu dugu kaspasa-8k eta Bidek mekanismo horiekin duten elkarrekintza estua.

Azkenik, egiaztatu dugu kaspasa-8ren eta Bide aktibitatearen inhibizioak eszitotoxikotasunak eragindako zelula-heriotza murrizten duela. Seinaleztapen apoptotikoan Bid elementu berantiarra deenez, litekeena da kaspasa-8 baino itxura terapeutiko egokiagoa izatea eszitotoxikotasunaren aurkako babes-estrategietarako; izan ere, haren inhibizioak nahi ez diren albo-ondorioak murriztu litzake. Gainera, Bide BI6C9 inhibitzaileak murriztu egin zituen bai zelula-heriotza, bai oxigeno-espezia errektiboaren sorrera eta kalte mitokondrialak. Era berean, farmako horrek oligodendrozitoak babestu zituen eszitotoxikotasunaren aurrean, ez bakarrik zelula isolatuetan, baita saguaren nerbio optikoetan ere.

Ondorioz, ikerketa honen emaitzek berresten dute kaspasa-8 eta haren Bid itxura molekularra funtsezkoak direla eszitotoxikotasunak eragindako oligodendrozito-heriotzan.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Ikerketa honetan, ikusi dugu Bid blokeatzeak nabarmen murrizten dela kalte eszitotoxikoak eragindako oligodendrozito-heriotza. Horrela, gure emaitzek iradokitzen dute molekula horren inhibizioak potentzial terapeutikoa izan dezakeela gaixotasun desmielinizatzaileen testuinguruan, esaterako, esklerosi anizkoitzean. Beraz, Bide inhibizioaren eragina *in vivo* ereduaren (kuprizona edo entzefalitis autoimmune esperimentalak) balioztatzeak garrantzi handia izan lezake esklerosi anizkoitzaren aurkako estrategia terapeutikoen bilaketan.

Bestalde, interesgarria litzateke seinaleztapen-apoptotikoan parte hartzen duten beste proteina batzuen inhibizioa aztertzea, kalte eszitotoxikoaren aurkako oligodendrozitoen babesean duten eragina ebaluatzeko. Horrela, apoptosi-bidezidorretako molekulak eragiten dieten estrategia sinergikoak gara litezke, tratamendu eraginkorragoak garatzeko aukera eskainiz.

6. Erreferentziak

- Alberdi, E., Sánchez-Gómez, M.V., Marino, A., & Matute, C. (2002). Ca²⁺ influx through AMPA or kainate receptors alone is sufficient to initiate excitotoxicity in cultured oligodendrocytes. *Neurobiol Dis*, 9(2), 234–243. <https://doi.org/10.1006/nbdi.2001.0457>
- Bayón-Cordero, L., Ochoa-Bueno, B.I., Ruiz, A., Ozalla, M., Matute, C., & Sánchez-Gómez, M.V. (2022). GABA receptor agonists protect from excitotoxic damage induced by AMPA in oligodendrocytes. *Front Pharmacol*, 13, 897056. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.897056>
- Bernal-Chico, A., Canedo, M., Manterola, A., Sánchez-Gómez, M.V., Pérez-Samartín, A., Rodríguez-Puertas, R., Matute, C., & Mato, S. (2015). Blockade of monoacylglycerol lipase inhibits oligodendrocyte excitotoxicity and prevents demyelination in vivo. *Glia*, 63(1), 163–176. <https://doi.org/10.1002/glia.22742>
- Cabon, L., Galán-Malo, P., Bouharrou, A., Delavallée, L., Brunelle-Navas, M.N., Lorenzo, H.K., Gross, A., & Susin, S.A. (2012). BID regulates AIF-mediated caspase-independent necroptosis by promoting BAX activation. *Cell Death Differ*, 19(2), 245–256. <http://doi.org/10.1038/cdd.2011.91>
- Garibal, J., Hollville, E., Renouf, B., Téaud, C., & Wiels, J. (2010). Caspase-8-mediated cleavage of bid and protein phosphatase 2A-mediated activation of Bax are necessary for Verotoxin-1-induced apoptosis in Burkitt's lymphoma cells. *Cell Signal*, 22(3), 467–475. <http://doi.org/10.1016/j.cellsig.2009.10.018>
- Grohm, J., Plesnila, N., & Culmsee, C. (2010). Bid mediates fission, membrane permeabilization and perinuclear accumulation of mitochondria as a prerequisite for oxidative neuronal cell death. *Brain Behav Immun*, 24(5), 831–838. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2009.11.015>

- Kantari, C. & Walczak, H. (2011). Caspase-8 and bid: caught in the act between death receptors and mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1813(4), 558–563. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.01.026>
- Kaufmann, T., Strasser, A., & Jost, P.J. (2012). Fas death receptor signaling: roles of Bid and XIAP. *Cell Death Differ*, 19(1), 42–50. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.121>
- Leuchtmann, E.A., Ratner, A.E., Vijitruth, R., Qu, Y., & McDonald, J.W. (2003). AMPA receptors are the major mediators of excitotoxic death in mature oligodendrocytes. *Neurobiol Dis*, 14(3), 336–348. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2003.07.004>
- Lovell, J.F., Billen, L.P., Bindner, S., Shamas-Din, A., Fradin, C., Leber, B., & Andrews, D.W. (2008). Membrane ninding by tBid initiates an ordered series of events culminating in membrane permeabilization by Bax. *Cell*, 135(6), 1074–1084. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.11.010>
- 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. <https://doi.org/10.1001/archophth.1957.00940010205006>
- Matute, C., Sánchez-Gómez, M.V., Martínez-Millán, L., & Miledi, R. (1997). Glutamate-receptor mediated toxicity in optic nerve oligodendrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94(16), 8830–8835. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.16.8830>
- Matute, C., Alberdi, E., Domercq, M., Sánchez-Gómez, M.V., Pérez-Samartín, A., Rodríguez-Antigüedad, A., & Pérez-Cerdá, F. (2007). Excitotoxic damage to white matter. *J Anat*, 210(6), 693–702. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2007.00733.x>
- Matute, C., (2011). Glutamate and ATP signaling in white matter pathology. *J Anat*, 219(1), 53–64. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2010.01339.x>
- Michaelis, E.K. (1998). Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog Neurobiol*, 54(4), 369–415. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(97\)00055-5](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(97)00055-5)
- Sánchez-Gómez, M.V., & Matute, C. (1999). AMPA and kainate receptors each mediate excitotoxicity in oligodendroglial cultures. *Neurobiol Dis*, 6(6), 475–485. <https://doi.org/10.1006/nbdi.1999.0264>
- Sánchez-Gómez, M.V., Alberdi, E., Ibarretxe, G., Torre, I., & Matute, C. (2003). Caspase-dependent and caspase-independent oligodendrocyte death mediated by AMPA and kainate receptors. *J Neurosci*, 23(29), 9519–9528. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-29-09519.2003>
- Sánchez-Gómez, M.V., Alberdi, E., Pérez-Navarro, E., Alberch, J., & Matute, C. (2011). Bax and calpain mediate excitotoxic oligodendrocyte death induced by activation of both AMPA and kainate receptors. *J Neurosci*, 31(8), 2996–3006. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5578-10.2011>
- Shelton, S.N., Shawgo, M.E., & Robertson, J.D. (2009). Cleavage of Bid by executioner caspases mediates feed forward amplification of mitochondrial outer membrane permeabilization during genotoxic stress-induced apoptosis in Jurkat cells. *J Biol Chem*, 284(17), 11247–11255. <https://doi.org/10.1074/jbc.M809392200>
- Yoshioka, A., Hardy, M., Younkin, D.P., Grinspan, J.B., Stern, J.L. & Pleasure, D. (1995). Alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate (AMPA) receptors mediate excitotoxicity in the oligodendroglial lineage. *Neurochem*, 64, 2442–2448. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1995.64062442.x>

7. Eskerrak eta oharrak

Hasteko, esker onak eman nahi dizkiogu Dr. Xabier Simón Martínez de Goñiri bere laguntzagatik. Eskerrik asko ere Dr. Frank Kirchhoffi PLP-DsRed saguak partekatzeagatik. CIBERNEdek, Eusko Jaurlaritzak (IT702-13), Euskal Herriko Unibertsitateak eta Ekonomia eta Lehiakortasun Ministerioak (SAF2016-75292-R) finantzatu dute lan hau. Bestalde, Laura Bayón-Corderok Eusko Jaurlaritzako Doktoratu Aurreko Programako Laguntza izan zuen, Manuel Canedo-Antelok Ekonomia eta Lehiakortasun Ministerioko Laguntza (BES-2011-047822) eduki zuen, Irene Luengas-Escuzak EHUKo Ikertzaileak Prestatzeko Laguntza dauka (PIF21/200) eta Blanca Isabel Ochoa-Buenok Ministerioko Unibertsitateko Langileen Prestakuntzarako Laguntza (FPU20/06365) dauka.