

11282  
8



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

**PARTICIPACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA  
MUERTE APOPTÓTICA DE NEURONAS EN CULTIVO**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

**BIÓL. ANTONIO VALENCIA PÉREZ**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. JULIO MORÁN ANDRADE**

**MÉXICO, D.F., CIUDAD UNIVERSITARIA, 2003**

TESIS CON  
FALLA DE CRÍMEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR

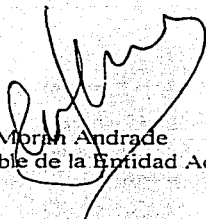
pdcb/grad/082Jur/2003

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez  
Director General de Administración Escolar  
Presente.

Por medio del presente me permito informar a usted que el Subcomité Académico de Doctorado en Ciencias Biomédicas en su reunión 111ª del 15 de enero del 2003, **se acordó designar el siguiente jurado para examen de Doctorado en Ciencias Biomédicas** de Antonio Valencia Pérez, con número de cuenta 86059961 y número de expediente 71991156 con la tesis titulada: *Participación del estrés oxidativo en la muerte apoptótica de neuronas en cultivo*, dirigida por el Dr. Julio Morán Andrade.

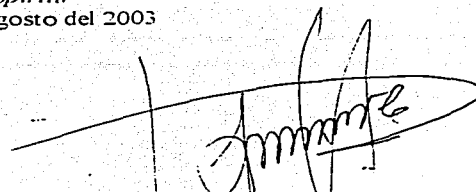
Presidente:	Dr.	Enrique Piña Garza
Vocal:	Dr.	Edmundo Chávez Cossio
Vocal:	Dra.	Lourdes Massieu Trigo
Vocal:	Dr.	José Pedraza Chaverri
Secretario:	Dr.	Julio Morán Andrade
Suplente:	Dr.	Wilhelm Hansberg Torres
Suplente:	Dr.	Alejandro Zentella Dehesa

*Atentamente*  
*"Por mi raza hablará el espíritu"*  
Cd. Universitaria, D.F., a 15 de agosto del 2003



Dr. Julio Morán Andrade  
Responsable de la Entidad Académica

c.c.p. Dr. Julio Morán Andrade, Tutor Académico



Dr. Abel Moreno Carcamo  
Coordinador del Programa

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Este estudio se realizó bajo la dirección del Dr. Julio Morán Andrade en el Departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.**

**Este trabajo se financió con los donativos correspondientes de los proyectos 36235N de CONACyT y al IN203400 de la DGAPA, UNAM.**

**También este estudio doctoral fue apoyado con becas de la DGEP-UNAM y el CONACyT.**

**Se agradece el apoyo técnico de la Biól. Guadalupe Dominguez Macouzet.**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## AGRADECIMIENTOS

*A mi tutor, el Dr. Julio Morán Andrade por su constante enseñanza, motivación y guía.*

*A mi comité tutorial, el Dr. Alejandro Zentella Dehesa, el Dr. Marco A. Cerbón Cervantes y el Dr. Wilhelm Hansberg Torres por su activa participación e interés tanto en mi formación científica como por el interés en el proyecto doctoral.*

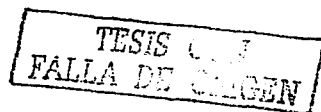
*A los integrantes del jurado, el Dr. Enrique Piña, el Dr. Edmundo Chávez, la Dra. Lourdes Massieu, el Dr. José Pedraza, el Dr. Wilhelm Hansberg, el Dr. Alejandro Zentella y el Dr. Julio Morán, quienes aportaron ideas y sugerencias importantes para este trabajo.*

*Especial agradecimiento a la Dra. Lourdes Massieu Trigo, al Dr. Wilhelm Hansberg Torres y al Dr. Alejandro Zentella Dehesa por su tiempo. A ustedes que me alentaron en lo profesional y en lo personal, aprecio mucho su esfuerzo y su intención.*

*A la Biol. Guadalupe Domínguez Macouzet por su esencial e importante labor en el cuarto de cultivo y su constante apoyo en el trabajo de laboratorio.*

*Al Dr. José Rodríguez (UAB) y al Dr. Sergio Sánchez-Arnass (UASLP) por su apoyo y por su tiempo.*

*Al CONACyT y a la DGEP por las becas proporcionadas durante mi proyecto doctoral.*



## INDICE

Lista de Abreviaturas.....	3
Resumen.....	4
Abstract.....	6
1. Introducción.....	8
1.1. Apoptosis.....	8
1.2. Estrés oxidativo.....	16
1.3. Neuronas granulares del cerebelo.....	19
1.4. <i>“Participación de las especies reactivas de oxígeno en la muerte apoptótica neuronal en el desarrollo y en algunas patologías”</i> <i>Valencia A. y Morán J. (2001) BEB, 20(4): 222.</i> .....	21
2. Antecedentes.....	22
3. Hipótesis.....	24
4. Objetivos.....	24
5. Metodología.....	25
5.1. Cultivo de neuronas granulares de cerebelo de rata.....	25
5.2. Inducción de muerte neuronal.....	25
5.2.1. Modelo de cambio de medio (de 25 mM de KCl a 5 mM de KCl).....	26
5.2.2. Inducción del estrés oxidativo.....	26
5.3. Viabilidad celular.....	26
5.4. Condensación nuclear.....	27
5.5. Ensayos tipo Western Blot.....	27
5.6. Calcio intracelular.....	28
5.7. Actividad de caspasas.....	28
5.8. Detección de EOR citosólicos y mitocondriales.....	28
5.9. Translocación de fosfatidilserina.....	29
5.10. Actividad de NADPH-oxidasa.....	29
5.11. Estadística.....	30

6.	Resultados.....	31
6.1.	<i>“Role of oxidative stress in the apoptotic cell death of cultured cerebellar granule neurons”</i> <i>Valencia A. and Morán J. (2001) J. Neurosci. Res. 64: 284.....</i>	31
6.2.	Participación de la NADPH-oxidasa en la muerte apoptótica de neuronas granulares de cerebelo en cultivo.....	32
6.2.1.	Presencia de los componentes del complejo de la NADPH-oxidasa.....	32
6.2.2.	Actividad de la NADPH-oxidasa.....	33
6.2.3.	Efecto de inhibidores de la NADPH-oxidasa en la muerte neuronal.....	37
6.3.	<i>“Reactive oxygen species induce different cell death mechanisms in cultured cerebellar granule cells” sometido para su publicación.....</i>	40
7.	Discusión.....	41
8.	Conclusiones.....	46
9.	Referencias.....	47

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### Lista de Abreviaturas

[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Concentración de calcio libre intracelular
O <sub>2</sub>	Oxígeno singulete
ADN	Ácido desoxiribonucleico
AEBSF	Fluoruro de 4-(2-aminoetil) benceno sulfoni
AIF	Factor inductor de apoptosis
ANT	Translocasa de nucleótidos de adenina
Apaf-1	Factor apoptótico activador de proteasas
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Trifosfato de adenina
BDNF	Factor neuronal derivado del cerebro
CGC	Neuronas granulares de cerebello
cit c	Citocromo c
DHR123	Dihidrorodamina-123.
DISC	Complejo de señalización inductor de la muerte
DIV	Días <i>in vitro</i>
DPI	Difenileno y donio
EOR	Especies de oxígeno reactivas
FAD	Dinucleótido de flavinadenina
FDA	Diacetato de fluoresceína
H <sub>2</sub> DCFC	Dicaetato de diclorodihidrofluoresceína
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
IAP	Proteínas inhibidoras de apoptosis
K25	25 mM de KCl
K5	5 mM de KCl
MTT	3-(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio
NGF	Factor de crecimiento neural
NMDA	N-metil-D-aspartato
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Anión superóxido
Pi	Fósforo iorgánico
PKC	Proteína cinasa C
PS	Fosfatidilserina
PT	Poro de transición de la permeabilidad mitocondrial
SNC	Sistema nervioso central
SOD	Superóxido dismutasa
VDAC	Canal aniónico dependiente de voltaje
PVDF	Difluoruro de polivinilideno (nombre en ingles: polyvinylidene difluoride)



## **RESUMEN**

La muerte apoptótica es un proceso ordenado que conduce a la eliminación de células sea durante el desarrollo y en diferentes patologías como las enfermedades neurodegenerativas. Se han descrito diversos modelos, como la privación de señales tróficas, para estudiar la muerte apoptótica neuronal. Este tipo de muerte requiere de la participación de un gran número de moléculas pro y antiapoptóticas así como de algunas señales internas para su regulación, como el estrés oxidativo.

Uno de los estímulos que inducen la muerte neuronal apoptótica es la privación de señales tróficas. Durante el desarrollo de las neuronas granulares del cerebelo (CGC) ocurre una muerte celular que resulta de la falta de influencias presinápticas de las fibras que aportan señales tróficas. Esta condición se puede simular *in vitro* cuando las CGC cultivadas en una condición despolarizante se transfieren a condiciones fisiológicas de potasio extracelular (KCl 5mM), lo que induce la muerte de estas neuronas. Bajo estas condiciones la muerte observada se asocia con una disminución drástica en los niveles de calcio intracelular junto con varios indicadores apoptóticos como la fragmentación y condensación del ADN, la translocación de la fosfatidilserina (PS) a la cara externa de la membrana plasmática y la activación de la caspasa-3 y de la caspasa-8. Uno de los eventos más tempranos en este proceso es el estrés oxidativo debido a la formación de especies de oxígeno reactivas (EOR). Se conoce la participación del anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y del oxígeno en singulete ( $^1O_2$ ) durante la muerte celular de neuronas bajo distintos estímulos. Dada la importancia del estrés oxidativo en una gran cantidad de procesos fisiológicos y patológicos estudiamos el papel de esta condición en la muerte apoptótica de las CGC inducida por la privación de potasio extracelular.

Mediante el uso de las técnicas espectrofluorométricas y de microscopía demostramos en este trabajo que durante la muerte de las CGC se genera estrés oxidativo cuatro horas después de iniciado el estímulo apoptótico. El tratamiento con moléculas antioxidantes evita la muerte neuronal, así como todos los indicadores apoptóticos inducidos con la privación de potasio extracelular. De todos los agentes

antioxidantes utilizados, la enzima superóxido dismutasa (SOD) resultó ser el más efectivo. De acuerdo a esto y a otras medidas directas sugerimos que una de las EOR activas en este proceso es el  $O_2^{\cdot-}$ . Encontramos que distintas EOR inducen distintos mecanismos de muerte en las CGC. El  $^1O_2$  y el  $O_2^{\cdot-}$  inducen muerte con características apoptóticas en la cual hay una activación de las caspasas 1, 3 y 8, así como la translocación de la fosfatidilserina (PS) y la condensación de los núcleos. Por otro lado, el  $H_2O_2$  induce una muerte necrótica, caracterizada por un daño membranal y la ausencia de actividad de caspasas, de translocación de la PS y condensación nuclear. Finalmente, sugerimos que un posible origen del  $O_2^{\cdot-}$  participante en la muerte apoptótica de las CGC podría ser el complejo enzimático membranal NADPH-oxidasa. En el presente trabajo demostramos la presencia en las CGC de cuatro de las subunidades de esta enzima y una activación de la misma inducida con bajo potasio. La presencia de dos inhibidores de este complejo enzimático evita marcadamente la muerte inducida con este estímulo.

Concluimos que el estrés oxidativo es una señal necesaria para la fase inicial del proceso de muerte apoptótica inducido con la privación de potasio extracelular en las CGC. Una de las principales EOR involucradas en este evento podría ser el  $O_2^{\cdot-}$  que sería producida por la NADPH-oxidasa. Aún queda por aclarar cuáles serían los mecanismos responsables de la inducción de la actividad de este complejo enzimático en respuesta al estímulo apoptótico.

TESIS COM  
FALLA DE ORIGEN

## **ABSTRACT**

Apoptotic cell death is a process involving several molecular mechanisms in the elimination of cells during pathological and physiological events such as neurodegenerative disorders and neuronal death during development. This type of cell death requires the participation of a large variety of pro and antiapoptotic molecules as well as the involvement of a series of intracellular signals like oxidative stress.

During cerebellum development a population of neurons dies due to lack of presynaptic inputs from fibers that provide trophic signals. This condition can be mimicked *in vitro* by growing cerebellar granule neurons under depolarizing conditions (25 mM KCl; K25) and then transfer them to a non-depolarizing medium (5 mM KCl; K5). Under these conditions a decrease in intracellular calcium levels occurs and after 24-48 h neuronal death with apoptotic characteristics including nuclear condensation and fragmentation, phosphatidylserine translocation and caspase-8 and caspase-3 activation is observed. An episode of oxidative stress is observed early during this process of cell death. Superoxide anion ( $O_2^-$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and singlet oxygen ( $^1O_2$ ) have been proposed to play a key role in cell death. Due to the relevance of oxidative stress in neuronal death, in the present study we evaluated the involvement of this condition in apoptotic cell death of CGC induced by potassium deprivation (K5).

Using spectrofluorometric and microscopic techniques we demonstrated that during CGC death induced by potassium deprivation an episode of oxidative stress is generated 4 h after the onset of the apoptotic stimulus. An early event in this process is a reduction of intracellular calcium. Treatment with several antioxidants prevented cell death, superoxide dismutase (SOD) being the most potent agent. This and other evidences suggest a key role of  $O_2^-$  in this process. This protective effect is not mediated by calcium levels modification.

We also demonstrated that different ROS in CGC induced different mechanisms of cellular death. The  $^1O_2$  and  $O_2^-$  induce death with apoptotic characteristics including caspase-1, caspase-8 and caspase-3 activation, phosphatidylserine (PS) translocation and nuclear condensation. In contrast,  $H_2O_2$

induced a necrotic-like cell death showing membrane damage, lack of caspases activation, phosphatidylserine translocation and nuclear condensation. Based on these and other results, we suggest that  $O_2^{\cdot -}$  is a main ROS involved in apoptotic death of CGC induced by deprivation of depolarization and that NADPH-oxidase could be the main source of this ROS. In line with this idea we found the presence of four subunits of this enzymatic complex in CGC deprived of KCl and marked enzyme activation as well as over expression and translocation of some subunits to the membrane of the enzyme. Moreover, two inhibitors of the enzyme prevent cell death induced by KCl deprivation.

## **INTRODUCCIÓN**

### **1.1. Apoptosis**

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada con características morfológicas, bioquímicas y moleculares particulares. Algunas de las características moleculares son: condensación y fragmentación nuclear, encogimiento celular, formación de cuerpos apoptóticos. Los cambios bioquímicos y moleculares son la activación de proteasas de cisteína, conocidas como caspasas, la fragmentación del ADN en fragmentos regulares, la translocación de fosfatidilserina de la capa interna a la externa de la membrana plasmática y la activación de transglutaminasas, entre otros. (Golstein P, 1997; Cohen, 1997; Martin y Green, 1995; Morán *et al.*, 1999; Nardi *et al.*, 1997). Este tipo de muerte es un proceso activo que ocurre de forma secuencial y ordenada y que requiere de energía y de síntesis de ARN y proteínas (Oppenheim, 1990). En este tipo de muerte se preserva el sistema membranar lo cual permite la formación de cuerpos apoptóticos, que se autodegradan o son fagocitados lo que evita el vaciamiento del contenido celular (Chimini, 2002; Green y Beere, 2001) y la consecuente reacción inflamatoria tisular (Kerr *et al.*, 1972; Ellis *et al.*, 1991; Lockshin *et al.*, 2000) (figura 1.1). A diferencia de la apoptosis, la muerte necrótica es un proceso de degeneración celular pasiva, con lisis generalizada de los componentes intracelulares, ruptura de las membranas internas y plasmáticas y el vaciamiento del contenido citoplásmico y de los organelos al espacio extracelular, con el consecuente proceso inflamatorio del tejido afectado (figura 1.1).

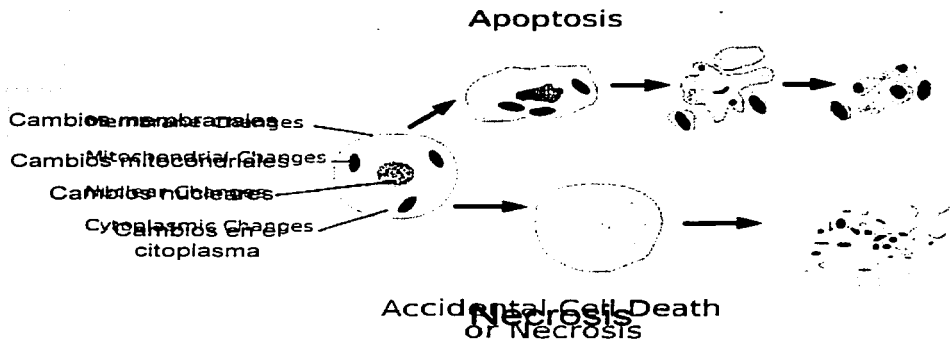


Figura 1.1. Diferencias entre la muerte celular apoptótica y la muerte necrótica. Cuando se genera la muerte apoptótica, ocurren cambios en el núcleo, los organelos y las membranas que llevan a la formación de los cuerpos apoptóticos. En la muerte necrótica hay degradación del contenido celular y lesión celular.

Las caspasas son proteasas de cisteína que forman parte de la maquinaria bioquímica que participa tanto en la parte iniciadora como ejecutora de la muerte apoptótica. Hasta ahora se han identificado catorce caspasas, las cuales se dividen en iniciadoras y ejecutoras. Dicha clasificación se basa en la participación temporal de las caspasas en el proceso de muerte celular (Hengartner, 2000). Las caspasas iniciadoras activan a su vez a las caspasas ejecutoras que tienen como sustratos las proteínas intracelulares (Kumar *et al.*, 2002) como los receptores, las enzimas, las proteínas estructurales, etc. (Oppenheim, 1990). Las caspasas iniciadoras se caracterizan por tener un prodominio largo (secuencia de aminoácidos conservada que caracteriza a la procaspasa) a diferencia de las caspasas ejecutoras, que tiene prodominios cortos. Aun no se conoce muy bien el papel que juegan todas estas caspasas en la muerte apoptótica (Hengartner, 2000) (figura 1.2).

Las caspasas reconocen una secuencia de al menos cuatro residuos de aminoácidos, siendo el último un residuo de aspártico. La selectividad de la caspasa por su sustrato se determina por la secuencia de los tres aminoácidos que preceden al residuo de aspártico (Martin y Green, 1995). Estas proteasas se encuentran presentes en las células como zimógenos que requieren ser procesados para

activarse. Todas las procaspasas están constituidas por un prodominio y dos subunidades catalíticas. La activación de la procaspasa se inicia con la fragmentación de los tres dominios y la asociación subsecuente de las subunidades catalíticas dando lugar a un complejo con una actividad proteolítica (figura 1.2).

La generación de los tres fragmentos puede ocurrir por la acción proteolítica de la misma caspasa o de una diferente (figura 1.3a). Esto se debe a que comparten la secuencia que incluye al residuo de aspártico (figura 1.2). En el caso de las caspasas iniciadoras, como la caspasa-8, se sugiere que ocurre una autoactivación debido a que las procaspasas tienen una actividad catalítica basal muy baja. La actividad basal es suficiente para activarlas cuando estas se aproximan por acción de proteínas adaptadoras (Salvesen *et al.*, 1999) (figura 1.3b). Otras caspasas iniciadoras, como la caspasa-9, pueden activarse por la formación de complejos que promueven su activación (Hengartner, 2000) (figura 1.3c). Finalmente, las proteínas efectoras se activan por un procesamiento directo de las caspasas iniciadoras (figura 1.3.a).

Dos de las caspasas iniciadoras más estudiadas son la caspasa-8 y la caspasa-9. La unión de un compuesto con su receptor membranal (Ashkenazi *et al.*, 1998), induce la agregación de una serie de proteínas adaptadoras en la parte citoplásmica del receptor formando un complejo conocido como DISC (*death-inducing signaling complex*, por sus siglas en inglés). Este complejo une la procaspasa-8 con una afinidad alta por y estimula la autoactivación por proximidad (figura 1.4) (Hengartner, 2000).

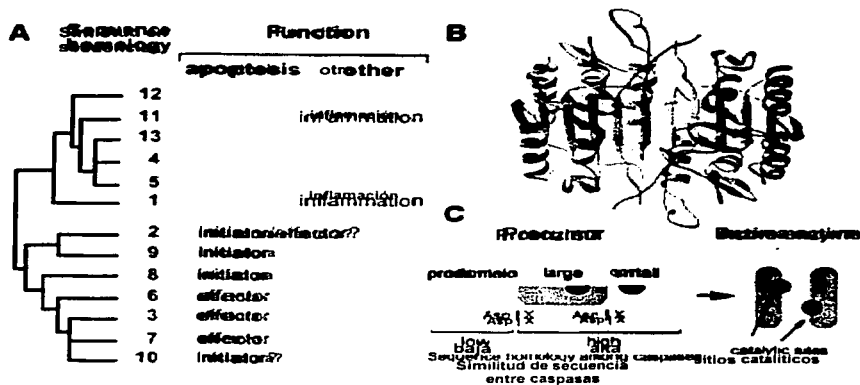


Figura 1. 2. Clasificación y estructura de las caspasas. En A se enlistan las caspasas conocidas y su función propuesta, así como la similitud entre ellas de acuerdo a su secuencia. En B una caspasa activa en un modelo de  $\alpha$  hélices y hoja  $\beta$  plegada. En C la estructura de una procaspasa con las tres subunidades o dominios, uno llamado prodominio o dominio de muerte, un dominio pequeño y uno largo. Las zonas con puntos negros indican los residuos de cisteína, que es el sitio catalítico de las caspasas. (Thornberry and Lazebnik, Science 1998, 281:1312-1316).

De manera similar, la caspasa-9 se activa mediante la formación de un complejo molecular llamado apoptosoma, constituido por la procaspasa-9, ATP y dos proteínas de origen mitocondrial: Apaf-1 (factor apoptótico activador de proteasas) y citocromo c (cit-c) (Hengartner, 2000) (figuras 1.3 y 1.4). En algunos modelos se ha sugerido que la activación de la caspasa-8 lleva a la liberación de algunas moléculas mitocondriales responsables de la inducción del apoptosoma y, en consecuencia, a la activación de la caspasa-9. Independientemente del proceso iniciador, al final de la cascada de proteasas se induce la activación de caspasas efectoras como las caspasas-3, 6 ó 7, las cuales son responsables de la fase ejecutora de la muerte apoptótica (figura 1.4) (Lockshin *et al.*, 2000; Zhung, *et al.*, 1999).

TESIS C.M.  
FALLA DE ORIGEN



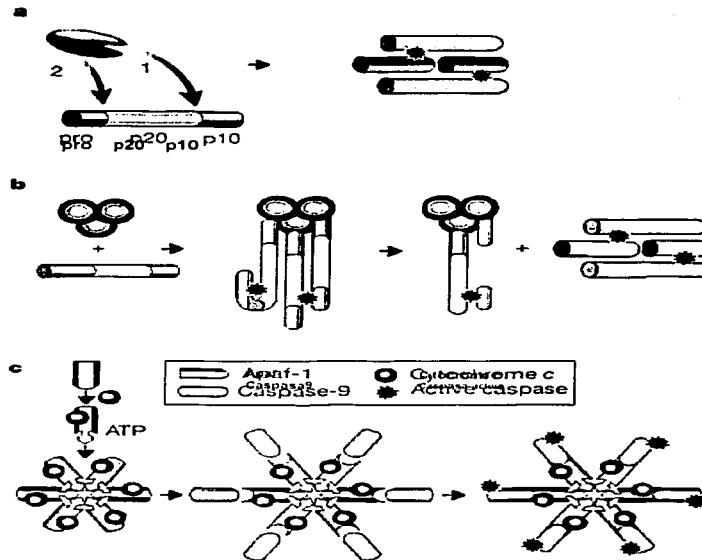


Figura 1.3. Modelos para explicar la activación de las procaspasas. En el panel a se muestra la activación de procaspasas por otras caspasas. La teoría de la proximidad que explica la activación de caspasas está basada en la actividad basal de las procaspasas que se ilustra en b. En c se muestra la formación del apoptosoma que es una estructura compleja que induce la activación de la caspasa-9. (Hengartner, Nature 2000, 407:770-776).

Además del cit-c y AIF, otras moléculas asociadas a la mitocondria e involucradas en la apoptosis son las proteínas pertenecientes a la familia de Bcl-2. Estas moléculas pueden tener una participación proapoptótica, como en el caso de Bax, o antiapoptótica como el Bcl-2. Se han clasificado en tres grupos. El primero incluye las moléculas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-x<sub>L</sub> (Hu *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1999; Nuydens *et al.*, 2000) que presentan cuatro dominios cortos con una homología alta en los dominios conocidos como BH (BH1-BH4), así como una cola hidrofóbica para el reconocimiento mitocondrial y del retículo endoplásmico, en donde se sabe que también participan. El segundo grupo, que incluye Bax y Bak con actividad

proapoptótica, es similar al grupo previo, pero carece del dominio BH4. El tercer grupo incluye moléculas proapoptóticas como Bid y Bik y se caracteriza por presentar un dominio BH3 de 12-16 aminoácidos (Hengartner, 2000) (figura 1.5).

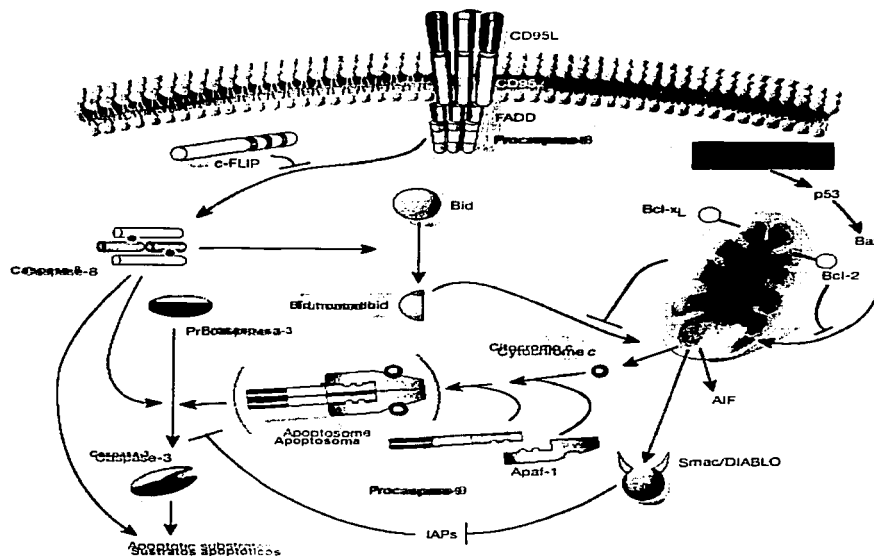


Figura 1.4. Activación de la caspasa-8 por un receptor de muerte. Para este ejemplo se ilustra la activación del receptor CD95L conocido también como Fas. Cuando el ligando se une al receptor se acumulan las proteínas adaptadoras como FADD que unida a la procaspasa-8 induce su activación. Cuando la caspasa-8 se activa puede entonces activar a la caspasa-3 (caspasa ejecutora). También se ejemplifica la activación de la caspasa-9 por la liberación de moléculas mitocondriales. Se ilustra también la participación de otras moléculas como las IAP's que inhiben las caspasas, así como la inhibición de estas por Smac/DIABLO. (Hengartner, Nature, 2000).

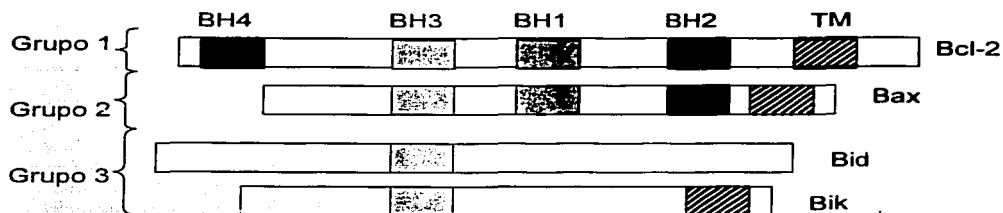


Figura 1.5. Comparación entre los dominios existentes en las secuencias de algunos miembros de la familia de Bcl-2. Se ilustran los dominios BH característicos de estas proteínas así como la cola hidrofóbica en el extremo C-terminal (TM). Los grupos 2 y 3 tienen actividad proapoptótica mientras que el grupo 1 tiene actividad antiapoptótica. (Hengartner, Nature, 2000).

Como se mencionó, la liberación mitocondrial del cit-c es uno de los pasos necesarios para formar el apoptosoma que activa la caspasa-9, una de las caspasas iniciadoras más importantes. No se conocen con exactitud los mecanismos de esta liberación, pero se ha propuesto que podría ocurrir a través del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PT) (Hengartner, 2000) y/o mediante la participación de algunas proteínas de la familia del Bcl-2. Una propuesta sugiere que el cit-c se libera a través de un poro formado por proteínas de la familia de Bcl-2 con o sin la participación de proteínas de otro tipo. Otra posibilidad es que algunos de los miembros proapoptóticos de Bcl-2 indujeran la ruptura de la membrana externa mitocondrial probablemente por procesos de oxidorreducción, facilitando así la salida de los componentes mitocondriales, incluyendo el cit-c (Hengartner, 2000).

Existen moléculas antiapoptóticas que, se cree, participan directamente sobre las caspasas, como es el caso de las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP). Esta familia de proteínas comprende una gran variedad de moléculas con un alto grado de conservación en su estructura primaria. Se han descrito proteínas en virus (CIAP, OpiAP, CpiAP, AciAP, ASFIAP), en mamíferos (XIAP, cIAP1, cIAP2, NAIP, BRUCE, Survivina, piAP), en insectos (DIAP1, DIAP2), en nemátodos (CeIAP1, CeIAP2) y en levaduras (SpIAP, AciAP). En varios estudios *in vitro* se ha podido demostrar que la sobreexpresión de una proteína de esta familia evita la apoptosis a través de caspasas (Deveraux *et al.*, 1999; Hengartner, 2000; Lockshin *et al.*, 2000).

**FALTA  
PAGINA**

**15**

muerte apoptótica (Chua *et al.*, 2000; Kruman *et al.*, 1999; Overbeeke *et al.*, 1999; Petersén *et al.*, 2000; Sakaguchi *et al.*, 1998). Los cambios en el pH intracelular también pueden desencadenar la muerte apoptótica, y en particular las neuronas son muy sensibles a los cambios en el pH (Ding *et al.*, 2000; Overbeeke *et al.*, 1999).

En los últimos años se ha descrito un proceso de muerte inducido y regulado por un estímulo que originalmente se asoció exclusivamente a la muerte necrótica, el estrés oxidativo (Atabay *et al.*, 1996; Kowaltowski *et al.*, 1999; Kroemer *et al.*, 1998; Nicholls y Budd, 2000; Sakaguchi *et al.*, 1998; Samali *et al.*, 1999; Schulz *et al.*, 1996; Valencia y Moran, 2001). El papel del estrés oxidativo en la muerte apoptótica se describe abajo y, dado que representa el tema central de este trabajo, se incluye un primer anexo sobre este particular al final de la Introducción.

### **1.2. Estrés oxidativo**

El estrés oxidativo se define como una condición en la que hay un serio desbalance entre los niveles tanto de especies de oxígeno reactivas y las defensas antioxidantes en una célula. Las razones del desbalance pueden ser por una condición que genera más EOR o por un deterioro en las defensas antioxidantes celulares (Halliwell, 2003). El estrés oxidativo se asocia generalmente con una producción excesiva de EOR, así como de radicales libres. Los radicales libres son todas aquellas especies químicas que tienen un electrón desapareado en su estructura molecular. Las EOR son especies más reactivas que el oxígeno en su estado basal de energía (Halliwell, 1992). Algunas de estas especies son altamente reactivas y tienen la capacidad de modificar la estructura de otras moléculas, como proteínas, lípidos, azúcares, ácidos grasos, DNA, RNA, causando una disfunción de las mismas, alterando de esta forma el estado metabólico general de la célula. Los procesos de oxidación debidos a las EOR están relacionadas con diversas patologías, así como en procesos fisiológicos durante la reestructuración celular y el desarrollo de los organismos (Ceballos-Picot, 1997).

Existen diversos sistemas celulares que pueden inducir la formación de EOR. La síntesis del óxido nítrico induce de manera secundaria la formación de  $O_2^{\cdot-}$ . La actividad de la xantina oxidasa, que es una enzima encargada del catabolismo de

los nucleótidos de adenina y guanina, también genera este radical (Arai *et al.*, 1998; Lacy *et al.*, 1998). Sin embargo, una de las fuentes de EOR más importantes es la mitocondria, que genera espontáneamente tanto  $O_2^-$  a través de la cadena de transporte de electrones (Halliwell, 1992; Du *et al.*, 1998; Irani *et al.*, 1998; Kowaltowski *et al.*, 1999) lo que, junto con su contribución de moléculas pro y antiapoptóticas la coloca como uno de los organelos más importantes en el control de la muerte celular (Chang *et al.*, 2002; Fiskum *et al.*, 1999; Kroemer *et al.*, 1998; Mattson *et al.*, 1993; Nicholls *et al.*, 2000; Overbeeke *et al.*, 1999; Petersén *et al.*, 2000; Sureda *et al.*, 1999; Yakes *et al.*, 1997; Zhuang *et al.*, 2000).

Se sabe que en células del sistema inmune (macrófagos y neutrófilos) existe un complejo enzimático llamado NADPH-oxidasas que está conformado por 5 subunidades, dos membranales, la subunidad catalítica gp91-phox y la p22-phox, y tres citosólicas, la p40-phox, la p47-phox y la p67-phox. Este complejo utiliza Rac como cofactor y está encargado de formar  $O_2^-$  con fines microbicidas, generando un proceso llamado "explosión respiratoria" (Diatchuk *et al.*, 1997; Hua *et al.*, 2000; Inoguchi, 2000; Jones *et al.*, 2000; Pick *et al.*, 1987; Sumimoto *et al.*, 1996; Zhuo *et al.*, 1997).

El estado oxidativo en una célula es el resultado del balance entre la producción y la eliminación de las EOR, por lo que los sistemas antioxidantes endógenos juegan un papel importante en la homeostasis celular. Existen dos tipos de antioxidantes de acuerdo a la forma de eliminar las EOR, los enzimáticos y los no enzimáticos. Dentro del primer grupo se encuentran enzimas como las distintas isoformas de la superóxido dismutasa (CuZnSOD, ECSOD y MnSOD) que se encargan de transformar al anión superóxido ( $O_2^-$ ) en agua y peróxido de hidrógeno; otras como la catalasa o la glutatión peroxidasa transforman el peróxido de hidrógeno en agua (Ceballos-Picot, 1997; Halliwell, 1992). El segundo grupo de antioxidantes incluye algunas vitaminas como el tocoferol y el ácido ascórbico, así como el glutatión y el ácido úrico, entre otros. Algunas de estas moléculas, como el tocoferol, se localizan en las membranas celulares evitando reacciones oxidativas en los lípidos y proteínas membranales; otros antioxidantes como el ácido ascórbico, el úrico y el glutatión se distribuyen en el citoplasma.

En los últimos años se ha relacionado una condición prooxidante con la muerte celular necrótica o apoptótica en distintos estados fisiológicos o patológicos (Fiskum *et al.*, 1999; Kroemer *et al.*, 1998; Nicholls *et al.*, 2000; Samali *et al.*, 1999). Más recientemente, se ha propuesto incluso que el estrés oxidativo participa como una señal que regula y controla el proceso de muerte apoptótica. Para diversos modelos experimentales se ha sugerido que el peróxido de hidrógeno induce la muerte apoptótica, ya sea activando o no las caspasas (Sakaguchi *et al.*, 1998). El anión superóxido se ha relacionado con la muerte apoptótica neuronal y con la activación de la vía de señalización a través del receptor Fas (Greenlund *et al.*, 1995). También el oxígeno singulete ( $^1O_2$ ) se ha asociado con los procesos de estrés oxidativo y de daño celular, en varios modelos, tanto neuronales como en otros tipos celulares (Chan *et al.*, 2000; Manev *et al.*, 1995; Moreno *et al.*, 2001; Salet *et al.*, 1997; Zhuang *et al.*, 1998).

Se ha descrito la formación de un poro de transición en la mitocondria (PT) durante la muerte apoptótica y necrótica, que tiene una relación íntima con los cambios en el calcio intracelular y la generación del estrés oxidativo. Esta estructura se forma entre la membrana externa y la interna de la mitocondria cuando hay una ausencia externa de nucleótidos de adenina, en presencia de concentraciones altas de fósforo inorgánico (Pi) o con una sobrecarga de peróxidos y de calcio en la mitocondria. La apertura de dicho poro induce la movilización de diversos metabolitos, incluyendo el calcio, además de un cambio en el potencial de la membrana mitocondrial. El PT está compuesto por una translocasa de nucleótidos de adenina (ANT) localizada en la membrana interna de la mitocondria, la ciclofilina D en la matriz mitocondrial y un canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) en la membrana externa de la mitocondria. Las moléculas que regulan la apertura de este PT son Bax, las cinasas de glicerol, las hexocinasas, los receptores a benzodiacepinas y las cinasas de creatina (Crompton, 1999).

Se ha sugerido que el PT tiene una participación importante en la muerte apoptótica ya que diversas moléculas proapoptóticas (AIF, Citocromo c, miembros de Bcl-2, entre otras) están relacionados con la mitocondria. Además se ha demostrado que cuando la muerte apoptótica se ha iniciado hay una pérdida del

potencial de membrana mitocondrial, lo cual se ha asociado a la liberación del citocromo c y la activación de la caspasa-9. También se ha propuesto la participación de este PT en la muerte neuronal asociada con una sobrecarga de calcio y con un estrés oxidativo relacionados con episodios isquémicos (Crompton, 1999; Hengartner, 2000).

Recientemente se ha sugerido que otro complejo enzimático, la NADPH-oxidasa, podría participar activamente en la muerte apoptótica generando EOR en diversos tipos celulares, como en las neuronas centrales y periféricas (Hwang *et al.*, 2002; Mellquist *et al.*, 2000; Shimohama *et al.*, 2000; Tammariello *et al.*, 2000). Otros estudios han propuesto la participación en la muerte apoptótica neuronal de otra oxidasa, la NADH-oxidasa dependiente de ascorbato (Martín-Romero *et al.*, 2002).

Dados estos antecedentes, resulta evidente la importancia que tiene estudiar el papel del estrés oxidativo en la muerte apoptótica. Resulta entonces necesario saber, por un lado, si el estrés oxidativo es una señal para el inicio y/o la progresión de la muerte o si es simplemente un elemento ejecutor que contribuye a la muerte. Por otro lado, es importante saber qué tan generalizado es el papel del estrés oxidativo como un mecanismo inductor del proceso de muerte celular fisiológica que opera en el desarrollo, determinando la citoarquitectura, el modelaje y la funcionalidad del sistema nervioso, así como en la muerte patológica que se observa en el daño con la hipoxia/isquemia o en las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson, Huntington, Alzheimer, etc.

### **1.3. Neuronas granulares del cerebelo**

Durante el desarrollo del sistema nervioso ocurren una serie de procesos requeridos para completar los procesos de maduración y diferenciación celular. En el cerebelo de la rata, existe una gran actividad celular y molecular durante la proliferación, diferenciación y migración de las neuronas cerebelares previas al nacimiento y durante las siguientes 3 semanas de vida del animal (Itoh, 1984). Otro de los procesos fundamentales durante esta etapa lo constituye la muerte neuronal. Se considera que, después del nacimiento, cerca de la mitad de las neuronas generadas durante la etapa de proliferación mueren como resultado de la activación



de un programa de muerte en respuesta a señales externas e internas (Itoh, 1984). Se ha sugerido que esta muerte es de tipo apoptótico.

Las neuronas granulares del cerebelo constituyen más del 80% de las neuronas de esta estructura. Estas células se localizan en la parte más interna de la corteza cerebelar, que está constituida además por las células de Purkinje, las células en canasta, las células estrelladas y las células de Golgi. La corteza cerebelar está formada por tres capas: la capa molecular, formada por las células en canasta, las células estrelladas, los axones de las células granulares y los árboles dendríticos de las células de Purkinje; la capa de Purkinje contiene los somas de las células de Purkinje y la capa granular está constituida por las células granulares y las células de Golgi (Itoh, 1984).

Durante ciertos periodos críticos del desarrollo del cerebelo (las tres primeras semanas después del nacimiento), las neuronas granulares reciben aferencias colinérgicas y glutamatérgicas de los núcleos pontinos provenientes de la médula espinal. Se ha sugerido que estas aferencias representan una señal trófica que promueve la diferenciación y la sobrevivencia de estas neuronas. Así, el establecimiento correcto de las conexiones contribuye a la regulación de la sobrevivencia de las células granulares. Se sugiere que esto se debe a un incremento del calcio intracelular que, en el caso de las sinápsis glutamatérgicas, se podría dar por la activación del canal iónico permeable al calcio que esta acoplado con los receptores glutamatérgicos del tipo NMDA (*N*-metil-D-aspartato), de las células granulares del cerebelo. La idea de que el incremento del calcio intracelular es una respuesta celular a la señal trófica para la sobrevivencia de estas neuronas, se basa en evidencias que muestran que, si se atrapa el calcio intracelular inducido por el estímulo, las neuronas mueren (Burgoyne *et al.*, 1993; Gallo *et al.*, 1987; Moran *et al.*, 1999). La dependencia del calcio para la sobrevivencia de las neuronas granulares ocurre exclusivamente en un periodo corto y crítico del desarrollo. Más adelante, en las neuronas maduras, esta condición resulta altamente tóxica y constituye la causa de muerte excitotóxica en éstas y otras neuronas del SNC (Dessi *et al.*, 1993).

El empleo de los cultivos de neuronas granulares del cerebelo ha resultado ser un modelo muy útil para entender los procesos celulares y moleculares involucrados en el desarrollo del sistema nervioso, como la migración y la maduración neuronal y, más recientemente, la muerte neuronal (Balász *et al.*, 1988a; Morán *et al.*, 1989). Para que las neuronas granulares sobrevivan en cultivo se deben mantener en un medio con 25 mM de KCl extracelular, lo que se cree que mimetiza la despolarización inducida por las fibras glutamatérgicas presinápticas *in vivo*. La despolarización con potasio induce un incremento del calcio intracelular al activarse los canales de calcio sensibles al voltaje. La privación de potasio extracelular en cultivos de neuronas granulares que se han mantenido despolarizadas por más de 5 días *in vitro*, induce un proceso de muerte neuronal semejante a lo que pasa *in vivo* cuando se establece la competencia entre las conexiones de las fibras musgosas con las neuronas granulares (D'Mello *et al.*, 1993; Morán *et al.*, 1999; Schulz *et al.*, 1996; Valencia y Moran, 2001). Por esta razón este modelo de muerte se ha utilizado ampliamente para estudiar los mecanismos moleculares y celulares de este proceso durante el desarrollo.

- 1.4. **“Participación de las especies reactivas de oxígeno en la muerte apoptótica neuronal en el desarrollo y en algunas patologías”.** Valencia A. y Morán J.

# PARTICIPACIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN LA MUERTE APOPTÓTICA NEURONAL EN EL DESARROLLO Y EN ALGUNAS PATOLOGÍAS

Antonio Valencia Pérez y Julio Morán Andrade. Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Apartado Postal 70-253, C. P. 04510, México, D.F. Tel.: 5622-5616. Fax: 5622-5607. Correo electrónico: avalenci@ifisiol.unam.mx y jmoran@ifisiol.unam.mx

Recibido: 29 de noviembre de 2001. Aceptado: 19 de junio de 2001.

## RESUMEN

La muerte apoptótica se caracteriza por ser un proceso activo y ordenado en el que participa un gran número de moléculas, incluyendo las caspasas, las cuales degradan una amplia variedad de sustratos durante el inicio o la ejecución del proceso. Durante la muerte apoptótica se presenta un estado de tensión oxidativa, que parece influir de manera definitiva en los mecanismos de la apoptosis. El peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ), el peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) y otras especies reactivas de oxígeno (ERO) se han relacionado con el daño celular que induce la muerte tanto necrótica como apoptótica. Existen evidencias de que episodios oxidativos participan durante la muerte apoptótica en el sistema nervioso, como en el caso de ciertas patologías (enfermedades de Alzheimer y Parkinson, Síndrome de Down, esclerosis lateral amiotrófica), así como durante el desarrollo del cerebro cuando se eliminan neuronas y se establecen las interacciones celulares adecuadas. En todos estos casos se ha propuesto que la tensión oxidativa podría servir como una señal y/o un proceso ejecutor de la muerte apoptótica.

**PALABRAS CLAVE:** Tensión oxidativa, apoptosis, caspasas, desarrollo neuronal.

## ABSTRACT

Apoptotic cell death is an active and highly ordered event that involves a large variety of molecules including caspases. These are proteases acting on a number of substrates during the initiation and execution of apoptosis. During apoptotic cell death a critical increase in oxidative stress occurs, which seems

to play a key role in this process. Hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and some reactive oxygen species (ROS) are involved in apoptosis, including superoxide anion ( $O_2^{\cdot-}$ ), hydroxyl radical ( $\cdot OH$ ) and peroxynitrite ( $ONOO^-$ ). A large body of evidence shows that ROS are involved in apoptotic neuronal death in a variety of pathological conditions such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Down's Syndrome and lateral amyotrophic sclerosis. Oxidative stress also plays a role in other events in which neuronal death represents a strategy for eliminating undesirable cells as occurs during the development of the nervous system. In all these cases ROS have been suggested to act as a signal and/or the executor of apoptotic cell death.

**KEY WORDS:** Oxidative stress, apoptosis, caspases, neuronal development.

## INTRODUCCIÓN

El interés por conocer y entender los mecanismos que regulan la muerte neuronal se ha incrementado desde que se estableció la distinción entre dos tipos de muerte celular con características particulares, la muerte apoptótica y la muerte necrótica. La muerte apoptótica es un proceso activo y programado que incluye la expresión de múltiples genes que controlan cada uno de los pasos asociados con el proceso de la muerte celular, mientras que la muerte necrótica es un proceso pasivo asociado con un deterioro generalizado de las funciones y de las estructuras celulares.

Durante la maduración y desarrollo del sistema nervioso casi la mitad de las neuronas mueren co-

mo resultado de la competencia por las células blanco y por el aporte limitado de conexiones presinápticas y/o factores tróficos, y se sabe además que este proceso tiene características de muerte apoptótica. La muerte apoptótica en el sistema nervioso parece estar asociada con algunos estados neurológicos agudos como la hipoglucemia, la hipoxia, el infarto cerebral, la epilepsia, etc., así como en estados neurodegenerativos crónicos como la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Alzheimer y la esclerosis lateral amiotrófica. Muchos de estos desórdenes están relacionados con alteraciones en el balance energético de las neuronas y, en muchos de los casos como consecuencia de esto, a la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO). En diversos modelos de muerte neuronal, este último factor parece ser determinante para la génesis y la evolución de muchos de los trastornos mencionados.

Como se sabe, un metabolismo aeróbico siempre está asociado a la producción de ERO, lo que ha llevado a la evolución de una gran variedad de sistemas bioquímicos antioxidantes. Por lo general un incremento en la tensión oxidativa es un estado fisiopatológico que resulta adverso para la célula que lo experimenta. El desbalance del estado redox de una célula lleva a la acumulación o generación excesiva de ERO, ya sea por un incremento en el metabolismo oxidativo o bien por las alteraciones en los sistemas antioxidantes endógenos. Las ERO son especies químicas derivadas del oxígeno que incluyen aquellas moléculas que presentan uno o más electrones desapareados en su último orbital molecular (radicales libres) y otras que sin ser radicales libres son muy reactivas dada su poca estabilidad electrónica. Las ERO pueden oxidar proteínas (atacando residuos azufrados y provocando entrecruzamiento proteico), lípidos, azúcares, al ácido desoxirribonucleico (ADN) y al ácido ribonucleico (ARN), que como consecuencia puede producir daño y muerte celular.

## TENSIÓN OXIDATIVA: ORIGEN, BLANCOS Y DEFENSAS

Para el establecimiento de una condición de tensión oxidativa se requiere de un incremento en la cantidad de ERO. Algunas de éstas incluyen al oxígeno en singlete ( $^1O_2$ ), al anión superóxido ( $O_2^-$ ), al peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), al radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ), al óxido nítrico ( $NO\cdot$ ) y al peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) entre otros. En la célula existe una amplia variedad de fuentes para la generación de ERO, una de éstas se encuentra en la mitocondria, particularmente en los componentes de la cadena respiratoria (Fig. 1). Durante el transporte de electrones en la mitocondria se forma el  $O_2^-$  de manera espontánea y se calcula que entre el 1% y el 5% de los electrones transportados a este nivel forman dicho radical (1). El  $O_2^-$  también puede formarse por acción de la xantina oxidasa (enzima involucrada en el catabolismo de los nucleótidos) que tiene como sustrato a la hipoxantina y a la xantina. Se sabe que una modificación de la xantina deshidrogenasa por acción de proteasas dependientes de calcio y/o por la oxidación de sus grupos tiol, se transforma en la xantina oxidasa. Otra fuente importante de la formación del  $O_2^-$  está dada por la actividad de la NADPH-oxidasa, la cual es responsable de transferir electrones del NADPH al oxígeno molecular para producir el anión superóxido (Fig. 2). Se ha demostrado la presencia de la NADPH-oxidasa en las

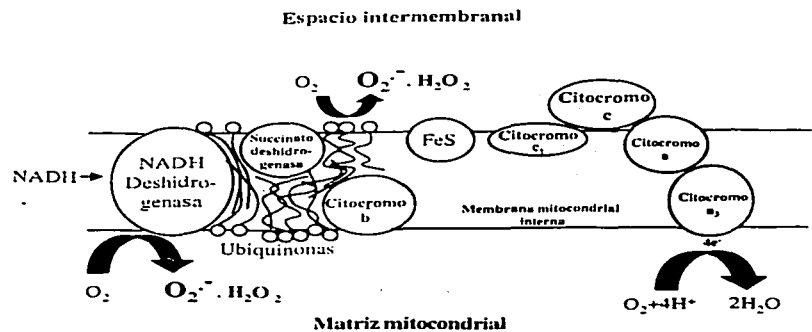


Figura 1. Uno de los sitios donde se generan especies reactivas de oxígeno, específicamente el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno, es en los componentes de la cadena respiratoria en la membrana interna de la mitocondria. Particularmente en el ciclo de las ubiquinonas y en la succinato deshidrogenasa se da la formación al anión superóxido ( $O_2^-$ ); a su vez, el anión superóxido formado puede dar origen al peróxido de hidrógeno. Las líneas terminadas en punto indican inhibidores de los componentes de la cadena respiratoria.

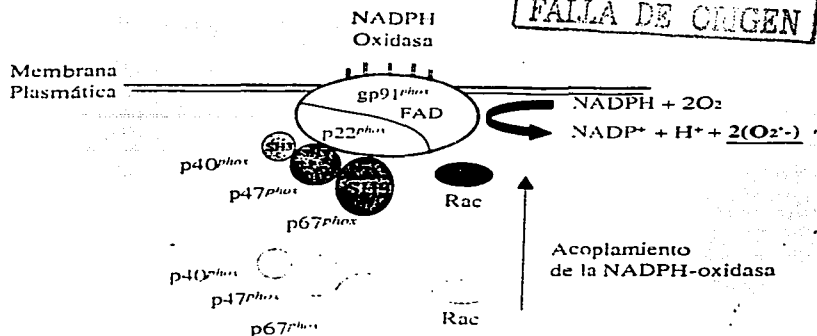
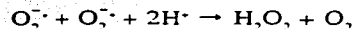


Figura 2. La NADPH-oxidasa es una enzima polipeptídica que tiene la función de generar el anión superóxido a partir del oxígeno y el NADPH. Los componentes de esta enzima son gp91<sup>phox</sup> (con un sitio de unión a FAD) y p22<sup>phox</sup>; ambas subunidades se localizan en la membrana plasmática celular. Además, p40<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> y p67<sup>phox</sup> son componentes citosólicos que se unen a las subunidades membranales para conformar la enzima activa. Algunos componentes de esta enzima (p40<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> y p67<sup>phox</sup>) son proteínas que contienen dominios específicos llamados SH3, los cuales son necesarios para el establecimiento del complejo activo de la enzima. Además, se requiere de una molécula acopladora pequeña que tiene la capacidad de unir GTP llamada Rac. Los dominios SH3, particularmente de la subunidad p47<sup>phox</sup>, reconocen una secuencia rica en prolina (PLP) que favorece la unión y el ensamblaje de los complejos enzimáticos. La flecha indica el paso de los componentes citosólicos a un estado de asociación con los elementos de la membrana durante la activación de la enzima.

neuronas de mamífero, y en experimentos realizados con ratones deficientes de esta enzima se ha observado una reducción significativa de la muerte apoptótica inducida por la privación del factor de crecimiento nervioso o NGF en neuronas en cultivo (3-5). A pesar de las evidencias encontradas en algunos modelos *in vitro* e *in vivo*, el mecanismo por el cual la NADPH-oxidasa incrementa su actividad no está claro, sin embargo parece depender de un incremento en la concentración de calcio intracelular (3).

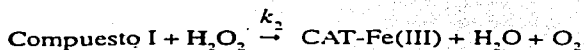
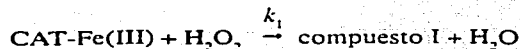
Dentro de la mitocondria se encuentra una de las defensas más efectivas contra el O<sub>2</sub><sup>-</sup>, la enzima superóxido dismutasa que contiene manganeso (MnSOD); esta forma de SOD se localiza en la matriz mitocondrial y está compuesta por cuatro subunidades idénticas. Esta enzima convierte el radical O<sub>2</sub><sup>-</sup> en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1). En el citosol existe otra isoforma de la SOD que contiene dos grupos hemo, uno con cobre y otro con zinc (Cu/ZnSOD); esta enzima está compuesta por dos subunidades y cada una contiene un

grupo hemo de Cu/Zn. Una tercera isoforma de la SOD está presente de manera ubicua en los tejidos, la superóxido dismutasa extracelular que también contiene Cu/Zn (ECSOD). La reacción en la cual la SOD dismuta el anión superóxido en peróxido de hidrógeno es la siguiente:



Por otra parte, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es una molécula con capacidad para difundir a través de las membranas, lo que la hace una molécula con un mayor potencial dañino a cualquier nivel celular, incluyendo membranas, proteínas, ADN, etc. Por tal razón la eliminación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es tan importante como la del O<sub>2</sub><sup>-</sup>, y la enzima responsable de esta reacción es la catalasa (CAT), enzima dependiente de hierro (Fe III) capaz de transformar el peróxido de hidrógeno en oxígeno molecular y agua. La CAT es

una enzima compuesta por cuatro subunidades y cada una contiene un grupo hemo con Fe III. La reacción mediada por la CAT se puede resumir como sigue:



donde  $k_1$  y  $k_2$  son constantes de velocidad. Se ha calculado que para el caso de CAT del hígado de la rata  $k_1 = 1.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  y  $k_2 = 2.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . La estructura exacta del compuesto I es incierta; el hierro es oxidado a una valencia nominal de Fe(V), pero la deslocalización extensiva de carga en sus anillos hace que la descripción en su estructura sea muy difícil de predecir. Es probable que la estructura del compuesto sea un intermediario entre el peróxido férrico (Fe(III)-HOOH) y Fe(V)O. El contenido de CAT en

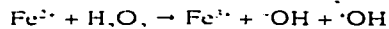
el cerebro es bajo, al igual que en otros tejidos como el corazón y el músculo esquelético, pero se encuentra en altas concentraciones en el hígado y en los eritrocitos.

Otra enzima antioxidante importante es la glutatión peroxidasa (GSHPx) la cual está presente en el citoplasma y en la matriz mitocondrial. Esta enzima es dependiente de selenio y existen dos isoformas, como dímero y como tetramero. Tiene una alta actividad en el hígado, actividad moderada en el cerebro, el corazón y el pulmón, mientras que tiene una actividad baja en el músculo esquelético. Su sustrato particular es el glutatión, una molécula de bajo peso molecular muy abundante en los seres vivos. Por medio de la siguiente reacción es capaz de ayudar a la eliminación del  $H_2O_2$  de manera indirecta:



donde el GSH es el glutatión reducido y el GSSG es el glutatión oxidado. Además de la GSHPx, existen varias peroxididas que se encargan de eliminar al peróxido de hidrógeno, entre ellas se encuentran la citocromo c peroxidasa, la NADPH peroxidasa y varias peroxididas inespecíficas.

Por otro lado, durante la actividad sináptica y otras condiciones tanto fisiológicas como patológicas que involucren un aumento intracelular de calcio ( $[Ca^{2+}]_i$ ), se induce la formación de  $NO^*$  a través de la activación de la sintetasa del óxido nítrico (NOS). El  $NO^*$  generado puede reaccionar con el  $O_2^{\cdot-}$  para formar  $ONOO^-$  y éste a su vez puede descomponerse en  $\cdot OH$ . El radical hidroxilo no se origina por procesos enzimáticos, sino que se forma principalmente a partir de  $H_2O_2$  en presencia de  $Fe^{2+}$  por la reacción de Fenton:



Existen algunas moléculas endógenas capaces de atrapar el electrón de alta energía de los radicales hidroxilo y de esta manera evitar el daño celular. Entre estas moléculas se encuentra el ácido ascórbico, la vitamina E, el ácido úrico, el GSH, algunos alcoholes (polioles), moléculas conteniendo residuos de cisteína, la guanosina y compuestos aromáticos que en sus anillos atrapan dicho electrón inhibiendo la capacidad oxidante del radical.

Otras enzimas con actividad antioxidante en el sistema nervioso son las hemo-oxigenasas. Existen dos tipos, la hemo-oxigenasa-1 (HO-1), que es inducible y la hemo-oxigenasa-2 (HO-2), que es constitutiva. Estas enzimas pertenecen a una familia de proteínas que incorporan el  $O_2$  a un sustrato orgánico para producir grupos hidroxilo, por lo que tienen la habilidad de utilizar el anión superóxido como fuente de electrones. La HO-1 es una enzima microsomal cuya actividad induce la formación de biliverdina y monóxido de carbono. La activación de la HO-1 depende de episodios de tensión oxidativa, y generalmente se presenta en combinación con la actividad de la Cu/ZnSOD en la enfermedad de Alzheimer (AD) (4).

Las ERO pueden actuar a diferentes niveles celulares, incluyendo la peroxidación de los lípidos de las membranas. Se conocen derivados de la lipoperoxidación como el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxi-nonenal (4-HNE). Durante su formación pueden producir entrecruzamiento de las proteínas, atacando residuos de histidina y cisteína particularmente; en general las ERO pueden ocasionar daño celular a diferentes niveles (Fig. 3). Se ha descrito un incremento en la lipoperoxidación luego de episodios prolongados de isquemia, inyecciones de sal de hierro y daño por metil-mercurio. Sin embargo, el daño causado por la tensión oxidativa no necesariamente incluye una peroxidación lipídica (1).

## APOPTOSIS

La muerte apoptótica es un proceso activo y ordenado que requiere de la síntesis de ARN mensajero (ARNm) y proteínas. La apoptosis se caracteriza por una serie de cambios celulares que incluyen la condensación y relocalización de la cromatina, la fragmentación regular del ADN en segmentos homogéneos de alrededor de 158 pares de bases, la pérdida transitoria del potencial de membrana mitocondrial asociado a la liberación del citocromo c, la activación de transglutaminasas específicas, la translocación de fosfatidilserina (PS) de la lámina interna a la externa de la membrana plasmática como resultado de la activación de fosfolipasas específicas y la formación de cuerpos apoptóticos, entre otros (3, 5).

La activación del proceso de muerte incluye la participación de una familia de proteasas de cisteína (caspasas) que está involucrada en el inicio y en la ejecución de la muerte apoptótica (3, 5). Las caspa-

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Valencia Pérez A y Morán Andrade J

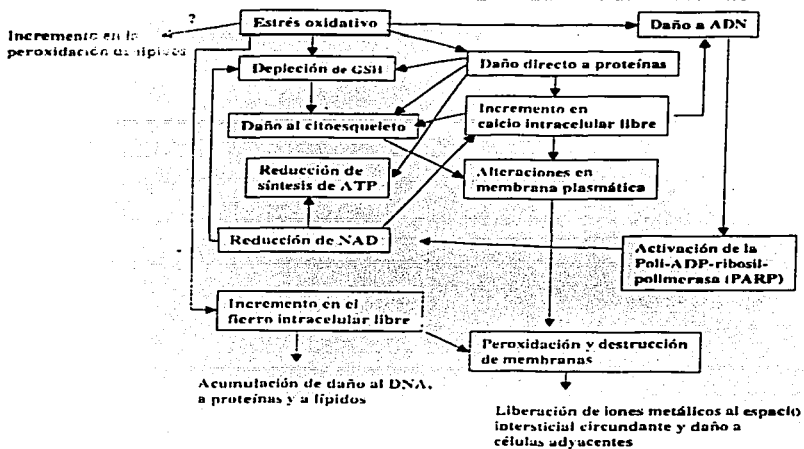


Figura 7. Se muestran algunos de los mecanismos de interacción durante el daño celular oxidativo por la tensión oxidativa. El daño puede ser directo, como en el caso de la oxidación de proteínas en grupos -SH inducida por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o induciendo la fragmentación del ADN por el <sup>•</sup>OH y el O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. También hay daño indirecto, como es el provocado por el incremento en la concentración de calcio intracelular, que a su vez puede potenciar la tensión oxidativa. El incremento en el calcio intracelular no sólo activa algunas proteasas dependientes de este ión que atacan a componentes del citoesqueleto, sino que también pueden activarse nucleasas que inducen daño al material nuclear. Además, la sobrecarga de calcio en el mitocondria facilita la liberación de Fe<sup>2+</sup> de esta forma, incrementa el daño oxidante dentro de la célula. (Tomado y modificado de Halliwell, ref. 1).

Las caspasas contienen un sitio activo muy conservado con una secuencia QACXG (en donde X pueden ser R, Q o G) y se caracterizan por tener una alta afinidad por los residuos de ácido aspártico en la posición P<sub>1</sub> luego de la secuencia de reconocimiento. Al igual que todas las proteasas, éstas se sintetizan como zimógenos inactivos que requieren ser fragmentadas una o más veces para conformar las caspasas activas. Las caspasas tienen una gran variedad de sustratos como proteínas del citoesqueleto, proteínas citosólicas, proteínas nucleares e incluso otras caspasas. Se conocen 14 caspasas que se han clasificado en dos grandes grupos, como iniciadoras y ejecutoras de acuerdo a su participación en la cascada proteolítica característica. La caspasa-3 es una caspasa ejecutora, que participa en la fase final del proceso de muerte celular, al igual que la caspasa-7 con la que comparte numerosos sustratos y estructura molecular, con

la diferencia de que la caspasa-7 es mitocondrial y la caspasa-3 citosólica (5). La caspasa-3 puede ser activada por otras caspasas iniciadoras como la caspasa-8 o la 9. Las caspasas-8 y 9 necesitan ser reclutadas por otras moléculas conocidas como proteínas adaptadoras o reclutadoras para ser activadas. La caspasa-9 forma complejos con moléculas reguladoras pertenecientes a la familia del Bcl-2 y con el citocromo c para activarse. La caspasa-8 es reclutada por los llamados receptores de muerte, como el receptor al factor de necrosis tumoral (TNF) entre otros, y se activa al formar un complejo peptídico con algunas proteínas adaptadoras, iniciando de esta manera una cascada de proteasas que culmina con la muerte celular (5). Se ha descrito también la actividad de la caspasa-1 en procesos de muerte celular, particularmente en la apoptosis observada por neuronas del sistema límbico cuando se induce isquemia cerebral. Por otro lado, para la caspasa-2 se ha descrito un papel tanto de caspasa iniciadora como ejecutora durante la muerte celular, que junto con el resto de las caspasas su integración en la clasificación de ejecutoras e iniciadoras queda aún incompleta.

Existen otras proteínas asociadas al proceso de muerte con acción antiapoptótica, como la proteína Bcl-2, que está asociada a la mitocondria y parece inhibir la actividad de la caspasa-9. Se ha propuesto que probablemente la proteína Bcl-2 regule la actividad de la caspasa-9 mediante la interacción con el citocromo c cuando éste se ha liberado de la mitocondria y forma un complejo con dicha caspasa (5).

Otras proteínas endógenas que intervienen directamente en la inhibición de la apoptosis son las llamadas proteínas inhibidoras de la apoptosis o IAP's.

Estas proteínas contienen dominios característicos conocidos como BIR (dominio de alta homología con la IAP's de baculovirus), CARD (dominio de reclutamiento de caspasas) y un anillo RING-"finger" (dominio que interactúa con el ADN en el carboxilo terminal de la proteína). Las IAP's regulan la actividad de las caspasas inhibiéndolas mediante un mecanismo desconocido hasta ahora, pero se sugiere que las caspasas se unen al dominio CRAD de las IAP's inhibiendo su hidrólisis y por tanto su activación. Se ha demostrado que la muerte apoptótica inducida por distintos estímulos se previene en algunos modelos neuronales de células simpáticas *in vitro* mediante la sobre expresión de NAIIP (proteína neuronal inhibidora de la apoptosis).

Recientemente se ha demostrado que durante la apoptosis se genera un estado de tensión oxidativa como respuesta a una gran variedad de estímulos inductores de la muerte celular. Como ya se mencionó, se sabe que las células responden a daños oxidativos mediante la activación de las enzimas SOD, CAT y GSHPx. Se ha sugerido también que el Bcl-2 funciona como un antioxidante y que su acción anti-apoptótica se puede deber, en parte, a esta actividad. Sin embargo, no existen evidencias claras que apoyen esta idea (1, 6).

#### PAPEL DE LAS ERO, EL CALCIO Y LA MITOCONDRIA EN LA APOPTOSIS

La mitocondria es una fuente importante de ERO, particularmente de  $H_2O_2$  y  $O_2^{\cdot-}$ . La formación de dichas especies se lleva a cabo durante el transporte de electrones en la cadena respiratoria. Durante las primeras fases de la muerte apoptótica, los radicales superóxido pueden ser transformados por la MnSOD dentro de la mitocondria en  $H_2O_2$ , el cual difunde hacia el espacio citosólico en donde es capaz de inducir la formación de radicales  $\cdot OH$  y producir daño celular (7). Además, cuando hay alteraciones en la producción de la energía celular, particularmente cuando algunos de los complejos de la cadena respiratoria están alterados o desacoplados (complejos mitocondriales I, III y IV), se observan cambios en el equilibrio celular del glutatión, que puede inducir un estado oxidativo importante (7, 8). Se ha demostrado también que la síntesis de ATP se mantiene a lo largo del proceso apoptótico, ya que se han detectado niveles basales de dicha molécula en mitocondrias aisladas de células que han iniciado el proceso de muerte

apoptótica, y esto se ha relacionado con la producción de ERO en fases críticas de dicho proceso. Esto refuerza la idea de que la manutención de un estado energético de la célula cercano a la normalidad es crucial para mantener el proceso de muerte apoptótica (7, 8).

Otro evento importante durante un episodio de tensión oxidativa es la alteración en la homeostasis de calcio intracelular, particularmente por modificaciones en las condiciones iónicas en los organelos que secuestran este catión. La tensión oxidativa afecta la homeostasis de calcio a diferentes niveles. Por un lado, las ERO pueden alterar canales y receptores relacionados con el movimiento de  $Ca^{2+}$ , como pueden ser los receptores al inositol 1,4,5-trifosfato o  $IP_3$  y receptores a diferentes neurotransmisores. Esto se ha demostrado en células de corazón y riñón, así como en modelos de isquemia cerebral. Se ha descrito que el receptor a  $IP_3$  es susceptible a oxidación y que cuando esto ocurre se modifica el sitio de unión al ligando, impidiendo de esta forma una vía importante de señalización celular y llevando por lo tanto a alteraciones en la regulación de los niveles de calcio intracelular (7). Se ha demostrado que en el sistema límbico ocurre un daño inducido por oxidación a los autorreceptores de diferentes neurotransmisores, particularmente receptores a glutamato, lo que afecta de manera importante la comunicación sináptica en esta región del cerebro (9). Por otro lado, las ERO pueden inducir una liberación masiva de calcio de pozas intracelulares como la mitocondria y los retículos endoplásmico y sarcoplásmico, en parte por un incremento en la peroxidación de lípidos membranales y como consecuencia de un entrecruzamiento proteico que desestabiliza la membrana (8). Finalmente, la ATPasa dependiente de calcio puede sufrir una inactivación por acción directa de los ERO y/o por alteraciones membranales donde se localiza el complejo de síntesis de ATP, lo que puede generar cambios en las concentraciones de calcio en los diferentes compartimentos celulares (7, 8).

Se ha observado también que un desequilibrio en el calcio intracelular puede generar ERO produciendo un estado oxidante importante en la célula como resultado de una despolarización de la membrana mitocondrial. Esta condición podría inducir la formación de las llamadas megamitocondrias, que son mitocondrias que sufren alteraciones en los flujos



iónicos, en particular de calcio, que han perdido la capacidad de regular el flujo de iones y agua, lo que resulta en su hinchamiento, en un desacoplamiento de los componentes proteicos de la membrana interna, así como en desajustes energéticos. Cabe mencionar que estas megamitocondrias son relativamente comunes durante eventos de muerte celular por apoptosis (7).

En varios modelos celulares de muerte apoptótica ocurre una pérdida temporal del potencial de membrana mitocondrial. Esto se ha asociado a la formación de estructuras llamadas poros de transición mitocondrial (MPT) formado entre la membrana interna y externa de la mitocondria. Está constituido por un poro aniónico dependiente de voltaje y el transportador de nucleótidos de adenina situada en la membrana interna, y por la proteína  $\beta$ -filina D, la cual induce su activación. La actividad del MPT está modulada por otras proteínas, como receptores a benzodiazepinas, hexocinasas, cinasas de glicerol, cinasas de creatina y por la proteína Bax. Se ha propuesto que la formación del MPT está relacionada con la liberación del cromosoma c y una su posterior activación de caspasa-9, sin embargo esto no ha podido ser demostrado. Se ha sugerido que para que el MPT se mantenga como complejo funcional se requiere de un estado oxidativo alto en la mitocondria, es decir, la formación temporal de un poro arriba de un umbral que promueve la formación del mantenimiento y la apertura del poro. Algunos estudios proponen que el MPT puede ser una vía de salida de especies reactivas de oxígeno, particularmente del  $O_2^{\cdot -}$  formado en la mitocondria. La formación del poro depende en gran medida de una alteración en el calcio intracelular que conlleva a un desajuste en la permeabilidad de los flujos de este catión en la membrana mitocondrial interna. Para la formación del MPT se necesitan, además de un incremento de calcio mitocondrial, otras condiciones específicas como una reducción en la translocación de nucleótidos de adenina hacia la mitocondria, altas concentraciones de fosfato inorgánico (Pi) y peróxidos mitocondriales (8). Sin embargo, hay algunos modelos de apoptosis en los que no se forma el poro y sí se incrementa la tensión oxidativa, lo que sugiere diferentes vías de inducción y ejecución de la apoptosis.

Además de las alteraciones iónicas y del aumento en los niveles de ERC, el incremento en las concen-

traciones citoplásmicas de  $Ca^{2+}$  puede traer como consecuencia una activación de endonucleasas o proteasas dependientes de calcio, además de modificaciones en la señalización intracelular lo que, dependiendo de la intensidad del estímulo, podría contribuir a que las células se recuperen o mueran apoptóticamente (8, 9). En general los sistemas de daño celular que involucran tensión oxidativa y calcio suponen que parte de los mecanismos que se llevan a cabo son consecuencia de un aumento en las concentraciones de calcio intracelular. Sin embargo, en otros modelos se sabe que una reducción de calcio intracelular puede acarrear un estado de tensión oxidativa, que puede terminar en la muerte celular con características apoptóticas. Esta condición ocurre en algunos modelos de muerte programada durante el desarrollo en la que una privación de estímulo trófico representa una señal para eliminar a la célula (2, 10).

La participación de las ERO en el proceso apoptótico se ha sugerido con base en experimentos donde la adición de la SOD u otros antioxidantes mantiene las células viables por más tiempo y/o reduce las posibilidades de que mueran apoptóticamente. El mecanismo de acción de las ERO en la inducción de la muerte apoptótica no se conoce, pero se ha sugerido que la tensión oxidativa podría ser una señal de inicio en este proceso. Una hipótesis al respecto, es que las ERO podrían activar a las caspasas tanto iniciadores como ejecutoras mediante una acción directa o indirecta por un mecanismo aun no determinado. En modelos *in vitro* las ERO son capaces de inducir alteraciones apoptóticas como condensación nuclear, fragmentación del ADN, alteraciones membranales y la activación de caspasas. Esto se ha demostrado en neuronas de la región CA1 del hipocampo luego de episodios de isquemia cerebral, así como en neuronas privadas de factor trófico durante el desarrollo, donde en ambos casos se incrementan los niveles de ERO (8). Sin embargo, aún no queda claro si estos eventos ocurren directamente por acción de los ERO o como consecuencia de la activación de proteasas inducidas durante la muerte celular. A pesar de las evidencias que relacionan a la tensión oxidativa con la muerte apoptótica, la formación de ERO y que los tratamientos con antioxidantes inhiben la actividad de las caspasas y de la muerte, no se conocen los mecanismos que involucran a las ERO en el proceso general de muerte celular.

## APOPTOSIS DURANTE EL DESARROLLO NEURONAL

Está descrito que en etapas tempranas del desarrollo del sistema nervioso, las influencias pre y postsinápticas juegan un papel determinante para la diferenciación y el establecimiento de los circuitos neuronales que conformarán el sistema nervioso. Durante las primeras etapas del desarrollo del sistema nervioso de mamíferos casi el 50% de las neuronas muere de manera programada. Se ha sugerido que esta muerte representa una estrategia para seleccionar tanto al número de células como a las mejor conectadas para tener la mejor organización funcional del sistema nervioso maduro.

En trabajos realizados en nuestro laboratorio con neuronas de cerebelo durante el desarrollo, se ha demostrado que ocurre una muerte con características apoptóticas cuando las células se someten a una deficiencia de factores tróficos o de estimulación sináptica similar a la que ocurre *in vivo*. Durante la primera fase de este proceso de muerte ocurre una disminución de la  $[Ca^{2+}]_i$  como un evento primario y crítico. La reducción de la  $[Ca^{2+}]_i$  conduce, a través de un mecanismo aún desconocido, a la generación de un estado oxidativo importante, seguido de la translocación de fosfatidilserina (PS) a la lámina externa de la membrana plasmática, de la activación de caspasas-8 y 3 y una condensación de la cromatina que preceden a la muerte neuronal. Cuando las células son tratadas con SOD, CAT o con otros antioxidantes se bloquean la translocación de PS, la activación de caspasas-8 y 3, y se previene la muerte neuronal. Esto sugiere que las ERO generadas luego de una disminución de la  $[Ca^{2+}]_i$  pueden disparar el programa de muerte y la cascada de activación de las caspasas. La protección a neuronas privadas de factores tróficos y neurotransmisores durante el desarrollo no parece ocurrir a través de una restauración de niveles de  $[Ca^{2+}]_i$  (10).

Se sabe también que una deficiencia del factor de crecimiento neuronal (NGF) en neuronas simpáticas en cultivo genera un incremento de la tensión oxidativa y precede a una muerte neuronal con características apoptóticas. La protección que dan tratamientos antioxidantes contra esta muerte neuronal por privación de NGF es muy clara, y particularmente aquellos realizados con secuestradores de ERO (1). Utilizando este mismo modelo, se observó una marcada

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

disminución en la muerte apoptótica de las neuronas privadas de NGF en ratones carentes de la enzima NADPH-oxidasa (2). Todo esto apoya la hipótesis que plantea que un incremento en la tensión oxidativa es un proceso temprano y esencial en la activación de la muerte neuronal por apoptosis asociada a la privación de factores tróficos.

## ISQUEMIA, HIPOXIA Y MUERTE NEURONAL

La hipoxia e isquemia son condiciones en las que ocurre una alteración en el suministro de oxígeno y de glucosa en diferentes tejidos de los organismos, que en el caso del sistema nervioso generalmente se asocia a traumas y accidentes cerebro-vasculares. En cerebros isquémicos se presenta una considerable disminución energética, particularmente en fosfatos orgánicos, por lo que los niveles de ATP disminuyen de manera importante. En respuesta a esto, en un intento por mantener los niveles de ATP en condiciones óptimas, se incrementa la glucólisis, presumiblemente a través de la desinhibición de la fosfofructocinasa (encargada de transformar la fructosa 6-fosfato en fructosa 1,6-difosfato durante la glucólisis), lo que trae como consecuencia indirecta un incremento en la producción de ácido láctico. El aumento de ácido láctico induce un incremento en la concentración de protones  $[H^+]$  en la célula y se genera una condición de acidosis láctica. El incremento de la  $[H^+]$  en las células afecta la estructura de proteínas, las tasas de actividad enzimática, la reactividad de sustratos y los mecanismos de transporte a través de membranas (11). Además, se sabe que esta alteración energética en cerebros isquémicos e hipóxicos aumenta la susceptibilidad a daño neuronal inducido por ácido glutámico, ya que durante estos episodios como resultado del incremento de calcio intracelular se da una mayor liberación de glutamato, lo que produce muerte neuronal que en algunos casos presenta características apoptóticas.

Debido a las alteraciones membranales resultantes de una caída en la producción de energía y de la acidosis láctica, ocurre una entrada masiva de  $Ca^{2+}$  por canales sensibles a voltaje y/o por canales acoplados a receptores, como es el caso de los receptores glutamatérgicos tipo NMDA. Por otro lado, las condiciones de bajo ATP y alto ácido láctico también inducen una salida de calcio de la mitocondria, como resultado de alteraciones membranales y de los cambios en las fuerzas iónicas y de pH que modifican los

sistemas de homeostasis de dicho catión (11). Durante estos episodios se establece también una condición transitoria de tensión oxidativa asociada a una muerte neuronal tanto necrótica como apoptótica. Las alteraciones metabólicas mencionadas inducen procesos que favorecen un incremento en los niveles de ERO. Se sabe que segundos después de establecida la isquemia e hipoxia hay una liberación de ácidos grasos, incluyendo al ácido araquidónico. El incremento de estos ácidos grasos puede tener un impacto a diferentes niveles, principalmente desacoplando la fosforilación oxidativa y el transporte de electrones mitocondriales e induciendo la producción de ERO. Por otro lado, la formación de ERO también se incrementa como resultado de la actividad de las monooxigenasas y de la autooxidación del ácido araquidónico, así como por un incremento significativo en la actividad de la enzima xantina oxidasa (11).

Se ha demostrado en modelos de isquemia transitoria en ratas que una fracción importante de la muerte neuronal presenta características apoptóticas. Bajo estas condiciones se sabe que tanto la actividad como los niveles de ARNm de diversas caspasas se incrementan significativamente en diferentes regiones cerebrales. Particularmente, en ratas con isquemia se encontró un incremento en el ARNm y la actividad de la caspasa-3 de las neuronas glutamatérgicas del área CA1 del hipocampo después de 8 horas. En este mismo modelo se encontró también un incremento en la actividad de la caspasa-1 en otras áreas del hipocampo después de 24 horas de la oclusión arterial. Tratamientos paralelos con inhibidores específicos de la caspasa-3 (DEV-CHO) y de la caspasa-1 (YVAD-CHO) o con un inhibidor de amplio espectro de las caspasas (ZVAD-CHO) resultó en una disminución significativa de la muerte neuronal (11).

## ENFERMEADES NEURODEGENERATIVAS, TENSIÓN OXIDATIVA Y APOPTOSIS

—Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por una pérdida sustancial y progresiva de la memoria y episodios agudos de demencia, ambos asociadas a una degeneración y pérdida paulatina de neuronas, particularmente en la región límbica. Se ha descrito un incremento importante en la peroxidación de lípidos de membrana y un gran daño al ADN por agentes

oxidantes en etapas avanzadas de esta enfermedad (12). El incremento en la lipoperoxidación y sus derivados (el 4-HNE y MDA) está directamente relacionado con la formación de los nódulos neurofibrilares (NFT) y de las placas seniles (SP), que son características de la enfermedad de Alzheimer. Un aspecto interesante de esta enfermedad es que dos de las enzimas antioxidantes del cerebro, la SOD y la HO-1, responden de manera activa y conjunta a estímulos oxidantes. Durante la formación de los NFT se ha visto que la HO-1, pero no la HO-2, incrementa su actividad de manera paralela a la formación de dichas estructuras (6, 8). Esto sugiere que las alteraciones celulares y tisulares causadas en parte por la oxidación inducen la formación de NFT y SP. Por otro lado, el péptido  $\beta$ -amiloide, relacionado con la enfermedad de Alzheimer, es un candidato para explicar el origen de las ERO en esta patología, ya que bajo ciertas condiciones el péptido puede adquirir un estado de radical libre. En algunos modelos *in vitro* se ha podido detectar la conversión del péptido en un radical libre, el cual induce un incremento importante en los niveles de  $H_2O_2$  y de  $NO\cdot$ . En un estudio *in vitro* se encontró que la inducción de muerte apoptótica por la privación de estimulación en neuronas cerebelares genera la producción y liberación de péptido  $\beta$ -amiloide (9). Recientemente se ha descrito la participación de caspasas durante la muerte neuronal en la enfermedad de Alzheimer, particularmente se ha referido que la caspasa-12 participa como una caspasa iniciadora asociada al retículo endoplásmico (15). También se sabe que la muerte neuronal asociada al incremento en la acumulación del péptido  $\beta$ -amiloide es dependiente de la caspasa-2 (13). Estos estudios sugieren entonces que gran parte de la muerte neuronal que sucede en la enfermedad de Alzheimer es apoptótica, dependiente de caspasas y además que está asociada a un incremento en la tensión oxidativa.

—Esclerosis lateral amiotrófica

La esclerosis lateral amiotrófica es una enfermedad neurodegenerativa dependiente de la edad que se caracteriza por una degeneración de neuronas de la corteza motora, del tallo cerebral y de la médula espinal. Su clímax sintomático se presenta en la mitad de la vida del paciente, presentándose paulatinamente una parálisis motora parcial o total y terminando con la muerte del individuo. A escala celular se ha encontrado que en las células afectadas se

observa un hinchamiento de los organelos y un daño mitocondrial severo que incluye vacuolización y pérdida de la permeabilidad mitocondrial asociada a un incremento anormal en la  $[Ca^{2+}]$ , y a la muerte de las neuronas como evento final. Estudios genéticos definieron que el *locus* de la esclerosis lateral amiotrófica se encuentra en el cromosoma 21, donde se encuentra también el gen de la Cu/Zn SOD, que en pacientes con esclerosis lateral amiotrófica familiar está mutado. Existen evidencias de una relación entre la esclerosis lateral amiotrófica y la alteración de los sistemas antioxidantes, los cuales no son capaces de convertir el superóxido producido normalmente por la célula, generando una condición de tensión oxidativa responsable de una serie de daños celulares importantes (14). Se ha demostrado también una alteración en la señalización de la vía del glutamato en esta patología, induciendo la formación de  $NO^{\cdot}$  de manera constitutiva. El  $NO^{\cdot}$  formado reacciona con el  $O_2^{\cdot-}$  para formar  $ONOO^{\cdot}$ , lo que genera alteraciones oxidantes que culminan en el daño celular y en una pérdida importante de neuronas con características de muerte apoptótica y necrótica, siendo esta última la más abundante. Aunque se desconoce con detalle los mecanismos involucrados en esta patología, las evidencias coinciden en señalar a las ERO como una pieza clave en la evolución de dicha enfermedad (11).

#### -Síndrome de Down

El Síndrome de Down se origina por una trisomía del cromosoma 21 e involucra una pérdida neuronal masiva. Este Síndrome comparte ciertas características citopatológicas con la enfermedad de Alzheimer. Al igual que en la enfermedad de Alzheimer, parte de la muerte celular observada presenta características apoptóticas, como la condensación de la cromatina y la fragmentación homogénea del ADN. Otra parte de la población neuronal que muere muestra signos de muerte necrótica (15). El gen que codifica para la Cu/Zn SOD se encuentra en el cromosoma 21, por lo que la actividad de dicha enzima se encuentra por arriba de los niveles normales en pacientes con Síndrome de Down. Se sabe que el incremento en la actividad de Cu/Zn SOD, debida a la trisomía, induce una alteración del sistema redox de la célula, lo que produce desajustes oxidantes que puede terminar en la muerte neuronal. Estos desajustes son consecuencia de alteraciones del equilibrio de los componentes enzimáticos de la

SOD y de la GSHPx, ya que la formación exacerbada de  $H_2O_2$  a partir del  $O_2^{\cdot-}$  por la actividad de la Cu/Zn SOD es muy alta y termina siendo extremadamente tóxico para la célula. Hay evidencias que indican que esta condición oxidativa provoca la pérdida neuronal paulatina en pacientes con Síndrome de Down. En experimentos hechos con neuronas corticales en cultivo obtenidas de cerebros de pacientes con Síndrome de Down, se demostró que hay una población neuronal que muere paulatinamente y otra que no lo hace. El tratamiento de estas neuronas con antioxidantes como N-terbutil-2-sulfofenilnitrona (PBN), vitamina E y otros secuestradores de ERO, resulta en una reducción marcada de la muerte neuronal, demostrando con estos estudios, la participación directa de la tensión oxidativa en la muerte apoptótica de neuronas de pacientes con Síndrome de Down. (15).

#### -Enfermedad de Parkinson

Esta patología se caracteriza por un deterioro gradual de neuronas que sintetizan dopamina localizadas en la sustancia *nigra* del cerebro. La muerte de una fracción de las neuronas de la sustancia *nigra* presenta características apoptóticas, particularmente una condensación y fragmentación del ADN tanto mitocondrial como nuclear. Como resultado de la deficiente comunicación dopaminérgica resultante, ocurren severas alteraciones tanto motoras como sensoriales. Se ha sugerido que la degeneración del sistema nigroestriatal se origina como resultado de una exposición elevada de estas neuronas a algunas ERO y particularmente al  $H_2O_2$ . La desaminación de la dopamina a 3,4-dihidroxiifenilacetaldehído genera  $H_2O_2$ , además de que la dopamina puede autooxidarse espontáneamente formando quinonas,  $H_2O_2$  y  $\cdot OH$  (12). Por otro lado, se ha detectado un incremento anómalo de hierro en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra* de pacientes con la enfermedad de Parkinson, condición que favorece la reacción de Fenton, la cual produce radicales hidroxilo a partir de  $H_2O_2$ . Se ha descrito además, una depleción de GSH en pacientes con la enfermedad de Parkinson, que se sabe funciona como defensa en contra de las ERO. El incremento de peróxidos asociados a la disminución de GSH provoca una pérdida parcial en el transporte de electrones de la cadena respiratoria de alrededor del 70% con respecto a sus controles, dañando particularmente a los complejos mitocondriales II y IV de dicha cadena (9).

**-Enfermedad de Huntington**

La enfermedad de Huntington es otra de las enfermedades neurodegenerativas que involucra una pérdida neuronal. Durante esta enfermedad se dan episodios de demencia y sobre todo movimientos involuntarios agudos que están relacionados al daño neuronal (15). Esta enfermedad neurodegenerativa genética es causada por la acumulación de una proteína llamada huntintina. En condiciones basales la huntintina esta presente en las células, aunque su función es desconocida hasta ahora (15). Gran parte de la muerte neuronal en esta enfermedad se presenta en la región neocortical, donde las neuronas gabaérgicas espinales constituyen el 90% de la población. La excitotoxicidad es uno de los eventos más comunes durante la muerte neuronal en la enfermedad de Huntington. Se sabe que durante la enfermedad existen periodos críticos donde las condiciones excitadoras se incrementan, teniendo como consecuencia el incremento en los niveles de calcio intracelular y la progresiva muerte neuronal. Se ha descrito también que durante este periodo de daño se incrementan los niveles de NO asociado a un estado de tensión oxidativa importante debido a la formación de peroxinitrito y peróxido de hidrógeno (15). La muerte de neuronas en la enfermedad de Huntington tiene tanto características necróticas como apoptóticas. En los últimos años se ha descrito la participación de caspasas durante estos eventos. Particularmente se sabe que la caspasa-1 está estrechamente relacionada con la muerte neuronal en la enfermedad de Huntington. En animales deficientes de la caspasa-1 se encontró una disminución en los síntomas de la enfermedad y en la muerte neuronal. Se ha propuesto también que la caspasa-3 es capaz de hidrolizar a la huntintina, sin embargo no se conoce bien cual es el resultado de este procesamiento (15).

A pesar de las evidencias del papel de las ERO en enfermedades neurodegenerativas y sus características asociadas a la muerte apoptótica, no se han descrito suficientes modelos de muerte neuronal que relacionen la activación de caspasas (marcadoras de apoptosis) y el daño oxidante en estas patologías. Sólo algunos trabajos *in vitro* han establecido una correlación entre el estado oxidante y la activación de caspasas, sugiriendo que el incremento en la tensión oxidativa induce la activación de caspasas (particularmente la caspasa-1 y la caspasa-3) en el modelo de la enfermedad de Alzheimer y de isquemia e hipo-

xia, donde además se observa un incremento en el mensajero de la caspasa-3.

**CONCLUSIONES**

Las especies reactivas de oxígeno pueden constituir una condición nociva para la célula induciendo muerte y provocar un daño al organismo. En la activación y posterior desarrollo de algunas patologías del sistema nervioso las ERO juegan un papel importante. En el caso del Síndrome de Down y la esclerosis lateral amiotrófica el establecimiento de la tensión oxidativa puede ser el resultado de una alteración de los sistemas antioxidantes endógenos. Los tratamientos de estas patologías con estrategias dirigidas al control y regulación de la tensión oxidativa pueden resultar útiles para controlar tanto su génesis como su desarrollo o en algunos casos para eliminar los efectos secundarios resultantes de la tensión oxidativa asociada a la enfermedad. Para entender estos mecanismos, el estudio de la participación de la tensión oxidativa en la muerte celular en casos donde la muerte apoptótica es un evento necesario, también es importante, como ocurre durante el desarrollo donde la eliminación de neuronas es determinante para la formación y buen funcionamiento del sistema nervioso.

Aun cuando no se ha podido determinar la relación entre la formación de ERO y los mecanismos de muerte celular, se sabe que durante la apoptosis la tensión oxidativa juega un papel central. Se ha sugerido que las ERO pueden activar directa o indirectamente a las caspasas. Es importante mencionar que a pesar de que las ERO están involucrados en la muerte apoptótica, no queda claro si esta condición oxidante es un disparador de la apoptosis, una consecuencia del programa de muerte o ambas, dependiendo del estímulo y la condición fisiológica de la célula que lo experimenta. Quedan aún muchas preguntas por resolver, particularmente en relación con los mecanismos que involucran al calcio, a las ERO y a las moléculas pro y antiapoptóticas.

**AGRADECIMIENTOS**

Agradecemos los valiosos comentarios y sugerencias que durante la revisión del manuscrito fueron realizados por la Dra. Lourdes Massieu del Departamento de Neurociencias del IFC, UNAM, por el Dr. Wilhelm Hansberg del Departamento de Bioquímica del IFC, UNAM y por el Dr. Alejandro Zentella del Departamento de Biología Celular del IFC, UNAM.

## REFERENCIAS

1. Halliwell B (1992) Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 59:1609-1623.
2. Tammariello S, Quinn M y Estus S (2000) NADPH oxidase contributes directly to oxidative stress and apoptosis in nerve growth factor-deprived sympathetic neurons. *J Neurosci* 20:1-5.
3. Wyllie A H y Currie A R (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Inter Rev Cytol* 68:251-306.
4. Smith M A, Kutty R y Richey P (1994) Heme oxygenase-1 is associated with the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 145:42-47.
5. Martin S J y Green D R (1995) Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell* 82:349-352.
6. Tan S, Sagara Y, Liu Y, Maher P y Schubert D (1998) The regulation of reactive oxygen species production during programmed cell death. *J Cell Biol* 141:1423-1432.
7. Chakraborti T, Das S, Mondal M, Roychowhury S y Chakraborti S (1999) Oxidant, mitochondria and calcium: an overview. *Cell Signal* 11:77-85.
8. Castillo R, Ward M y Nichols D (1999) Oxidative stress, mitochondrial function, and acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *J Neurochem* 72:1394-1401.
9. Ceballos-Picot I (1997) The role of oxidative stress in neuronal death. Neuroscience Intelligent Unit. Springer. New York, NY, USA. p 203.
10. Valencia A y Morán J (2001). Role of oxidative stress in the apoptotic cell death of cultured cerebellar granule neurons. *J Neurosci Res* 64:284-297.
11. Ni B, Wu X, Su Y, Stephenson D, Smalstig E, Clemens J y Paul S (1998) Transient global forebrain ischemia induces a prolonged expression of the caspase-3 mRNA in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:248-256.
12. Yanker B (1996) Mechanisms of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neuron* 16:921-932.
13. Troy C, Rabacchi S, Friedman W, Frappier T, Brown K y Shelanski M (2000) Caspase-2 mediates neuronal cell death induced by  $\beta$ -amyloid. *J Neurosci* 20:1386-1392.
14. Elliot J (1999) Experimental models of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology diseases* 6:310-320.
15. Ona V, Li M, Vonsattel J, Andrews L, Khan S, Chung W, Frey A, Menon A, Li X, Stieg P, Yuan J, Penney J, YOUNG A, Cha Y y Friedlander R (1999) Inhibition of caspase-1 slows disease progression in a mouse model of Huntington's disease. *Nature* 399:263-267.

## 2. ANTECEDENTES

Cuando las neuronas granulares se transfieren de un medio con 25 mM de KCl a uno con concentraciones de potasio extracelular en el rango fisiológico (5 mM), ocurre una muerte celular de aproximadamente el 50% y el 80% después de 24 y 48 h, respectivamente (D'Mello *et al.*, 1993; Morán *et al.*, 1999; Schulz *et al.*, 1996). Bajo estas condiciones, el calcio libre intracelular baja su concentración de 280 nM a 60 nM, lo que parece ser necesario para activar el programa de muerte (Morán *et al.*, 1999; Valencia y Morán, 2001). Cuando se tratan las neuronas antes de las primeras cuatro horas después de la privación de potasio, con fármacos que incrementan el calcio intracelular, se evita en grana medida la muerte neuronal (Morán *et al.*, 1999).

Se ha descrito que la muerte neuronal en células granulares del cerebelo en cultivo por la privación de potasio tiene características apoptóticas (Morán *et al.*, 1999; Schulz *et al.*, 1996). Luego de la disminución en la concentración intracelular del calcio ocurre un incremento en la actividad de diversas caspasas, como la caspasa-3, la caspasa-8 y la caspasa-9 (Atlante *et al.*, 1998 and 2000; Bobba *et al.*, 1999; Caballero-Benitez y Morán, 2003; D'Mello *et al.*, 2000; Gerhardt *et al.*, 2001; Gingham *et al.*, 2001; Morán *et al.*, 1999). El tratamiento con inhibidores de caspasas disminuye significativamente la muerte de estas neuronas, lo que indica que la activación de caspasas tiene un papel crítico en este proceso. También se han identificado otros indicadores de la apoptosis en este modelo como la translocación de la fosfatidilserina al exterior de la membrana plasmática (Valencia y Morán, 2001), lo que se ha asociado a los mecanismos para el reconocimiento y la eliminación de los restos apoptóticos (Fabisiak *et al.*, 2000).

Se ha demostrado que cuando las células en cultivo son privadas de un estímulo trófico que induce muerte celular se genera una condición prooxidante. Si esta condición se inhibe con antioxidantes, se evita parcialmente la muerte, lo que sugiere la participación de las EOR en este proceso (Atlante *et al.*, 2000; Castilho *et al.*, 1999; Itoh *et al.*, 1999; Schulz *et al.*, 1996).

Se sabe que durante la muerte apoptótica de las neuronas en cultivo privadas de potasio hay una participación importante de la mitocondria (Bobba *et al.*, 1999; Castilho *et al.*, 1999; Schulz *et al.*, 1996). También se ha propuesto que el anión superóxido participa en la muerte apoptótica en este modelo (Atlante *et al.*, 1998; Martín-Romero *et al.*, 2002; Satoh *et al.*, 1998). Por otro lado, otros trabajos sugieren la participación del peróxido de hidrógeno en esta muerte (Itoh *et al.*, 1999; Schulz *et al.*, 1996), sin que quede claro el papel de cada una de estas EOR.

Contrario a lo que tradicionalmente se había propuesto, recientemente se sugirió que la mayor proporción de las EOR formadas durante la privación del potasio en las neuronas en cultivo, no proviene de la mitocondria, sino de la actividad de un complejo enzimático membranar, la NADH-oxidasa dependiente de ascorbato (Martín-Romero *et al.*, 2002). En otro modelo, se ha sugerido también que la privación de NGF de neuronas simpáticas en cultivo induce muerte neuronal apoptótica debido a un estrés oxidativo generado por la NADPH-oxidasa (Tammariello *et al.*, 2000). Otro grupo demostró que la activación de este complejo enzimático en neuronas corticales en cultivo participa activamente en la inducción de la muerte neuronal (Noh *et al.*, 2000).

Los antecedentes mencionados despiertan el interés para definir la participación y los mecanismos de las EOR en la muerte de estas neuronas, así como definir la naturaleza y las fuentes de estas moléculas en el modelo de muerte neuronal por privación de potasio.



### **3. HIPÓTESIS**

Dado que se ha demostrado en algunos modelos la participación de una condición prooxidante en la muerte apoptótica, se espera que durante la muerte celular inducida por la privación de potasio se desarrolle un episodio de tensión oxidativa que constituya una señal inicial y no un evento ejecutor del proceso de muerte apoptótica. Se espera que una de las principales EOR involucradas sea el anión superóxido y que una de las fuentes de dicha especie sea la NADPH-oxidasa. En relación con lo anterior, se espera que el anión superóxido *per se* induzca muerte apoptótica en las células granulares de cerebelo bajo condiciones control.

### **4. OBJETIVOS**

#### **General**

- Determinar la participación de las especies de oxígeno reactivas en la regulación e iniciación de la muerte apoptótica de las neuronas granulares del cerebelo en cultivo privadas de potasio extracelular.

#### **Particulares**

- Confirmar que durante la muerte celular de neuronas en cultivo por la privación de potasio extracelular se genera un episodio de tensión oxidativa.
- Establecer que la aparición de dicho episodio prooxidante es fundamental en el proceso de la muerte, regulando la iniciación del programa apoptótico.
- Conocer las especies de oxígeno reactivas generadas y responsables de la inducción de la muerte neuronal.

- Estudiar el origen de las especies de oxígeno reactivas involucradas en el episodio prooxidante generado durante la muerte de neuronas inducida por la privación de potasio extracelular.

## **5. METODOLOGÍA**

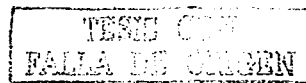
En esta sección se mencionan de forma general las técnicas empleadas en el estudio, las cuales se describen con más detalle en cada artículo contenido en la tesis.

### **5.1. Cultivo de neuronas granulares de cerebelo de rata**

El cultivo de neuronas de cerebelo de rata se realiza de acuerdo a lo descrito originalmente por Morán y Patel en 1989. Se obtiene una suspensión de células disociadas de neuronas de cerebelo de rata de 7-8 días posnatales. Las neuronas se siembran en platos de cultivo a una densidad final de  $265 \times 10^3$  células por mililitro de medio. Previamente, los platos de cultivo son tratados con poli-L-lisina a una concentración de 5-25  $\mu\text{g/ml}$  por 24 h. Después de 20 h se adiciona citosina arabinosa (10  $\mu\text{M}$ ) para prevenir el crecimiento de células no neuronales. El medio de cultivo contiene medio basal de Eagle suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino inactivado con calor, penicilina y estreptomycin. Los cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera húmeda saturada de vapor de agua con  $\text{CO}_2$  al 5% y aire 95% por un tiempo de 7-8 DIV hasta su uso. De acuerdo a los análisis de inmunohistoquímica se sabe que estos cultivos están constituidos por, al menos, 95% de neuronas granulares (Balázs *et al.*, 1988).

### **5.2. Inducción de muerte celular**

Los resultados mostrados en el presente trabajo se obtuvieron a partir de dos protocolos experimentales que inducen muerte celular, la reducción de la concentración del potasio extracelular (de 25 mM de KCl a 5 mM de KCl) y la generación directa de EOR, los cuales se detallan a continuación:



### **5.2.1. Modelo del cambio de medio (de 25 mM de KCl a 5 mM de KCl)**

Las neuronas granulares de cerebelo de rata se sembraron en un medio con 25 mM de KCl (K25) durante 7-8 días. Después de este tiempo las células fueron transferidas a un medio idéntico, pero conteniendo concentraciones fisiológicas de potasio, 5 mM de KCl (K5). Esta condición induce muerte neuronal con características apoptóticas después de 24-48 horas (D'Mello et al., 1993; Moran et al., 1999; Gerhardt et al., 2001).

### **5.2.2. Inducción de estrés oxidativo**

En este protocolo se induce la producción controlada de EOR particulares. Las células granulares de cerebelo de rata se cultivaron durante 7-8 DIV en condiciones despolarizantes (KCl 25 mM) para promover su sobrevivencia. A los 7-8 DIV, las células se trataron con distintos sistemas enzimáticos y físicos. El peróxido de hidrógeno se forma por la incubación de las células con glucosa oxidasa y glucosa (Iglesias-de la Cruz *et al.*, 2001). El oxígeno en singulete se forma por la incubación con Rosa de Bengala y su estimulación luminosa (Zhuang *et al.*, 1999). Finalmente, el anión superóxido se forma por la incubación simultánea de la enzima xantina oxidasa con xantina en presencia de catalasa para degradar el peróxido de hidrógeno formado junto con el anión superóxido (Englert y Shacter, 2002; Lacy, *et al.*, 1998; Satoh, *et al.*, 1998).

### **5.3. Viabilidad celular**

Para evaluar la viabilidad o sobrevivencia celular se aplicaron varias técnicas. Una de ellas se basa en la transformación del MTT [3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolio] por la actividad mitocondrial a un compuesto colorido e insoluble, el azul de formazán. El azul de formazán generado se cuantifica espectrofotométricamente utilizando un solvente orgánico para su extracción. Esta técnica se ha utilizado ampliamente para medir la viabilidad celular en muchos modelos, incluidas las neuronas granulares de cerebelo en cultivo, donde se ha encontrado una alta correlación entre la transformación del MTT y el contenido de

ADN y proteína, así como otros marcadores de viabilidad celular que se mencionarán más adelante.

En este estudio, con el fin de confirmar los resultados obtenidos con la transformación del MTT, se emplearon otras técnicas como la basada en el uso del diacetato de fluoresceína (FDA). Esta molécula entra a las neuronas y sólo las neuronas viables transforman el FDA en fluoresceína, la cual se detecta con un microscopio de epifluorescencia. Esta técnica se complementa con la tinción con yoduro de propidio (PI) que se integra al ADN de las células que han perdido la integridad de la membrana celular como resultado de un proceso de muerte necrótica.

En este trabajo encontramos una correlación del 95% entre técnica del MTT y la de FDA/PI, por lo que la mayoría de los resultados de viabilidad se obtuvieron empleando la técnica de la transformación de MTT.

#### **5.4. Condensación nuclear**

La morfología de los núcleos se evaluó incubando las células con el compuesto fluorescente Hoechst, el cual se une al ADN. Los núcleos brillantes, encogidos y en ocasiones fragmentados fueron considerados como núcleos apoptóticos.

#### **5.5. Ensayos tipo Western Blot**

Las proteínas de los homogeneizados neuronales se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida, se transfirieron a una membrana de PVDF y después de bloquearse se trataron con los anticuerpos primarios y secundarios. Las bandas se vieron utilizando un sistema de quimioluminiscencia.

Utilizando una solución amortiguadora de lisis para romper las membranas celulares, seguida por una centrifugación de los homogeneizados celulares (1500 rpm x 10 min), se separo el citosol (fase soluble) y un fracción celular que contiene la membrana plasmática (fase a 1500 rpm). Con estas muestras se realizaron ensayos de Western blot para detectar las subunidades de la NADPH-oxidas (gp91-phox, p22-phox, p47-phox y p67-phox). Se usaron anticuerpos primarios anti-gp91-phox,

anti-p22-phox, anti-p47-phox y anti-p67-phox de origen humano que cruzan con las subunidades de rata. (Santa Cruz California, USA).

### **5.6. Calcio intracelular**

La medición del calcio intracelular se realizó en células únicas utilizando FURA 2-AM en una cámara de perfusión y se observaron por microscopía de epifluorescencia con ayuda de un analizador de imágenes acoplado al microscopio. Se eligieron 20 neuronas por campo. Se utilizó un objetivo de 40x de inmersión en aceite para fluorescencia con una apertura numérica de 1.4.

### **5.7. Actividad de caspasas**

La actividad de caspasas se detectó mediante un método fluorogénico basado en la aparición de fluorescencia por la ruptura de un sustrato acoplado a metilcuomarina. Estos sustratos generalmente tienen una secuencia de cuatro residuos de aminoácidos que definen la especificidad para las diferentes caspasas. La actividad de las caspasas se mide indirectamente como la producción de fluorescencia generada por el fragmento procesado unido a la cuomarina fluorescente.

### **5.8. Detección de EOR citosólicos y mitocondriales**

Las EOR se detectaron utilizando una técnica fluorescente. Para medir las EOR formadas en el citosol se utilizó un fluoróforo sensible a oxidación derivado de la fluoresceína llamado diacetato de dicloro-dihidrofluoresceína (H<sub>2</sub>DCFC). Una vez que las esterasas celulares rompen los grupos acetato de la molécula, ésta se retiene en el citosol y cuando es oxidada por las EOR emite una señal fluorescente. Para las EOR mitocondriales se utilizó un fluoróforo sensible a oxidación derivado de la rodamina llamado dihidrorodamina-1,2,3 (DHR-123). Después de entrar a la célula este compuesto es secuestrado por la mitocondria donde se oxida por las EOR y emite una señal fluorescente. Estos resultados se confirmaron utilizando otro compuesto fluorescente sensible a oxidación que también es secuestrado por las mitocondrias, el Mito tracker red.

En ambos casos se utilizó un microscopio de epifluorescencia y un objetivo para fluorescencia 40x de inmersión en aceite con una apertura numérica de 1.4. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron de 480 nm y 525 nm para la H<sub>2</sub>DCFC y de 485 nm y 530 nm para la DHR-123. Se midió la fluorescencia en células únicas en grupos de 20 neuronas por campo para cada condición.

### **5.9. Translocación de fosfatidilserina (PS)**

Durante la muerte apoptótica la PS se transloca por la acción de una flipasa del interior al exterior de la membrana plasmática. Esta translocación sirve a los macrófagos para reconocer y fagocitar a los restos de las células que están muriendo por apoptosis. Se utilizó un estuche para la detección de la PS (Roche), que contiene la anexina-V unida a la fluoresceína, la cual reconoce específicamente la PS. Esta técnica se realiza en paralelo con la tinción de los núcleos con yoduro de propidio (PI). Las neuronas teñidas con ambas moléculas se descartaron, mientras que las teñidas únicamente con la anexina se consideraron neuronas en proceso de muerte apoptótica.

### **5.10. Actividad de NADPH-oxidasa**

La actividad de NADPH-oxidasa se midió utilizando la técnica descrita por Shpungin y colaboradores (1989). Las neuronas se homogenizaron en un amortiguador salino de lisis (KCl 150 mM y NaCl 150 mM, pH 7.4 suplementado con MgCl<sub>2</sub> 1 mM, EGTA 1 mM, NaN<sub>3</sub> 2 mM y DTT 1 mM). Las muestras se centrifugaron a 1500 rpm por 10 min para separar la fase celular que contiene la membrana plasmática de la fase citosólica. El ensayo consiste en detectar a 550 nm la reducción del citocromo c, lo que ocurre cuando la enzima se activa. La mezcla de reacción consiste en una solución salina (NaCl 65 mM y KCl 65 mM, pH 7.4 suplementado con MgCl<sub>2</sub> 1 mM, EGTA 1 mM, NaN<sub>3</sub> 2 mM y DTT 1 mM) en presencia de citocromo c 0.1 mM, FAD 10 μM y SDS 5 mM. La reacción se lleva a cabo a 37°C en presencia de la fase membranal y citosólica de los homogeneizados celulares y la mezcla de reacción. La reacción se inicia con la adición del NADPH 10 mM. La reducción del citocromo c por el anión superóxido generado por la NADPH-

oxidasa se lee en el espectrofotómetro durante 3 min. Los resultados de la actividad de la NADPH-oxidasa se expresan como la diferencia en absorbancia por hora por miligramo de proteína.

### **5.11. Estadística**

Los resultados se analizaron con un análisis de varianza de diseño aleatorio de una serie de experimentos independientes (ANOVA) seguido de la prueba de Fisher. La significancia utilizada fue de  $p < 0.05$ .

6. **RESULTADOS**

- 6.1. **"Role of oxidative stress in the apoptotic cell death of cultures cerebellar granule neurons. Journal of Neuroscience Research. 2001. 64: 284.297."**



## Role of Oxidative Stress in the Apoptotic Cell Death of Cultured Cerebellar Granule Neurons

Antonio Valencia and Julio Morán\*

Department of Neurosciences, Institute of Cell Physiology, National University of Mexico, Mexico City, Mexico

When cultured cerebellar granule neurons (CGN) are transferred from 25 mM KCl (K25) to 5 mM KCl (K5) caspase-3 and caspase-8, but not caspase-1 or caspase-9, activities are induced and cells die apoptotically. CGN death was triggered by a  $[Ca^{2+}]_i$  modification when  $[Ca^{2+}]_i$  was reduced from 300 nM to 50 nM in a K5 medium. The  $[Ca^{2+}]_i$  changes were followed by an increase in ROS levels. The generation of both cytosolic and mitochondrial reactive oxygen species (ROS) occurred at three different times, 10 min, 30 min and 3–4 hr but only those ROS produced after 3–4 hr are involved in the process of cell death. When CGN cultured in a K5 medium are treated with different antioxidants like scavengers of ROS (mannitol, DMSO) or antioxidant enzymes (superoxide dismutase and catalase) phosphatidylserine translocation, caspase activity, chromatin condensation and cell death is markedly diminished. The protective effect of antioxidants is not mediated through a modification in  $[Ca^{2+}]_i$ . Caspase activation, PS translocation and chromatin condensation were downstream of ROS production. In contrast to  $H_2O_2$ , ROS produced by a xanthine/xanthine oxidase system in CGN cultured in K25 were able to directly induce caspase-3 activation and death that resulted sensitive to z-VAD, a caspase inhibitor. These findings indicate that a reduction in  $[Ca^{2+}]_i$  triggers CGN death by inducing a generation of ROS after 3–4 hr, which could play a critical role in the initial phases of the apoptotic process including PS translocation, chromatin condensation and the activation of initiator and executor caspases. *J. Neurosci. Res.* 64: 284–297, 2001. © 2001 Wiley-Liss, Inc.

**Key words:** apoptosis; caspases; cerebellar granule neurons; ROS, antioxidants; calcium

Programmed neuronal death (PND) is a normal event during the development of the nervous system that significantly contributes to the shaping of brain (Oppenheim, 1990). It has been shown that PND is precisely controlled by extracellular influences, and it has been characterized as an active process regulated by an internal program, which can be blocked by protein and mRNA synthesis inhibition (Oppenheim, 1990). PND can be

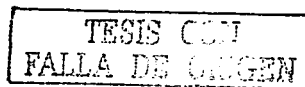
recognized from other types of cell death by some morphological and biochemical parameters that include nuclear condensation, vacuolization of cytoplasm, formation of phagosomes, loss of mitochondrial function, DNA fragmentation into nucleosomal-size fragments, activation of specific enzymes and proteases, etc. (Martin and Green, 1995; Cohen, 1997; Nardi et al., 1997; Ni et al., 1997; Morán et al., 1999). Several studies have been directed to understand the mechanisms involved in the process of PND. A large variety of molecules are involved in this process by acting as antiapoptotic or proapoptotic elements like the caspase family that plays a key role in PND. Particularly, caspase-3, which is a protease that participates in apoptosis in many tissues (Fernandes-Alnemri et al., 1994; Martin and Green, 1995; Tewari et al., 1995; Posmantur et al., 1997), and is constitutively expressed in neonatal rodent cerebellum (Ni et al., 1997).

In cultured cerebellar granule cells (CGN), chronic depolarization by potassium promotes cell survival (Gallo et al., 1987; Balázs et al., 1988). This effect is observed only during critical periods of time, i.e., after 5–7 days in vitro (DIV), corresponding to the time when CGN receive presynaptic glutamatergic inputs from mossy fibers during development in vivo. Also, when CGN cultured in 25 mM  $[K^+]_o$  (K25) during 6–8 DIV are transferred to a medium containing 5 mM  $[K^+]_o$  (K5) most cells die after 24–48 hr showing morphological features of apoptosis (Gallo et al., 1987; D'Mello et al., 1993, 1997; Yan et al., 1994; Nardi et al., 1997; Morán et al., 1999). It has been demonstrated that caspase-3 plays a critical role in CGN death induced by K5 (Morán et al., 1999). Death of CGN transferred to K5 can be prevented by increasing intracellular  $Ca^{2+}$  levels  $[Ca^{2+}]_i$  by addition of a  $Ca^{2+}$  ionophore or by activation of  $Ca^{2+}$ -permeable ionotropic glutamate receptors. On the other hand, death of CGN chronically

Contract grant sponsor: Conacyt; Contract grant number: 25521-N; Contract grant sponsor: DGAPA-UNAM; Contract grant number: IN203400.

\*Correspondence to: Julio Morán, Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México City 04510, D.F., Mexico. E-mail: jmorán@fisiol.unam.mx

Received 4 August 2000; Revised 21 December 2000; Accepted 8 January 2001



cultured in K25 can be elicited by inhibiting their voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels (Kingsbury and Balázs, 1987; Balázs et al., 1988; Pearson et al., 1992; Copani et al., 1995; Morán et al., 1999). These observations suggest that K25 enhances CGN survival by augmenting  $Ca^{2+}$  influx and therefore that  $[Ca^{2+}]_i$  is probably the first signal responsible for the survival of CGN (Kingsbury and Balázs, 1987; Balázs et al., 1988; Morán et al., 1999).

Some studies have found that changes in  $[Ca^{2+}]_i$  are related to oxidative stress and that reactive oxygen species (ROS) constitute another critical element in the process of apoptotic cell death. ROS have been proposed to act as inductors of necrotic and apoptotic cell death in a variety of models (Greenlund et al., 1995; Stephen et al., 1998; Stuart et al., 1998; Keller et al., 1998; Kruman et al., 1998). In vivo and in vitro studies have shown a marked increase in ROS levels during apoptotic cell death. Mitochondria seem to play a critical role in this process by contributing with the generation of ROS, particularly superoxide anion (Azbill et al., 1997; Atlante et al., 1998; Green et al., 1998). Cytosolic ROS could also participate in the mechanism involved in apoptosis, however, particularly through the NADPH-oxidase activation, it has been proposed in sympathetic neurons (Tammariello, 2000). In several preparations, including CGN, antioxidant treatment prevents cell death by using scavengers of hydroxyl radicals (like DMSO or mannitol) or with enzymatic conversion of superoxide radicals to hydrogen peroxide by copper/zinc or manganese superoxide dismutase (SOD) addition, among others (Schultz et al., 1996; Atlante et al., 1998; Park et al., 1998).

Intracellular  $Ca^{2+}$  levels play an important role in cell death. It has been proposed that under conditions of excessive neuronal stimulation,  $[Ca^{2+}]_i$  homeostasis is altered resulting in a mitochondrial  $Ca^{2+}$  overload and a subsequent ROS production and death (Atlante et al., 1998; Keller et al., 1998; Stuart et al., 1998). Some immature neurons, including CGN, however, require relatively high levels of  $[Ca^{2+}]_i$  to survive (Kingsbury and Balázs, 1987; Balázs et al., 1988; Johnson et al., 1992; Pearson et al., 1992; Copani et al., 1995) and a reduction of  $[Ca^{2+}]_i$  in CGN induces activation of caspase-3 and apoptotic cell death (Morán et al., 1999). Thus, although the exact role of  $[Ca^{2+}]_i$  and ROS is unknown it is clear that apoptosis is an event influenced by these two conditions. Thus, in this study we analyzed the functional and temporal relationship among oxidative stress, change of  $[Ca^{2+}]_i$  and caspases activity during the apoptotic death of CGN induced by K5 to understand the mechanisms involved in this process.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Fetal calf serum and penicillin/streptomycin were from GIBCO (Grand Island, NY). Poly-L-lysine (mol. wt. >300,000), trypsin, DNase and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) were from Sigma (St. Louis, MO). Reagents for polyacrylamide gel electrophoresis

(PAGE) were from Bio-Rad (Hercules, CA), and polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes were from Millipore (Bedford, MA). Protein molecular weight markers and annexin V were from Boehringer (Mannheim, Germany). Antibodies against caspase-3 were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Caspase substrates and inhibitors were from Peptides International (Louisville, KY). Fura-2 acetoxyethyl ester (fura-2/AM), Hoechst 33258 and Pluronic F-127 were from Molecular Probes (Eugene, OR). Dihydrodrachamine-123 (DHR) and 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate ( $H_2DCFDA$ ), catalase, SOD, mannitol, DMSO, xanthine and xanthine oxidase were from Sigma.

### Cerebellar Granule Neuron Cultures

CGN cultures were prepared as previously described (Morán and Patel, 1989). Briefly, cell suspensions dissociated from 8-day-old rat cerebellum were plated at a density of  $265 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> in plastic dishes previously coated with poly-L-lysine (5  $\mu$ g/ml) and over coverslips of 25  $\times$  25 mm. The culture medium contained basal Eagle's medium supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum, 2 mM glutamine, 25 mM KCl, 50 U/ml penicillin, and 50  $\mu$ g/ml streptomycin. This medium is referred in text as K25. The cultures dishes were incubated at 37°C in a humidified 5%CO<sub>2</sub>/95% air atmosphere. Cytosine arabinoside (10  $\mu$ M) was added 20 hr after seeding. These CGN cultures contained approximately 95% neurons. Cells were maintained for 6–8 days in vitro (DIV). In some experiments, CGN were transferred to a serum-free medium without cytosine arabinoside containing 5 or 25 mM KCl with or without the different treatments: DMSO 0.1, 0.5, 1 and 1.5%, SOD (Cu/Zn and Mn) 1, 5, 10 and 30 mU/ml, catalase 0.1, 1 and 10 mU/ml, mannitol 10 mM, as described in Results.

### Immunoblots

CGN were washed twice with 37°C phosphate-buffered saline (PBS), homogenized in lysis buffer (50 mM HEPES; 0.5 mM EDTA; 1% (v/v) NP-40; 0.25% (w/v) SDS; 0.5 mM EGTA; 150 mM NaCl; 10 mM DTT; 1mM PMSF, 1 mM NaF; 2  $\mu$ g/ml aprotinin; 1  $\mu$ g/ml pepstatin; and 5  $\mu$ g/ml leupeptin), and centrifuged at 3,000  $\times$  g for 10 min at 4°C. Homogenates (50–100  $\mu$ g protein per lane) were subjected to SDS-PAGE (Laemmli, 1970). The resolved proteins were transferred to PVDF membranes at 50 mV for overnight. The membranes were blocked for 3 hr with 5% nonfat dry milk in TPBS (PBS, 0.1% (v/v) Tween 20) and treated with a primary antibody against caspase-3 or caspase-7 followed by an alkaline phosphatase-linked secondary antibody. Bands were visualized using enhanced chemiluminescence according to the manufacturer's protocol. Polyclonal antibodies against caspase-3 reacts with caspase-3 and its p17 and p20 subunits and was raised against the full-length precursor form of caspase-3 of human origin. Polyclonal antibody against caspase-7 reacts with the proenzyme and its p25 and p19 subunits and was raised against the full-length precursor form of caspase-7 of human origin.

### $[Ca^{2+}]_i$ Measurements

CGN  $[Ca^{2+}]_i$  was quantified using the fluorescent calcium indicator fura-2/AM, as previously described (Itoh et al.,

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

1998). Briefly, cells grown on coverslips for 6–8 DIV were incubated with 5  $\mu\text{M}$  fura-2/AM and 0.02% Pluronic F-127 for 1 hr in a K25 medium and washed two times. The coverslips were placed on a perfusion chamber (RC-25, Warner Instrument Corp, CT) and perfused with a K25 or a K5 plus antioxidants medium during measurement. Cells were alternatively illuminated with a Xe arc lamp through 340 nm and 380 nm excitation filters. Emission fluorescence images (510 nm), obtained with an epifluorescence inverted microscope (Nikon Diaphor TMD, Nikon Corporation, Japan) were converted to digital data by an image-processing system (BioLase Imaging System, Newton, MA). The key elements of the fluorescence  $\text{Ca}^{2+}$  imaging system were a high numerical aperture UV objectives (Nikon UV-F 40 $\times$  oil immersion and 100 $\times$  glycerol immersion, 1.4 and 1.3 NA respectively), an intensified charge coupled device camera (c2400-87, Hamamatsu Bridgewater, NJ) and the BioLase Imaging System running under their FL-2 software. The system allows real-time simultaneous acquisition of fluorescence measurements from multiple areas of interest placed on individual cells.  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in individual neurons was calculated from the ratio (R) of 340 nm to 380 nm excitation wavelength, using the following formula:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = bK_d(R - R_{\text{min}})/(R_{\text{max}} - R)$$

where  $K_d$  is the dissociation constant of fura-2/AM;  $b$  is the ratio of fluorescent signals at 380 nm for  $\text{Ca}^{2+}$ -free and  $\text{Ca}^{2+}$ -saturated dye;  $R_{\text{min}}$  is  $R$  in the absence of external  $\text{Ca}^{2+}$ ;  $R_{\text{max}}$  is  $R$  in saturating  $[\text{Ca}^{2+}]_o$ . These parameters were determined by *in vitro* calibration using EGTA and ionomycin.

#### Cell Viability

Cell viability was estimated by MTT assay at 12–48 hr after transferring cells to K5 medium. MTT (0.1 mg/ml) was added to the CGN and incubated for 15 min at 37°C. After removal of medium containing the remaining MTT, 100% DMSO was added to the dishes. After incubation for 15 min at room temperature in darkness, formazan blue formed from MTT was quantified spectroscopically at 560 nm excitation wavelength. As previously shown (Balázs et al., 1990; Morán et al., 1999), there was a very good correspondence between the capacity of cultures to form formazan blue and the protein and DNA content and the proportion of neurons that appeared intact by phase-contrast microscopy.

Cell viability was also assessed by evaluating the capability of CGN to diesterify and to retain fluorescein diacetate (FDA) in their cytoplasm. Cells were washed twice, incubated with 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of FDA in culture medium for 20 min at 37°C and then cells were washed and mounted in perfusion chamber for analysis by epifluorescence microscopy using an excitation and emission wavelength of 485 and 520 nm, respectively. Propidium iodide (PI) was used to identify dead neurons. Cells were incubated with 10  $\mu\text{M}$  PI for 20 min at 37°C and then cells were analyzed with an epifluorescence microscope using a fluorescence filter with an excitation of 450 nm and emission of 510 nm.

#### Nuclear Condensation Detection by Hoechst Dye

Cells plated on coverslips at a density of  $265 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> were cultured in a K25 medium for 6–8 DIV and then switched to a K5 medium plus antioxidants. After 24 hr, cells were fixed in 4% fresh paraformaldehyde at 4°C for 30 min, then incubated with 0.01% Hoechst 33258 in PBS for 10 min and mounted with methanol-glycerol 1:1 v/v. Cultures were examined with an UV objective (100 $\times$  glycerol immersion, 1.3 NA) in an epifluorescence microscope (Nikon, UV BA-2 filter) and a barrier filter of 520 nm using a 340 nm excitation and 460 nm emission wavelengths).

#### Caspase Activity

After 4–24 hr transferring to K5, CGN were washed with PBS and homogenized in lysis buffer, diluted 1:1 (v/v) with glycerol and stored at  $\pm 70^\circ\text{C}$ . Caspase activities were assayed by a fluorometric method (Thornberry, 1994) with a luminescence spectrometer (Spectronic Instruments, SLM Aminco-Bowman, Rochester, NY), using different substrates for each caspase. Ac-DEVD-AMC was used as substrate to detect caspase-3 activity, Ac-YVAD-AMC for caspase-1, Ac-IETD-AMC for caspase-8 and Ac-LEHD-AMC for caspase-9. Activities were followed for 15–20 min after addition of substrate (25  $\mu\text{M}$ ) and cell homogenate (60–90  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) in a standard solution [100 mM HEPES; 10% (w/v) sucrose; 0.1% (w/v) CHAPS; 10 mM DTT; 1 mM EDTA; 1 mM PMSF; 1 mM NaF; 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  aprotinin; 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  pepstatin; and 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptin]. Results are expressed as YVAD, DEVD, IETD and LEHD cleaved as change in fluorescence intensity/hr/mg protein.

#### Measurements of Mitochondrial and Cytosolic ROS Formation

Cells plated on coverslips were cultured in a K25 medium for 6–8 DIV and then incubated for 30 min with 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  DHR-123; this non-fluorescent dye is sequestered by mitochondrion, oxidized and converted into a fluorescent compound. For cytosolic ROS formation, cells were incubated for 30 min with 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of H<sub>2</sub>DCF<sub>2</sub>DF; this non-fluorescent dye is deacetylated in the cytoplasm by steatates and converted into a fluorescent compound by oxidation. After incubation, cells were washed with Locke's medium (1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.8 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5.5 mM glucose, 10 mM HEPES, 3 mM NaHCO<sub>3</sub>, 120 mM NaCl and 25 mM KCl), and the coverslips were mounted in a perfusion chamber (Warner Instruments, Mod. RC-25, Hamden, CT). Fluorescence was detected spectrofluorometrically (SLM-AMNINCOR, Rochester, NY) at a 488 nm excitation and 530 nm emission wavelengths for DHR-123; and at a 480 nm excitation and 530 nm excitation wavelengths for H<sub>2</sub>DCF<sub>2</sub>DF. In all cases, cells were exposed only for 30 sec to UV light using different samples at the indicated times after K5 treatment. Each sample was compared with control culture (K25) exposed in parallel to UV light. To discount fluorescence generated by UV photo-oxidation, the delta of fluorescence obtained in the 30 sec period in K25 cells was subtracted from the fluorescence obtained in the experimental sample measured at the same time. Therefore, different samples from the same culture were used to cover the whole period of time indicated in the figures. The delta of fluorescence in K25 (i.e., fluorescence generated by UV photo-oxidation)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

was always negligible as compared with the fluorescence generated in the K5 samples. In other experiments, cells were incubated with dye after 1–8 hr of medium change from K25 to K5 medium and then fluorescence was measured as detailed above. Individual neurons were analyzed using an image-processing system (BioLase Imaging System, Newton, MA). The key elements of the fluorescence imaging system were the same as described for  $Ca^{2+}$  measurement.

#### Translocation of Phosphatidylserine (PS)

Cells were plated on coverslips at density to  $265 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> and incubated for 6–8 DIV. At this time, cultures were incubated in a K5 serum-free medium plus antioxidants. After medium change, cells were washed with PBS at the indicated times (1–8 hr), and then incubated for 15 min with Annexin V-FITC. Cells were washed with PBS and mounted with methanol-glycerol 1:1 v/v. Preparations were observed under epifluorescence microscopy using a rhodamine filter (Martin et al., 1995). The fluorescence imaging system was the same as described for  $Ca^{2+}$  measurement. Results are expressed as arbitrary units of fluorescence intensity (20 neurons by field).

#### Statistical Analysis

Data were expressed as means  $\pm$  SDS, and statistical significance of the results was determined by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Fisher's test post-hoc, with statistical significance set at  $P > 0.05$ .

### RESULTS

#### Antioxidants Promote Cell Survival of CGN in K5 Medium

In agreement with previous reports (D'Mello et al., 1997; Ishitani et al., 1997; Nardi et al., 1997; Villalba et al., 1997), when CGN cultured in K25 for 8 days were transferred to K5, more than 45 and 80% CGN died after 24 and 48 hr, respectively, as measured by MTT transformation (Fig. 1A). These results were similar to those obtained using FDA to label living cells ( $82.8 \pm 8.9\%$  of FDA positive cells after 12 hr;  $48.6 \pm 5.2\%$  after 24 hr; and  $32.8 \pm 3.1$  after 48 hr). Cell viability measured 24 hr after transferring cells to K5, was unaffected if CGN were returned to a K25 medium within the first 3 hr (Fig. 1B). After 4 hr of K25 replacement, less than half of the population could be rescued and after 6–8 hr of K25 replacement all cells died (Fig. 1B). Thus, under these conditions, CGN are committed to die after 4 hr of K5 treatment. Also, these observations were supported by the morphological appearance of CGN when analyzed by phase contrast microscopy (Fig. 2A,B). In line with previous studies, the observed CGN death induced by K5 showed characteristics of apoptosis as evidenced by the nuclear condensation in K5 cells stained with Hoechst after 24 hr (Fig. 2E,F) and the translocation of phosphatidylserine in K5 cells labeled with annexin V (Fig. 3A). The translocation of phosphatidylserine (PS) showed an increase after 3 hr of transferring CGN from K25 to K5 media, reaching a maximal at 5 hr, when it remained without change for the following 6 hr (Fig. 3A).

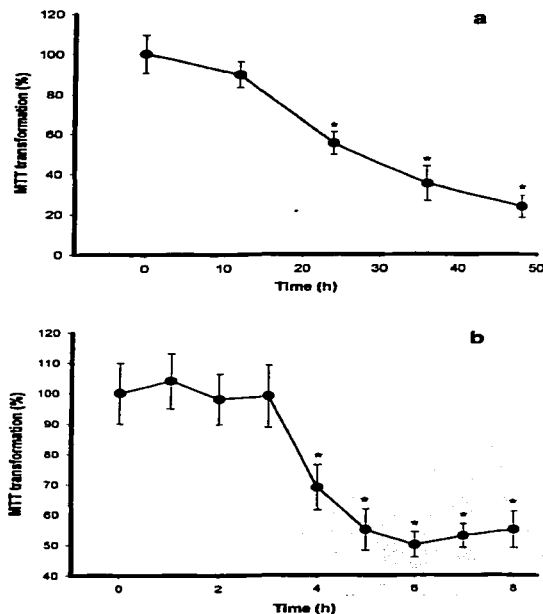


Fig. 1. Time course of CGN death induced by low  $[K^+]_e$ . Cells were switched from 25 mM KCl to a 5 mM KCl medium and cell survival was estimated as MTT transformation. **A:** Time course of CGN survival after change to K5 medium. **B:** CGN survival measured 24 hr after switching to a K5 medium and then returned to K25 medium at the indicated times. Note that after 4 hr in a K5 medium CGN cannot be rescued by K25. Data are mean  $\pm$  SEM of 9 independent experiments. \*Significantly different from control (time = 0) ( $P < 0.05$ ).

Several antioxidants that act through different mechanisms, were tested on CGN death induced by K5 after 24 hr. In agreement with previous studies (Atabay et al., 1996; Schulz et al., 1996), it was found that the antioxidant enzymes Cu/Zn SOD (1–30 mU/ml) and catalase (0.1–10 mU/ml) were able to protect from cell death by about 75% and 56%, respectively, when added simultaneously to the change of medium (Fig. 2C,D). Chromatin condensation was also markedly decreased in cells switched to K5 plus the antioxidant enzymes as evidenced by nuclear staining with Hoechst (Fig. 2G,H). The mitochondrial form of SOD, MnSOD used at 10 mU/ml was also very efficient by inhibiting CGN death around 60% (not shown). Other antioxidants acting as scavengers of

TESIS CGN  
FALLA DE ORIGEN

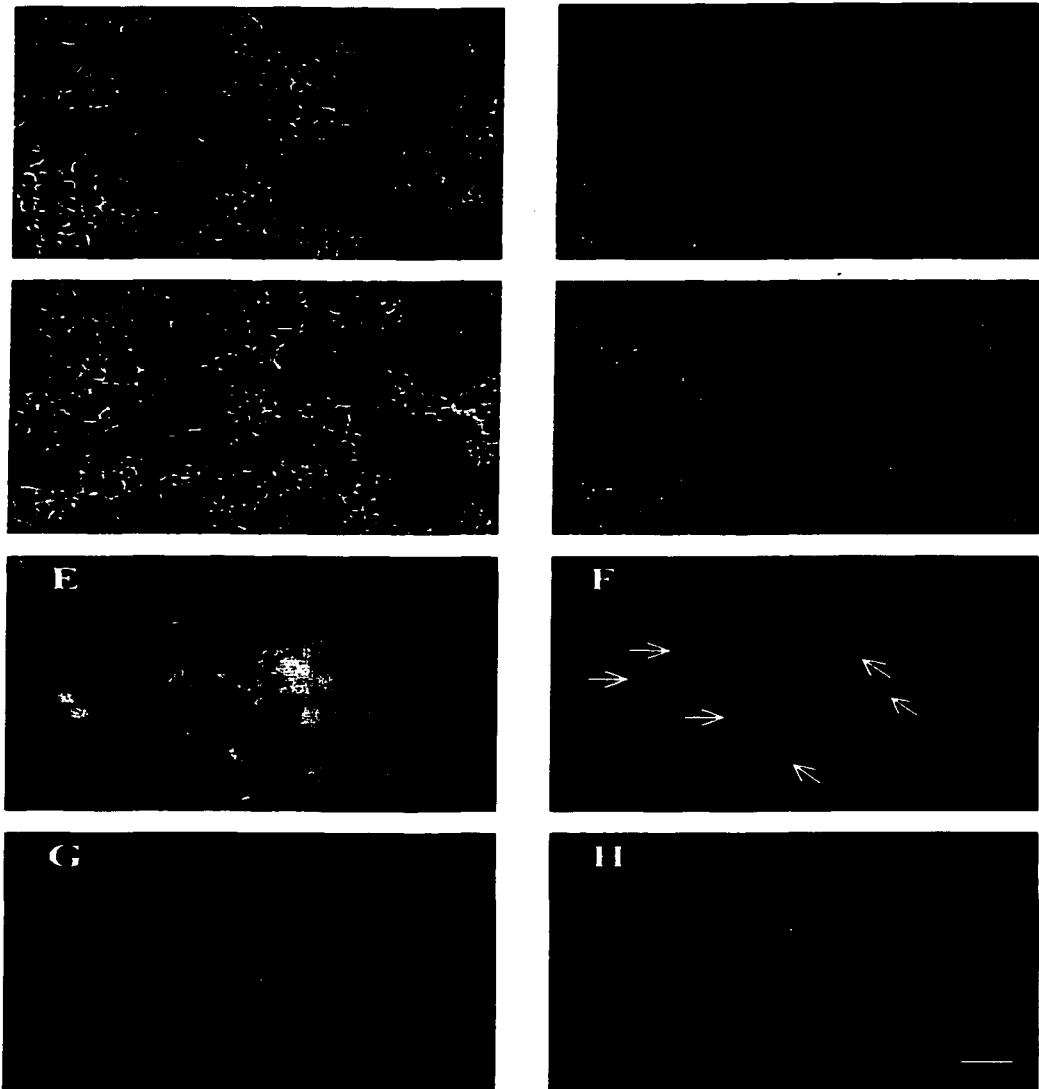


Figure 2.

TECHNICAL  
SALA DE RESEARCH

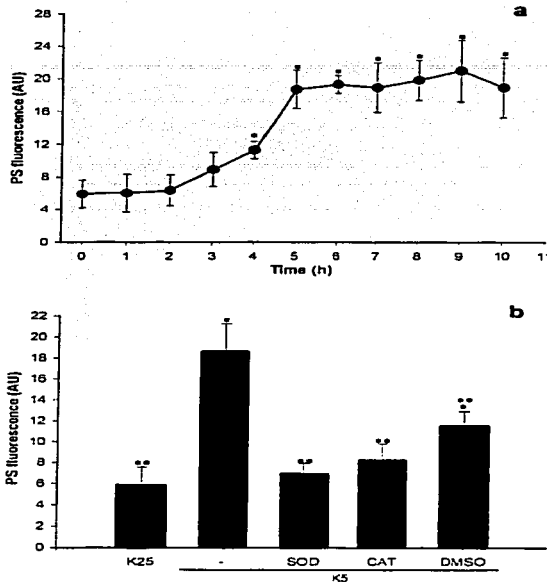


Fig. 3. Effect of antioxidants on phosphatidylserine (PS) translocation induced by low  $[K^+]_i$  in CGN. CGN were grown by 7 DIV in a K25 medium, and cells were switched to a K5 medium with or without antioxidants. PS translocation was evaluated as annexin-V binding as described in Methods and Materials. **A:** Time course of PS translocation in CGN transferred from a K25 medium to a K5 medium; **B:** PS translocation in CGN maintained 8 hr in a K5 medium plus 10  $\mu$ M Cu/ZnSOD (SOD), 1  $\mu$ M catalase (CAT) or 1.0% DMSO. Values are means  $\pm$  SEM of determinations from a total of at least 30 cells from five independent experiments. Significantly different from \*control (K25 or time = 0) and \*\*K5 ( $P < 0.05$ ).

hydroxyl radicals, peroxynitrites and peroxides like DMSO (1%) or mannitol (10  $\mu$ M) (not shown) also significantly inhibited cell death by 40–50%. Glutathione (5–10  $\mu$ M) protected from cell death only marginally and

other antioxidants like  $\alpha$ -tocopherol (50  $\mu$ M/ml) or *N*-acetyl cysteine (0.1–1.0  $\mu$ M) did not exert any effect on CGN survival (not shown).

All antioxidants tested, including Cu/Zn and Mn-SOD, catalase and DMSO added at the time of media change, prevented the phosphatidylserine translocation (Fig. 3B). These results suggested that ROS production is an event occurring earlier than PS translocation during cell death of CGN.

#### Antioxidants Suppress ROS Formation Induced by K5 at Different Times

When cells are changed from a K25 medium to a K5 medium both cytosolic and mitochondrial ROS are formed at three different times after switching (Fig. 4). Around 5–6 min after transferring CGN to a K5 medium a rise in cytosolic ROS is detected as DCF-fluorescence (Fig. 4A). Similarly, a significant increase in mitochondrial ROS, detected as DHR-123 fluorescence, is observed after 40 min of transferring cells to K5 medium (Fig. 4B). A late increase of both cytosolic and mitochondrial ROS is also observed after 3 hr, which reached a maximum after 4 hr of medium change (Fig. 4C,D). When CGN switched to a K5 medium were simultaneously treated with Cu/ZnSOD (10  $\mu$ M/ml), catalase (1  $\mu$ M/ml) or DMSO (1%) both the early and late peaks of cytosolic and mitochondrial ROS were completely suppressed (Fig. 4).

To elucidate which of the observed ROS produced are involved in the process of PND of CGN, we switched cells to a K5 medium followed by addition of antioxidants like Cu/ZnSOD, catalase or DMSO at different times (0, 2 and 5 hr) of switching (Fig. 5). Under these conditions we found that all antioxidants were equally efficient in protecting CGN from death when added simultaneously (0 hr), after 30 min (not shown) or 2 hr after medium change. In contrast, when antioxidants were added to cultures after 5 hr of switching to K5 none of these agents were able to rescue cells from death (Fig. 5). Thus suggesting that only the late ROS peak (after 3–4 hr) may play a direct role in the process of cell death.

#### Intracellular Calcium Levels Are Not Modified by K5 and Antioxidants Treatment

As we previously showed (Morán et al., 1999), when CGN maintained in a K25 medium are transferred to a K5 medium,  $[Ca^{2+}]_i$  is immediately reduced from about 280 nM to 50 nM (Morán et al., 1999) (Fig. 6A). This reduction of  $[Ca^{2+}]_i$  is kept constant (around 50 nM) in all the neurons evaluated during the first 4 hr after the K5 treatment (Fig. 6D, insert). After 24–48 hr a fraction of the cells in K5 still showed the observed low levels of

Fig. 2. Effect of antioxidants on the morphology of CGN switched to a K5 medium. CGN were grown by 7 DIV in a K25 medium, switched to a K5 medium and after 24 hr were observed by phase contrast (A–D) or fixed, incubated with Hoechst dye and observed in a fluorescence microscope (E–H). **A,E:** CGN switched to a K25 medium (control). **B,F:** CGN switched to a K5 medium after 24 hr. **C,G:** CGN switched to a K5 medium plus Cu/ZnSOD (10  $\mu$ M/ml) for 24 hr. **D,H:** CGN switched to a K5 medium plus catalase (1  $\mu$ M/ml) for 24 hr. (A–D) Scale bar = 50  $\mu$ m; (E–H) scale bar = 20  $\mu$ m.

TESIS  
FALLA DE ORIGEN

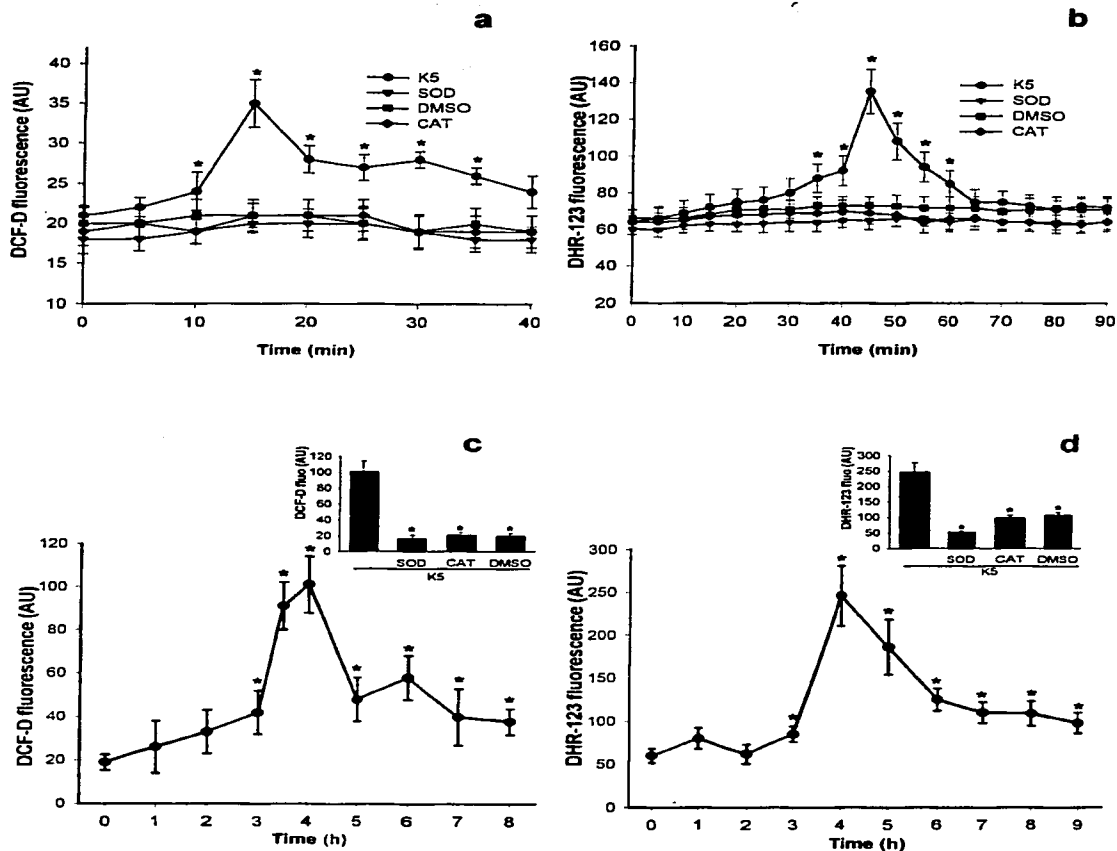


Fig. 4. Time course of ROS formation induced by low  $[K^+]_i$  in CGN. ROS formation was measured as fluorescence intensity of DCF to detect cytosolic ROS (A,C) or DHR-123 to detect mitochondrial ROS (B,D) as detailed in Methods and Materials. Cells were incubated with the probes and fluorescence was detected spectrofluorometrically.

Fluorescence measurement was followed for several periods of times. Individual neurons were analyzed using an image processing. Values are means  $\pm$  SEM of 4–6 independent experiments. \*Significantly different from control (time = 0) ( $P < 0.05$ ).

TESIS CON  
FALLA DE OXIGEN

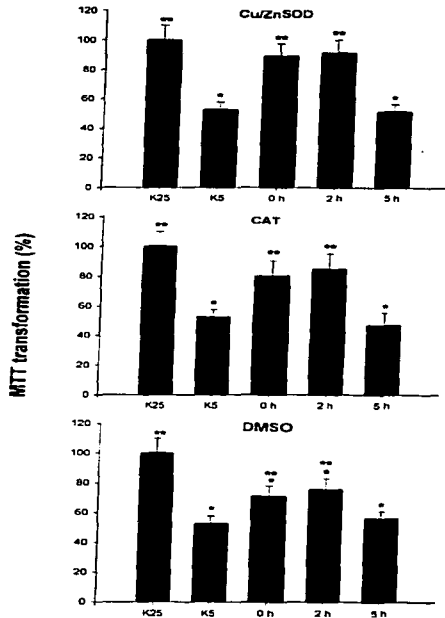


Fig. 5. Effect of antioxidants on CGN death induced by low  $[K^+]_i$ . CGN were grown for 7 DIV in a K25 medium, switched to a K5 medium added with 10 mU/ml Cu/ZnSOD (A) 1 mU/ml catalase; (B) or 1.0% dimethyl sulfoxide; (C) after 0, 2 hr or 5 hr of medium change and viability was measured as MTT transformation after 24 hr. Bars are means  $\pm$  SEM of nine independent experiments. Significantly different from \*K25 and \*\*K5 ( $P < 0.05$ ).

$[Ca^{2+}]_i$ . In contrast, a second population of cells exhibited variable increased  $[Ca^{2+}]_i$  levels probably corresponding to cells that are close to dying (not shown). The presence of 1 mU/ml catalase, 10 mU/ml Cu/ZnSOD or 1.0% DMSO in the K5 medium did not modify the mentioned reduction in  $[Ca^{2+}]_i$  (Fig. 6B–D). Four hours after the change to K5 medium  $[Ca^{2+}]_i$  none of the tested antioxidants exerted a significant change on the observed  $[Ca^{2+}]_i$  (Fig. 6D, insert). Thus,  $[Ca^{2+}]_i$  do not seem to be directly related to the late ROS peaks observed around 4 hr after switching and the effect of antioxidants seems not to be mediated through a modification in  $[Ca^{2+}]_i$ .

### Antioxidants Inhibit the Activity of Caspases Activated by K5

Caspase activity was measured using substrates like DEVD-AMC for caspase-3; IETD-AMC for caspase-8 and LEDH-AMC for caspase-9. We demonstrated for the first time that CGN transferred to K5 show a significant increase of caspase-8 activity, which peaked after 6–8 hr (Fig. 7A). Cell death induced by K5 was partially prevented (about 40%, after 36 hr) in the presence of the caspase-8 inhibitor IETD-CHO at 300  $\mu$ M. On the other hand, as others (Shultz et al., 1996; Atlante et al., 1998) and we (Morán et al., 1999) have shown, DEVD-AMC cleavage was markedly increased in cells changed to a K5 medium (Fig. 8A). DEVD cleavage reached a maximum after 8–9 hr showing a marked decrease after 12 hr (Fig. 8A). This activation was markedly higher (about 10 times) than that observed for caspase-8 (about 2 times). As DEVD can be cleaved by caspase-3 and caspase-7, we confirmed by Western blot analysis the processing of caspase-3 in cells switched to K5 (Fig. 8C). This result, however, does not rule out the possibility that caspase-7 could be also involved in the observed DEVD cleavage. Two other caspases were also measured in cells transferred to K5 medium: caspase-1 (measured as YAVD cleavage) (not shown) and caspase-9 (measured as LEHD cleavage) (Fig. 7A). None of these caspases showed any activation by K5 at the times measured (2–24 hr).

Caspase-8 activity, induced by K5 was completely abolished by SOD, DMSO and catalase (Fig. 7B). SOD treatment even reduced the basal activity observed in K25 cells (Fig. 7B). Similarly, DEVD cleavage induced by K5 was also markedly inhibited by the action of all antioxidants tested, although in contrast to caspase-8, inhibition was not complete (Fig. 8B). SOD at 10 mU/ml reduced by 82% the DEVD cleavage, whereas catalase and DMSO also partially inhibited DEVD cleavage by 73% (Fig. 8B). In all cases, the addition of the antioxidants at 30, 60, 90 (not shown) and 120 min (Fig. 8B) after switching did not modify the effect of the tested antioxidants. Although the antioxidants were very efficient in inhibiting the activity of caspase-3, the processing of the proenzymes of both caspases was inhibited only marginally. Figure 8C shows that the processing of the caspase-3 proenzyme was partially inhibited in K5 cells treated with SOD and catalase, but not DMSO.

### Oxidative Stress Induces CGN Death and Caspase-3 Activation

To study the effect of oxidative stress in CGN maintained in K25 (i.e., high levels of  $[Ca^{2+}]_i$ ) we measured CGN survival and DEVD-cleavage in cells treated with  $H_2O_2$  or xanthine/xanthine oxidase (XA/XO), two conditions known to induce ROS. Figure 9A shows that both conditions lead to CGN death, although  $H_2O_2$  treatment induces a 50% cell death after 1.5 hr and XA/XO after 5 hr. Interestingly, in contrast to  $H_2O_2$ , treatment with XA/XO increased caspase-3 activity after 2 hr (Fig. 9B).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



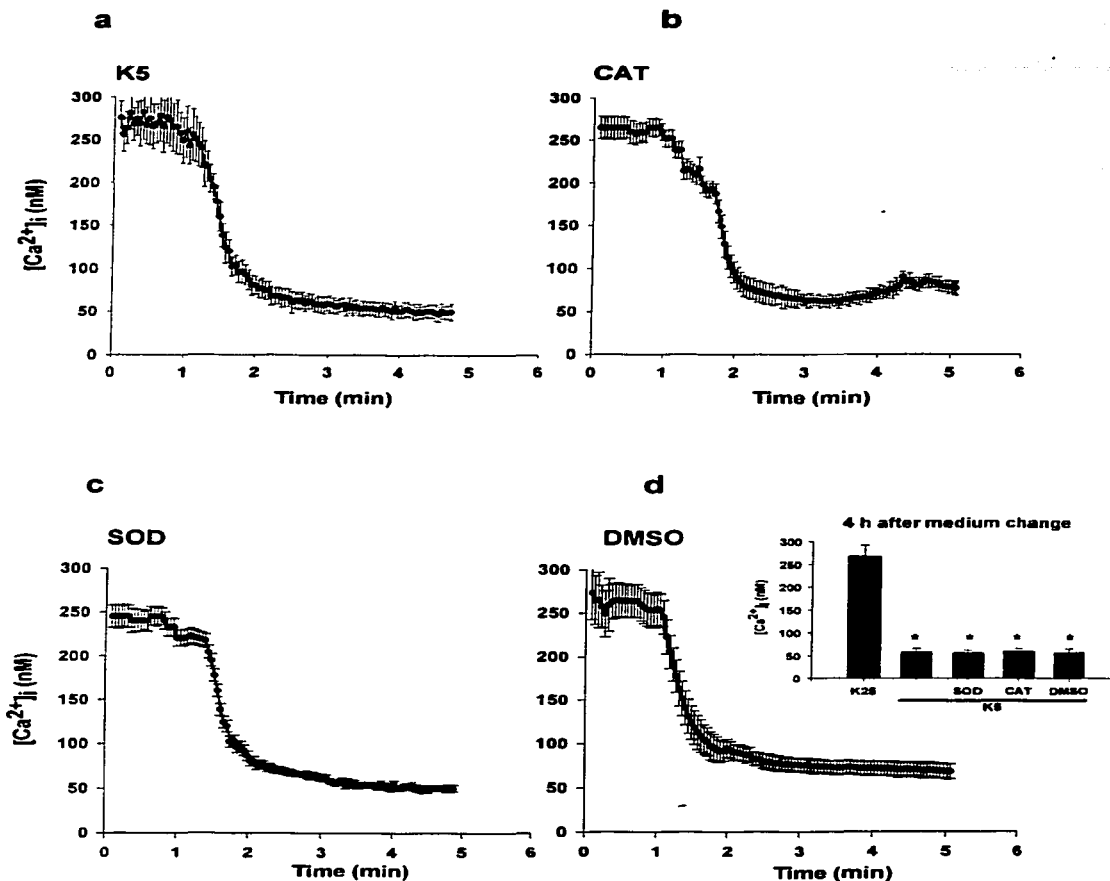


Fig. 6. Effect of antioxidants on  $[Ca^{2+}]_i$  in CGN switched to low  $[K^+]_o$ . CGN were preloaded with fura-2/AM in a K25 medium, perfused with a K25 medium for 20 min and then transferred to a K5 medium (min 1) in the presence of antioxidants. A: Control; B: 1 mU/ml catalase; C: 10 mU/ml Cu/ZnSOD (SOD); D: 1.0% DMSO.

Inset:  $[Ca^{2+}]_i$  in CGN maintained in low  $[K^+]_o$  for 4 hr in the presence of antioxidants at the same concentrations as above. \*Significantly different from K25 ( $P < 0.05$ ). In all cases, values are means  $\pm$  SEM of determinations from at least 20 neurons from four independent experiments.

TESIS UCM  
FALLA DE ORIGEN

## DISCUSSION

Caspases have been shown to play a key role in apoptotic cell death (Chen et al., 1998; Ni et al. 1998) and among them caspase-3 is the most prominently involved in apoptosis in neural tissues (Martin and Green, 1995; Cohen et al., 1997). On the other hand,  $[Ca^{2+}]_i$  and ROS have been suggested to play a central role in the initiation and execution of neuronal apoptosis (Johnson et al., 1992; Pearson et al., 1992; Copani et al., 1995; Atlante et al., 1998; Keller et al., 1998; Krohn et al., 1998; Morán, et al., 1999). In this study we analyzed the role of oxidative stress and its relationship to  $[Ca^{2+}]_i$  and caspase activation in neuronal apoptotic cell death using CGN apoptotic death as a model of study. When CGN grown in a medium containing 25 mM KCl are transferred to a 5 mM KCl medium, cells die with characteristics of apoptosis, including nuclear condensation, DNA fragmentation, etc. (D'Mello et al., 1993; Yan et al., 1994; Schulz et al., 1996; Nardi et al., 1997; Morán et al., 1999). In this study we also confirm that K5 activate caspase-3 and we demonstrated that this condition also induces caspase-8 activation.

Here, we confirmed previous observations that ROS, like superoxide anion, play a key role in apoptosis of CGN. We found that a variety of antioxidants are able to inhibit the CGN death process. Among the antioxidants tested, SOD was the most efficient followed by catalase and DMSO. Glutathione had only a marginal effect. SOD is known to metabolize superoxide anion, catalase removes peroxides and mannitol, DMSO and glutathione act as scavengers of hydroxyl anion, peroxy nitrates and peroxides. Glutathione, in addition, participates in the reaction of removal of peroxides by glutathione peroxidase. Some preliminary studies in our laboratory have demonstrated that CGN loaded with dihydroethidium, a probe used to preferentially detect superoxide anion (Ishikawa et al., 1999), show a marked fluorescence after 4 hr of K5 treatment. All these results support the notion that superoxide anion is one of the main species involved in the process of CGN death and it is in agreement with other studies (Greenlund et al., 1995; Patel, 1996; Bisaglia et al., 2000).

On the other hand, we found that ROS levels markedly increased after changing CGN from K25 to K5 at different times in different cellular compartments. We used two fluorophores to detect cytosolic and mitochondrial ROS,  $H_2DCFDA$  and DHR-123, respectively. An early increase in cytoplasmic ROS occurred at around 5–15 min after switching to K5. The source of these ROS was entirely cytoplasmic as no signal was observed with DHR-123. A second peak of ROS was detected in mitochondria after 30–40 min. This rise in ROS levels is coincident in time with an observed activation of SOD induced by the same experimental conditions (preliminary results), which further supports the primary formation of superoxide anion. Finally, in agreement with previous studies in this and other preparations (Greenlund et al., 1995; Schulz et al., 1996; Mattson, 1998), a peak of ROS

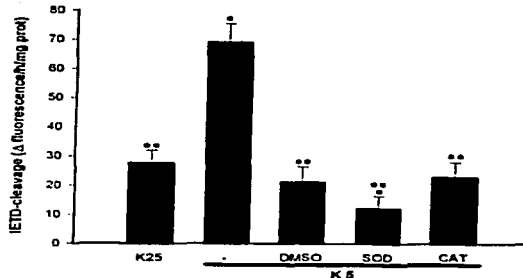
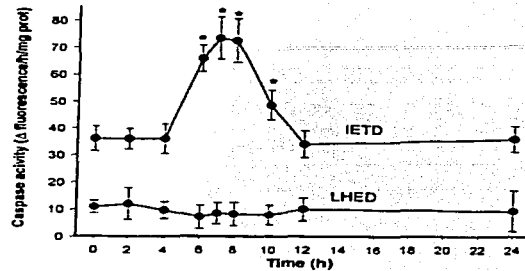


Fig. 7. Effect of antioxidants on caspases activity induced by low  $[K^+]_i$  in CGN. Cells were grown by 7 DIV in a K25 medium and then switched to a K5 medium during 0–24 hr (A), or 8 hr (B), and cell homogenates were processed for IETD-AMC or LEHD-AMC cleavage by a fluorometric procedure, as detailed in Methods. A: Time course of ac-IETD-AMC or LEHD-AMC cleavage. Values are means  $\pm$  SEM of 4 independent experiments. B: Effect of antioxidants on IETD-AMC cleavage induced by low  $[K^+]_i$  after 7 hr. 1.0% DMSO, 10 mU/ml Cu/ZnSOD (SOD) or 1 mU/ml catalase (CAT) were added to CGN simultaneously to K5. Scale bars = means  $\pm$  SEM of six independent experiments. Significantly different from \*K25 and \*\*K5 ( $P < 0.05$ ).

The participation of caspases in the CGN death induced by XA/XO was further supported by the observed inhibitory effect of a general blocker of caspases activity on CGN death (Table I). When cultures were treated with 150  $\mu$ M z-VAD, CGN death induced by XA/XO was significantly decreased by 50%. In contrast, cell death induced by  $H_2O_2$  was unaffected by treatment with the caspase inhibitor (Table I).

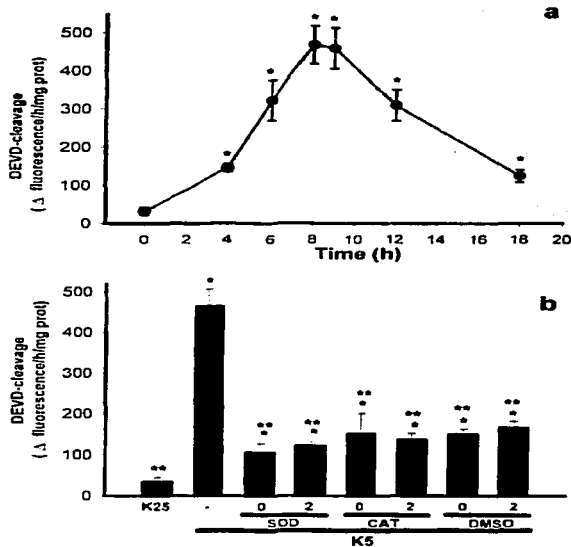
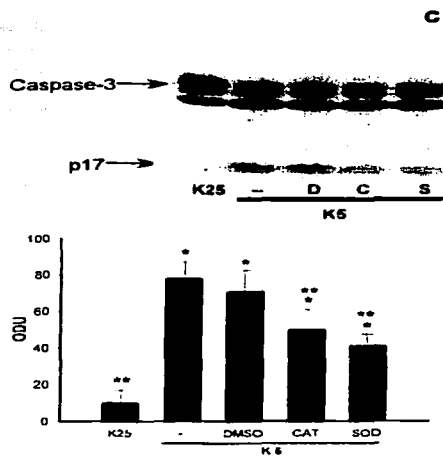


Fig. 8. Effect of antioxidants on caspase-3 activity induced by low  $[K^+]_i$  in CGN. Cells were grown during 7 DIV in a K25 medium and then switched to a K5 medium for 0–20 hr (A), or 8 hr (B), and cell homogenates were processed for immunoblot or DEVD-AMC cleavage by a fluorometric procedure as detailed in Methods and Materials. A: Time course of DEVD-AMC cleavage. Values are means  $\pm$  of 6 independent experiments. B: DEVD-AMC cleavage after 8 hr of

levels was detected after 3–4 hr in both the cytoplasm and mitochondria compartments. Although we cannot rule out a simultaneous generation of ROS in the two compartments, it is possible that one peak could be involved in the generation of the second one. In this regard, a recent study demonstrated that neuronal death induced by NGF deprivation is dependent on cytosolic ROS production via NADPH-oxidase activation (Tammariello, 2000). In all cases, ROS production tends to return to normal levels after the peak production. This could be due to a cessation of the initial signal inducing the ROS production simultaneously to an activation of the endogenous antioxidant systems, like SOD. These two events would not be enough to prevent cell death.

The four peaks of ROS produced in CGN by K5 are completely inhibited by all antioxidants tested. Interestingly, the abolition by antioxidants of the first two ROS



medium change to K5 plus antioxidants. Antioxidants were added simultaneously (0) or 2 hr (2) after medium change. (C) Immunoblot of caspase-3 of cells treated with 1.0% DMSO (D), 1 mU/ml catalase (C) or 10 mU/ml Cu/ZnSOD (S) simultaneously to the switch to K5. p17, cleaved product of 17 kDa. Scale bar = means  $\pm$  SEM of 3 determinations. Significantly different from \*K25 and \*\*K5 ( $P < 0.05$ ).

peaks (15 and 40 min) did not affect CGN death, whereas the inhibition of the late cytosolic and mitochondrial ROS peaks (3–4 hr) markedly reduced cell death. Thus, although we cannot rule out a possible influence of the early ROS peaks on the generation of the late ROS peaks, we can state that only the late ROS peaks (3–4 hr) seem to be critical for the CGN death process. In other models of neuronal death it has also been proposed that ROS is an early event in the process of apoptotic cell death (Guo et al., 1999; Ishikawa et al., 1999; Tammariello et al., 2000). In our system, the role of the ROS in the process of CGN apoptosis is not known. In this regard, our results show that ROS production is upstream to most of the early events during apoptosis and raises the possibility that they could serve as a signal to the initial phase of the apoptotic CGN death. This idea is supported by the fact that the time of appearance of the late ROS peaks corresponds to

## Oxidative Stress and Cerebellar Granule Cells Death

a

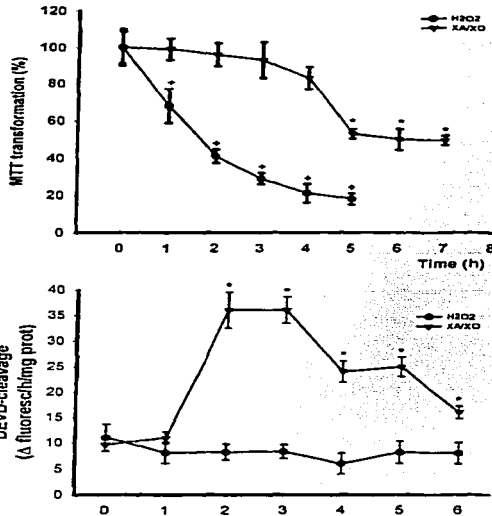
**TABLE I. Effect of z-VAD on CGN Death Induced by XA/XO and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>†</sup>**

Condition	MTT Transformation (%)
K25	100.0 ± 11.7
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	20.0 ± 3.0*
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + z-VAD	21.2 ± 4.2*
XA/XO	52.5 ± 1.5*
XA/XO + z-VAD	73.2 ± 4.1***

<sup>†</sup>Granule cells were cultured in a K25 medium for 7 days in vitro and then treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.01%) or XA/XO (100 μM/45 mU) with or without z-VAD (150 μM). After 5 hr MTT transformation was estimated as detailed in Methods. Results are means ± SD of 3 experiments.

\*P < 0.05 compared to K25.

\*\*\*P < 0.05 compared to XA/XO.



**Fig. 9. Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and XA/XO on cell viability and DEVD-cleavage in CGN.** Cells were cultured for 7 DIV in a K25 medium and then treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.01%) or XA/XO (100 μM/45 mU). After the indicated times, MTT transformation (A) or DEVD-cleavage (B) was measured as indicated in Methods. Data are mean ± SEM of three independent experiments. \*-\* Significantly different from control values (P < 0.05).

b

sion by acting on transcription factors in a variety of families like NF-κB, AP-1 and AP-2 (for review see Dalton et al., 1999).

It is well known that calcium plays a critical role in the process of apoptotic cell death of CGN (Kingsbury and Balázs, 1987; Pearson et al., 1992; Castilho et al., 1999). In a previous study (Morán et al., 1999) we found that immature CGN require certain Ca<sup>2+</sup> levels (about 300 nM) to support cell survival. At this Ca<sup>2+</sup> level, both the activity and expression of caspase-3 are inhibited. When [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> is below a certain concentration (150 nM), cell death occurs concomitantly to a high activity of caspase-3. One question was to know the relationship between ROS production and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. It is commonly accepted that a marked increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> can lead to ROS production (Chakraborti et al., 1999). In our model, however, when [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> is kept around 300 nM no ROS production was detected, but a reduction of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> to around 50 nM induces a delayed significant ROS increase. Besides, during ROS production, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> levels are not changed before, during or posterior to ROS increase. Therefore ROS production, particularly that related to cell death, is not affecting [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> levels. These results then support the notion that, in our model, ROS generation is mediated by a cellular mechanism, which is independent of an increase of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, that remains to be elucidated. On the other hand, the protective effect of antioxidants observed in this study was not mediated by a modification of cytosolic Ca<sup>2+</sup> levels. Thus, although Ca<sup>2+</sup> levels seem to be the initial signal that directly or indirectly leads to ROS production and cell death, the requirement to induce CGN death is an increase in ROS levels, regardless of the [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. As it was already mentioned, this is supported by the fact that in CGN maintained in 300 nM [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, apoptotic events and CGN death were directly induced by increasing ROS with XA/XO treatment.

As others and we have reported, the activity of caspase-3 is induced by a reduction in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, and both events could be related to apoptotic cell death of CGN (Morán et al., 1999). In the present study we found that all antioxidants tested inhibited partially both the activity and processing of caspase-3 and that this inhibition was not

the time when cells are committed to die, immediately before the translocation of phosphatidylserine and the activation of two caspases. Also, the cytosolic and mitochondrial peaks are only transient and last around 1 hr. Moreover, the presence of antioxidants blocks phosphatidylserine translocation and caspase activity. In this regard, we were able to induce in a short period of time (1–5 hr) a significant activation of caspase-3, nuclear condensation and apoptotic CGN death by increasing ROS in a xanthine/xanthine-oxidase system, but not H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, in cells maintained in a K25 medium. Thus suggesting that ROS, particularly superoxide anion, per se could directly induce some of the early apoptotic events in a Ca<sup>2+</sup>-independent manner. The mechanism by which ROS could serve as a signal is not known, but they could act directly on a large number of groups of molecules. More recently, it has been proposed that ROS could also modulate the gene expres-

TESIS CON  
FALLA DE CUBREN

mediated by any alteration in  $[Ca^{2+}]_i$ . The inhibition by antioxidants of caspase-3 activity did not correspond in magnitude to the observed inhibition of its processing. This suggests that antioxidants could act at different levels like processing of the proenzyme or the activity. It remains to be elucidated whether this inhibitory action could also affect the expression and levels of the mRNA, which is known to be markedly increased by K5 in CGN (Morán et al., 1999). Also, on the other hand, an interesting observation was that although there was a complete inhibition by the antioxidants tested on PS translocation, ROS production and caspase-8 activity; the effect of these antioxidants was only partial for cell death and caspase-3 activity and processing. One possible explanation for this result is that a component of caspase-3 activation is not related to oxidative stress. Alternatively, it could be possible that other initiator caspases besides caspase-8 involved in caspase-3 activation could be differentially affected by these antioxidants.

In conclusion, we have shown that CGN apoptotic death induced by low potassium involves the activation of caspase-8 and caspase-3, but not caspase-9 or caspase-1. CGN death is triggered by a  $[Ca^{2+}]_i$  reduction, which is followed by increases in ROS levels. Once  $[Ca^{2+}]_i$  reduction initiates the process of cell death, however, the ROS production seems to be the critical event independent on  $[Ca^{2+}]_i$ . The generation of ROS occurred at three different times, being those produced after 3–4 hr involved in the process of cell death. Caspases activation and PS translocation were downstream of ROS production. These findings indicate that ROS play a critical role in the initiation of the apoptotic process including the activation of caspases.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the technical assistance of Ms. Guadalupe Domínguez. This research was supported by grants 25521-N from Conacyt and IN203400 from DGAPA-UNAM. A.V. is supported by a Conacyt fellowship.

#### REFERENCES

- Atabay C, Cagnoli E, Ikonovic M, Manev H. 1996. Removal of serum from primary cultures of cerebellar granule neurons induces oxidative stress and DNA fragmentation: protection with antioxidants and glutamate receptor antagonist. *J Neurosci Res* 43:465–475.
- Atlante A, Gagliardi S, Marra E, Calissano P. 1998. Neuronal apoptosis in rats is accompanied by rapid impairment of cellular respiration and is prevented by scavengers of reactive oxygen species. *Neurosci Lett* 245:127–130.
- Azbill R, Mu X, Bruce-Keller A, Mattson M, Springer J. 1997. Impaired mitochondrial function, oxidative stress and altered antioxidant enzyme activities after traumatic spinal cord injury. *Brain Res* 765:283–290.
- Balázs R, Jørgensen OS, Hack N. 1988. N-methyl-D-aspartate promotes the survival of cerebellar granule cells in culture. *Neuroscience* 27:437–451.
- Balázs R, Hack N, Jørgensen OS. 1990. Selective stimulation of excitatory amino acid receptor subtypes and the survival of cerebellar granule cells in culture. *Neuroscience* 37:251–258.
- Bisaglia M, Natalini B, Pellicciari R, Straface E, Malorni W, Monti D, Franceschi C, Schettini G. 2000.  $C_3$ -Fullerol-tris-methanodicarboxylic acid protects cerebellar granule cells from apoptosis. *J Neurochem* 74:1197–1204.
- Castilho R, Manus W, Nicholls D. 1999. Oxidative stress, mitochondrial function and acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *J Neurochem* 72:1394–1401.
- Chakraborti T, Das S, Mondal M, Roychowhury S, Chakraborti S. 1999. Oxidant, mitochondria and calcium: an overview. *Cell Signal* 11:77–85.
- Chen J, Nagayama T, Jin K, Stetler RA, Zhu RL, Graham SH, Simon RP. 1998. Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia. *J Neurosci* 18:4914–4928.
- Cohen GM. 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326:1–16.
- Copani A, Bruno VMG, Barresi V, Battaglia G, Condorelli DF, Nicoletti F. 1995. Activation of metabotropic glutamate receptors prevents neuronal apoptosis in culture. *J Neurochem* 64:101–108.
- Dalton TP, Shertzer HC, Puga A. 1999. Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 39:67–101.
- 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 USA* 90:10989–10993.
- D'Mello SR, Borodetz K, Soltoff P. 1997. Insulin-like growth factor and potassium depolarization maintain neuronal survival by distinct pathways: possible involvement of PI3-kinase in IGF-1 signaling. *J Neurosci* 17:1548–1560.
- Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES. 1994. CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 $\alpha$ -converting enzyme. *J Biol Chem* 269:30761–30764.
- Gallo V, Kingsbury A, Balázs R, Jørgensen OS. 1987. The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J Neurosci* 7:2203–2213.
- Green D, Reed J. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281:1309–1316.
- Greenlund LJS, Deckwerth TL, Johnson EM. 1995. Superoxide dismutase delays neuronal apoptosis: a role for reactive oxygen species in programmed neuronal death. *Neuron* 14:303–315.
- Guo Q, Sebastian L, Sopher B, Miller M, Ware C, Martin G, Mattson M. 1999. Increase vulnerability of hippocampal neurons from preselin-1 mutant knock-in mice to amyloid  $\beta$ -peptide toxicity: central roles of superoxide production and caspase activation. *J Neurochem* 72:1019–1029.
- Itoh T, Iroh A, Horiuchi K, Pleasure D. 1998. AMPA receptor-mediated excitotoxicity in human NT2-N neurons results from loss of intracellular  $Ca^{2+}$  homeostasis after marked elevation of intracellular  $Na^+$ . *J Neurochem* 71:112–124.
- Ishikawa Y, Saroh T, Enokido Y, Nishio C, Ikeuchi T, Hatanaka H. 1999. Generation of reactive oxygen species, release of L-glutamate and activation of caspases are required for oxygen-induced apoptosis of embryonic hippocampal neurons in culture. *Brain Res* 824:71–80.
- Ishitani R, Sunaga K, Tanaka M, Aishita H, Chuang DM. 1997. Over-expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is involved in low  $K^+$ -induced apoptosis but not necrosis of cultured cerebellar granule cells. *Mol Pharmacol* 51:542–550.
- Johnson EM Jr, Koike T, Franklin J. 1992. A "calcium set-point hypothesis" of neuronal dependence on neurotrophic factor. *Exp Neurol* 115:163–166.
- Keller J, Guo Q, Holtsberg F, Bruce-Keller J, Mattson M. 1998. Increase sensitivity to mitochondrial toxin-induced apoptosis in neural cells mutant preselin-1 is linked to perturbed calcium homeostasis and enhanced oxyradical production. *J Neurosci* 18:4439–4450.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Oxidative Stress and Cerebellar Granule Cells Death

- Kingsbury A, Balázs R. 1987. Effect of calcium agonists and antagonists on cerebellar granule cells. *Eur J Pharmacol* 140:275-283.
- Krohn AJ, Preis E, Prehn JHM. 1998. Staurosporine-induced apoptosis of cultured rat hippocampal neurons involves caspase-1-like proteases as upstream initiators and increased production of superoxide as a main downstream effector. *J Neurosci* 18:8186-8197.
- Kruman I, Guo Q, Mattson M. 1998. Calcium and reactive oxygen species mediate staurosporine-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis in PC12 cells. *J Neurosci Res* 51:293-308.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature* 227:680-685.
- Martin SJ, Green DR. 1995. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell* 82:349-352.
- Mattson MP. 1998. Free radicals, calcium, and synaptic plasticity-cell death continuum: emerging roles of the transcription factor NF- $\kappa$ B. *Int Rev Neurobiol* 42:103-168.
- Morán J and Patel AJ. 1989. Effect of potassium depolarization on phosphate-activated glutaminase activity in primary cultures of cerebellar granule neurons and astroglial cells during development. *Dev Brain Res* 46:97-105.
- Morán J, Itoh T, Reddy U, Chen M, Alnemri E, Pleasure D. 1999. Caspase-3 expression by cerebellar granule neurons is regulated by calcium and cyclic AMP. *J Neurochem* 73:568-577.
- Ni B, Wu X, Du Y, Su Y, Hamilton-Byrd E, Rockey PK, Rostock P Jr, Poirier GG, Paul SM. 1997. Cloning and expression of a rat brain interleukin-1 $\alpha$ -converting enzyme (ICE)-related protease (IRP) and its possible role in apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 17:1561-1569.
- Nardi N, Avidan G, Daryl D, Zilkha-Falb R, Barzilai A. 1997. Biochemical and temporal analysis of events associated with apoptosis induced by lowering the extracellular potassium concentration in mouse cerebellar granule neurons. *J Neurochem* 68:750-759.
- Oppenheim R, Prevette D, Tytell M, Homma S. 1990. Naturally occurring and induced neuronal death in the chick embryo in vivo requires protein and RNA synthesis: evidences for the role of cell death genes. *Dev Biol* 138:104.
- Park ID, Morn E, Stefanis L, Troy C, Shelanski M, Geller H, Greene L. 1998. Multiple pathways of neuronal death induced by DNA-damaging agents, NGF deprivation and oxidative stress. *J Neurosci* 18:830-840.
- Patel M, Day BJ, Crapo JD, Fridovich I, McNamara JO. 1996. Requirement for superoxide in excitotoxic cell death. *Neuron* 16:345-355.
- Pearson H, Graham ME, Burgoyne RD. 1992. Relationship between intracellular free calcium concentration and NMDA-induced cerebellar granule cell survival in vitro. *Eur J Neurosci* 4:1369-1375.
- Posmantur R, McGinnis K, Nadimpalli R, Gilbertsen RB, Wang KKW. 1997. Characterization of CPP32-like protease activity following apoptotic challenge in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Neurochem* 68:2328-2337.
- Schulz JB, Weller M, Klockgether T. 1996. Potassium deprivation-induced apoptosis in cerebellar granule neurons: a sequential requirement for new mRNA and protein synthesis, ICE-like protease activity, and reactive oxygen species. *J Neurosci* 16:4696-4706.
- Stephen S, Floreani M, Negro A, Facci L, Giusti P. 1998. Neurotrophins rescue cerebellar granule neurons from oxidative stress-mediated apoptotic death: selective involvement of phosphatidylinositol 3-kinase and the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Neurochem* 70:1859-1868.
- Stuart M, Damoiseaux J, Frederik P, Arends J, Reutelingsperger C. 1998. Surface exposure of phosphatidylserine during apoptosis of rat thymocytes precedes nuclear changes. *Eur J Cell Biol* 76:77-83.
- Tammariello S, Quinn M, Estus S. 2000. NADPH oxidase contributes directly to oxidative stress and apoptosis in nerve growth factor-deprived sympathetic neurons. *J Neurosci* 20:1-5.
- Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR, Poirier GG, Salvesen GS, Dixit VM. 1995. Yama/CPP32 $\beta$ , a mammalian homologue of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* 81:801-809.
- Thornberry NA. 1994. Interleukin-1 beta converting enzyme. *Meth Enzymol* 244:615-631.
- Villalba M, Bockaert J, Journot L. 1997. Concomitant induction of apoptosis and necrosis in cerebellar granule cells following serum and potassium withdrawal. *Neuroreport* 8:981-985.
- Yan S, Schmidt A, Anderson G, Zhang J, Brett J, Zou Y, Pinsky D, Stern D. 1994. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem* 269:9889-9897.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **6.2. Participación de la NADPH-oxidasa en la muerte apoptótica de neuronas granulares de cerebelo privadas de potasio**

La enzima NADPH-oxidasa se ha estudiado sobre todo en células del sistema inmune, como neutrófilos y macrófagos. Este complejo está compuesto por 5 subunidades proteicas, dos membranales (gp91-phox y p22-phox) y tres citosólicas (p40-phox, p47-phox y p67-phox). El complejo se activa cuando las subunidades citosólicas, p47-phox y p67-phox, se fosforilan y se translocan a la membrana uniéndose a las subunidades membranales (Diatchunk et al., 1997; Fontayne et al., 2002; Hua et al., 2000). Una vez activa, la enzima genera anión superóxido usando electrones del NADPH (cofactor de la enzima) y transfiriéndolo al dióxígeno. Se ha descrito que el papel de la NADPH-oxidasa en las células del sistema inmune es generar anión superóxido como un mecanismo microbicida. Recientemente se describió la presencia de este complejo en células del sistema nervioso, sin que se conozca aún su función (Hwang et al., 2002; Shimohama et al., 2000; Tammariello et al., 2000). En algunos de estos estudios se ha sugerido una posible participación del complejo enzimático en la muerte apoptótica de neuronas privadas de señales tróficas (Kim et al., 2002; Tammariello, et al., 2000). Con la finalidad de conocer la participación de la NADPH-oxidasa en la muerte apoptótica de las neuronas granulares en cultivo inducida con la privación de potasio extracelular, se hicieron los siguientes experimentos.

### **6.2.1. Presencia de los componentes del complejo NADPH-oxidasa**

Se evaluó por medio de un análisis de Western blot la presencia del complejo de la NADPH-oxidasa en las CGC. Para esto se utilizaron anticuerpos dirigidos contra cuatro de las cinco subunidades de la enzima. En la figura 6.1 se muestra que las subunidades de la NADPH-oxidasa, gp91-phox, p67-phox, p47-phox y p22-phox, están presentes en las neuronas granulares mantenidas en cultivo durante 8 DIV en potasio extracelular alto (K25). Como se observa en la figura 6.1., algunas de las subunidades incrementan su expresión con la privación de potasio (K5). Esto se puede observar particularmente en las subunidades gp91-phox y p47-phox después

de 1-4 h del estímulo de muerte. Las subunidades p22-phox y p67-phox parecen no modificar su expresión en respuesta a esta condición (figura 6.1). Estos resultados prueban que el complejo NADPH-oxidasa está presente en las neuronas granulares del cerebelo en cultivo y que podrían estar modificando sus niveles como resultado de un estímulo apoptótico.

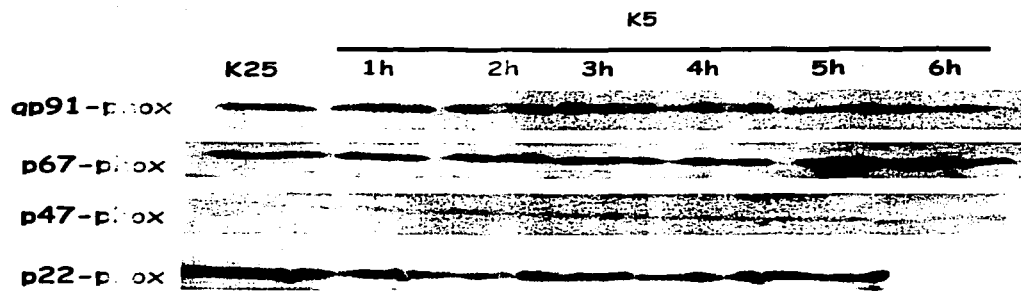


Figura 6.1 Presencia de las subunidades de la NADPH-oxidasa en CGC en cultivo. Las CGC se mantuvieron en cultivo por 8 DIV y después se transfirieron a K5 por los tiempos indicados. Se realizó análisis de "western blot" de los homogeneizados.

### 6.2.2. Activación de la NADPH-oxidasa

Para conocer si el complejo detectado en estas células se activa como ocurre en otros modelos, medimos la actividad de la enzima en homogeneizados totales de CGC creadas en K25 y transferidas a K5 por distintos tiempos (figura 6.2) (Shpungin *et al.*, 1999). Cuando las neuronas se transfirieron a K5 se observó que la enzima incrementa su actividad desde la primera hora alcanzando una actividad máxima de alrededor de 10 veces después de cuatro horas del estímulo (de 30.34 en células control, hasta 329.909  $\Delta$  abs/h/mg proteína después de cuatro horas en K5). La actividad regresa a los niveles de las células control seis horas después de haberse dado el estímulo (figura 6.2). Estos resultados correlacionan estrechamente con algunos de los marcadores apoptóticos medidos en esta misma preparación. Se ha demostrado que durante las primeras cuatro horas después de la privación del



potasio extracelular (K5), se genera la translocación de la PS y el pico máximo de EOR tanto citosólico como mitocondrial. Esto sugiere que la actividad de la NADPH-oxidasa probablemente estaría contribuyendo a la formación de estas EOR y a la translocación subsecuente de la PS. Por otro lado, la máxima activación de la caspasa-1 y la caspasa-8 ocurre posterior a los tiempos de la máxima activación de la NADPH-oxidasa y, además, éstas se inhiben en presencia de los antioxidantes antes de la generación del estrés oxidativo. Por consiguiente, es probable, que la actividad de la NADPH-oxidasa, a través de la generación del anión superóxido, esté involucrada en la activación de dichas caspasas.

Se ha descrito que para que la NADPH-oxidasa se active, se requiere que las subunidades citosólicas (p40-phox, p47-phox y p67-phox) se transloquen a la membrana formando un complejo con las subunidades membranales (gp91-phox y p22-phox). Una vez translocadas, las subunidades mencionadas forman el complejo enzimático activo entre estas subunidades y las membranales (Karlsson y Dahlgren, 2002). En las células transferidas a K5 ocurre una translocación de la subunidad p67-phox hacia la fase membranal a partir de la primera hora, que se mantiene durante las siguientes cinco horas (figura 6.3). Utilizando la misma técnica no detectamos la translocación de la subunidad p47-phox (no se muestra).

Se sabe que uno de los cambios celulares más tempranos después de que las CGC son transferidas a un medio K5 es una marcada reducción de  $[Ca^{2+}]_i$ , que si no se restablece dentro de las primeras cuatro horas genera una señal que lleva a la muerte apoptótica de estas células (Valencia y Morán, 2001). Se ha descrito que este calcio puede regular la activación de la NADPH-oxidasa (Karlsson y Dahlgren, 2002). Por otro lado, en un estudio previo (Morán *et al.*, 1999) se demostró que la concentración extracelular de potasio (5-25 mM) determina de manera indirecta, pero de forma muy precisa y predecible, la concentración intracelular de calcio en CGC (ver figura 6.1).

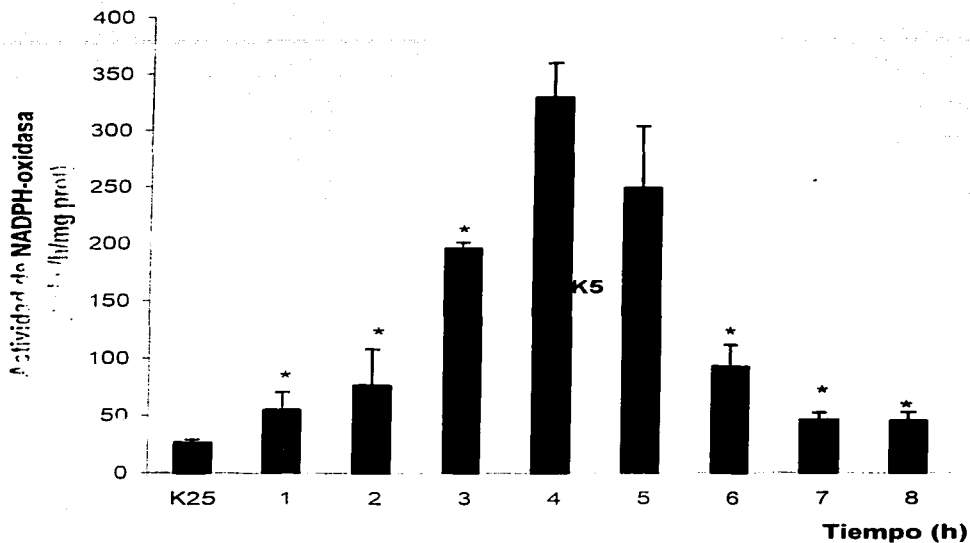


Figura 3. Efecto del K5 en la actividad de la NADPH-oxidasa en CGC. Las CGC se mantuvieron en cultivo por 8 DIV y después se transfirieron a K5 por los tiempos indicados y se midió la actividad de la enzima de acuerdo a lo detallado en Métodos. Promedios  $\pm$  D.E. \* Significativamente diferente a K25,  $P < 0.05$ .

K5

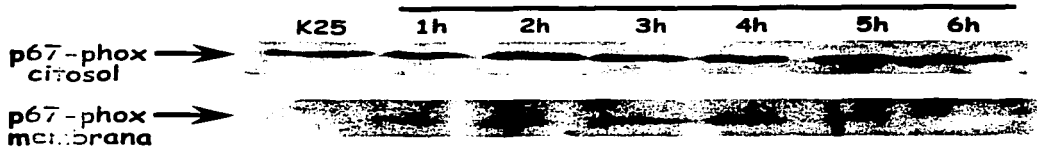


Figura 6.3. Translocación de la subunidad p67-phox del citosol a la membrana plasmática. Las CGC se mantuvieron en cultivo por 8 DIV y después se transfirieron a K5 por los tiempos indicados y se realizaron análisis de "western blot" de las fracciones celulares. La privación de potasio extracelular en las neuronas en cultivo induce una translocación de la subunidad p67-phox.

[K <sup>+</sup> ] extracelular de KCl	[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>
5 mM	50 nM
10 mM	80 nM
15 mM	150 nM
20 mM	230 nM
25 mM	290 nM

Tabla 6.1 Correspondencia entre la concentración extracelular de potasio con la concentración intracelular de calcio en las CGC. Cuando las CGC se encuentran en distintas concentraciones extracelulares de potasio, se modifica la apertura de los canales de calcio sensibles a voltaje, lo que trae como consecuencia alteraciones en la concentración del este catión en la célula. (Morán, et al., 1999).

Basados en lo anterior y con el fin de conocer el papel del calcio en la activación de la NADPH-oxidasa, se midió la actividad de la NADPH-oxidasa en las neuronas cultivadas en KCl 25 mM por 8 DIV y transferidas a un medio con diferentes concentraciones de potasio (5-20 mM). La figura 6.4 muestra que la enzima se activa cuando se reduce la concentración de potasio de entre 12.5 mM y 15 mM (figura 6.4).

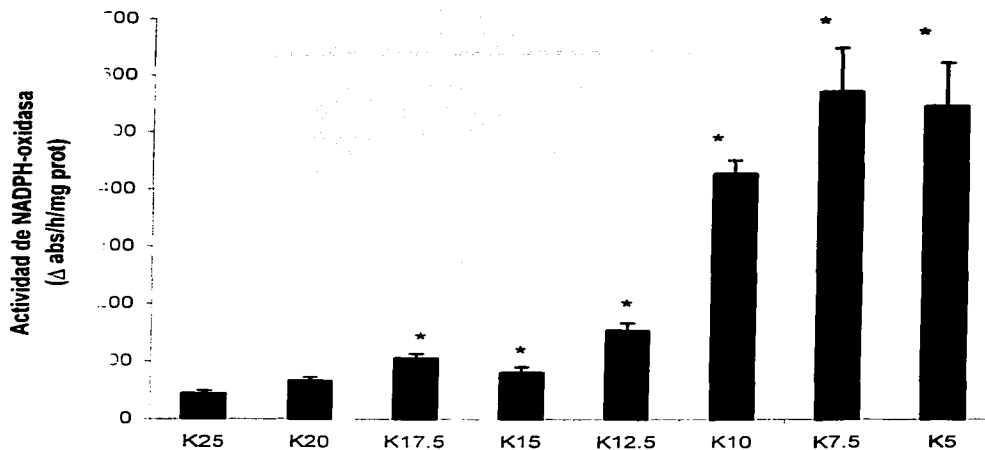


Figura 6... Efecto de la concentración de potasio extracelular en la actividad de la NADPH-oxidasa. Las CGC se mantuvieron en cultivo por 8 DIV y después se transfirieron durante cuatro horas a un medio con la concentración de potasio indicada y se midió la actividad de la enzima. Promedios  $\pm$  D.E. \* Significativamente diferente a K25,  $P < 0.05$ .

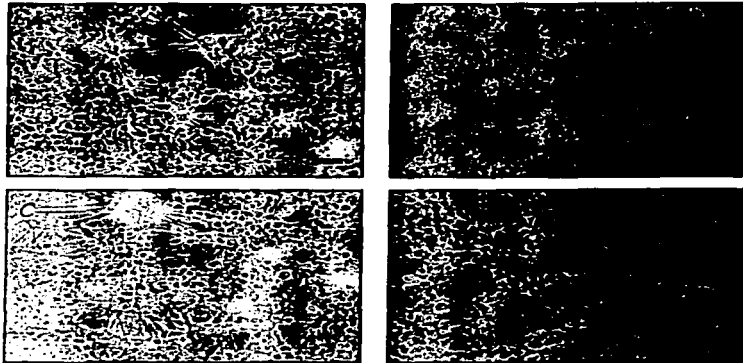
Es interesante mencionar que una concentración de potasio extracelular alrededor de 12.5 mM corresponde al punto crítico de la muerte neuronal, precisamente cuando ocurre la activación de la caspasa-3 y sus niveles de ARN muestran un incremento importante (Moran *et al.*, 1999). Así, estos resultados parecen coincidir con los indicadores apoptóticos en esta preparación que dependen de la concentración del calcio intracelular. Resultaría interesante conocer si existe una relación directa entre los niveles de calcio y la activación de esta enzima durante el proceso de muerte apoptótica de las CGC privadas de potasio.

### **6.2.3. Efecto de inhibidores de la NADPH-oxidasa en la muerte neuronal**

Con la idea de conocer si la actividad de NADPH-oxidasa inducida por la privación de potasio (K5) genera una condición prooxidante responsable de la

muerte neuronal, se estudió el efecto de dos inhibidores de la actividad de esta enzima en la viabilidad de las CGC transferidas a un medio con K5. Se utilizaron dos compuestos que se han descrito como inhibidores de la actividad de este complejo en diversas preparaciones: el difenilenoiodonio (DPI) y el fluoruro de 4-(2-aminoetil) benceno sulfonilo (AEBSF) que es más específico que el DPI para inhibir la NADPH-oxidasa (Hwang et al., 2002). La figura 6.5 muestra el efecto de ambos compuestos en la muerte de CGC inducida por K5, evaluada morfológicamente (A-D) o como transformación de MTT (E). En presencia de DPI (500 nM) y de AEBSF (100  $\mu$ M), se preservó la morfología de las CGC después de veinticuatro horas de haber sido transferidas a un medio con K5 (figura 6.5 A-E). Esto se confirmó por los estudios con MTT donde se vio que el DPI evito parcialmente la muerte neuronal con respecto al K5 (figura 6.5E). Los tratamientos con AEBS 50  $\mu$ M y 100  $\mu$ M inducen un incremento mayor en la sobrevivencia celular de 25 y 30%, respectivamente (figura 6.5E).

Estos resultados sugieren de manera preliminar que el complejo membranal enzimático de la NADPH-oxidasa participa en la muerte apoptótica de las neuronas en cultivo inducida por el cambio de potasio extracelular. La activación de este complejo podría ser una causa temprana responsable de la producción de una condición prooxidante que representaría una señal para el proceso de muerte. Finalmente, esto sugiere que el anión superóxido o alguna de las EOR que derivan de el, podría funcionar como señal para la muerte por apoptosis.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

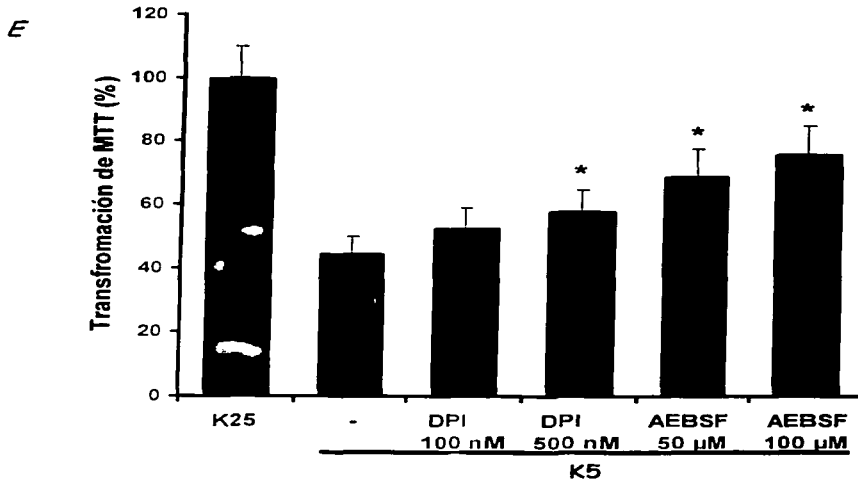


Figura 6.5. Efecto de los inhibidores de la NADPH-oxidasa en la muerte de las neuronas en cultivo inducida por K5. *A*, control (K25); *B*, K5; *C*, K5 + AEBSF 100 µM; *D*, K5 + DPI 500 nM; *E* transformación de MTT. En ambos casos las neuronas se cultivaron 8 DIV y se transfirieron a un medio con K5 en ausencia o presencia de los inhibidores indicados. 24 horas después se fotografiaron (*A-D*) o se realizó el ensayo de MTT (*E*). La barra en *A-D* es igual a 20 µm. Promedios ± D.E. \* Significativamente diferente a K5,  $P < 0.05$ .

6.3 Artículo sometido para su publicación: "Reactive oxygen species induce different cell death mechanisms in cultured cerebellar granule cells"

TESIS CCM  
FALLA DE ORIGEN

# Reactive oxygen species induce different cell death mechanisms in cultured cerebellar granule cells

Antonio Valencia and Julio Morán.

Department of Neurosciences, Institute of Cell Physiology, National University of Mexico, Mexico City, Mexico.

**ABSTRACT:** In cerebellar granule neurons (CGN) a potassium deprivation leads to apoptotic cell death. Under these conditions an intracellular calcium decrease appears like first death signal. At the same time ROS formation appear like an important event to maintain this program. Different works in neuroscience field suggest that any ROS formation is enough to induced apoptotic neuronal death. However in this study we demonstrated that initially specific ROS formation could lead different molecular mechanisms of cellular death. Apoptotic cell death with caspases activation occurs with treatments with xanthine plus xanthine oxidase in presence of catalase induces a superoxide anion formation and Rose Bengal with luminic stimuli induces singlet oxygen formation. In other hand a hydrogen peroxide formation by glucose oxidase plus glucose lead to necrosis-like cellular death. In the presence of superoxide and singlet

oxygen we found caspase-1, caspase-8 and caspase-3 activation, nuclear condensation and fragmentation, phosphatidylserine (PS) translocation and decrease in intracellular calcium levels. If we induce an increase of intracellular calcium via NMDA receptor or by ionophore action, the cellular death can be diminishing marginally, but only under both singlet oxygen and superoxide anion induce-apoptotic cell death. These experiments shown that specific ROS formation can lead to different molecular cell death mechanisms, and this suggest the probably a particularly intracellular pathways are involved in the initiation and executions of apoptotic neuronal death.

**Key words:** Superoxide anion, singlet oxygen, hydrogen peroxide, apoptosis, caspases, cerebellar granule neurons.

## INTRODUCTION

Apoptosis is a highly ordered process that contributes to the selective elimination of cells during physiologic and pathologic situations. This type of cell death can be recognized by several biochemical and morphological markers like chromatin condensation, DNA fragmentation, caspases activation and mitochondrial alterations, among others (1, 2, 3, 4, 5). Some recent studies have suggested that apoptotic neuronal death involves the participation, at different levels, of reactive oxygen species (ROS), like hydrogen peroxide, superoxide anion and singlet oxygen (6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13).

Some studies have suggested that hydrogen peroxide leads to apoptotic neuronal death by involving proapoptotic molecules (10), such as like initiators caspases (14). Superoxide anion seems to be responsible for the apoptotic cell death of trophic factor-deprived sympathetic neurons (6, 7), glutamate treated cerebellar neurons (9, 15, 16) as well as hippocampal neurons incubated with xanthine oxidase (8, 9). This ROS can also contribute to the production of peroxynitrites that could have also relevance in the apoptotic cell death induction (17). The singlet oxygen has also been involved in apoptotic death in non-neuronal cells

mediated by Bid and some members of the MAPK family (18). Also, the singlet oxygen has been related to alterations in the mitochondrial permeability transition pore that occurs in several apoptotic death models (19, 20).

Oxidative stress has also been implicated in necrotic cell death. It has been suggested that apoptotic or necrotic cell death can be induced depending on the exposure time and/or concentration of ROS (21, 22, 23, 24, 25). In the PC12 cells model, certain agents induce necrotic death by involving ROS production (24) and direct treatment with hydrogen peroxide can induce necrotic cell death (25). In cultures of cortical neurons, trophic factor deprivation (BDNF-deprivation) induces cell death with apoptotic and necrotic characteristics, involving ROS production (26). In cerebellar granule neurons, serum deprivation can lead to both apoptotic and necrotic cell death that could be mediated by ROS formation (27).

In a previous study (13), we suggested that superoxide anion could be responsible for the apoptotic CGC death induced by potassium-deprivation. However, no experimental evidence is available to exclude the participation of some ROS like hydrogen peroxide and singlet oxygen in the apoptotic cell death of CGC. The aim of the present

TESIS  
FALLA DE ORIGEN



study was to evaluate the effect of the direct production of superoxide anion, hydrogen peroxide and singlet oxygen on the mechanisms involved in CGC death. Under these conditions we found that superoxide anion and singlet oxygen lead to cell death with apoptotic characteristics in contrast to hydrogen peroxide that induces necrotic-like cell death.

## METHODS

### Chemicals and materials

Fetal calf serum, penicillin and streptomycin were from GIBCO (Grand Island, NY). Caspase substrates were from Peptides Intl. (Louisville, KY). Fura-2 acetoxymethyl ester (fura-2/AM), H<sub>2</sub>DCF<sub>2</sub>DA, Hoechst 33258, dihydrorhodamine-123 (DHR123), Mito tracker red and pluronic F-127 were from Molecular Probes (Eugene, OR). Poly-L-lysine (molecular weight >300,000), trypsin, DNase and MTT reactive {3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide}, cytosine  $\beta$ -D-arabino-furanoside, catalase, xanthine, xanthine oxidase, glucose, glucose oxidase, superoxide dismutase Cu/Zn, DMSO, histidine, toluidine blue, rose bengal and ionomycin were from SIGMA (St. Louis, MO).

### Cerebellar granule neurons cultures

Cerebellar granule neurons cultures (CGC) were prepared as previously described (28). Briefly, cells suspensions dissociated from 8-day-old rat cerebellum were plated at a density of  $265 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> in plastic dishes previously coated with poly-L-lysine (5  $\mu$ g/ml) over coverslips or plastic dishes. The culture medium contained basal Eagle's medium supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum, 2 mM glutamine, 25 mM KCl, 50 U/ml penicillin, and 50  $\mu$ g/ml streptomycin. The cultures dishes were incubated at 37°C in a humidified 5%CO<sub>2</sub>/95% air atmosphere. To avoid non-neuronal cells, cytosine arabinoside (10  $\mu$ M) was added 20 hours after seeding. CGN cultures contained approximately 95% neurons. Cells were maintained for 7-8 days *in vitro* (DIV).

### Induction of oxidative stress by superoxide anion, hydrogen peroxide and singlet oxygen formation

After 7-8 DIV cells were subject to different protocols to induce different ROS. Superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) formation was achieved by preincubating neurons with 100  $\mu$ M xanthine (X) for one hour and then xanthine oxidase (XO) at different concentrations (10-100 mU/ml) and catalase (C) (10 U/ml) was added in order to prevent hydrogen peroxide formation (19, 29, 22). Hydrogen peroxide formation (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) was induced by incubating neurons with 6 mM glucose and after one hour glucose oxidase (GO 1-100 U/ml) was added (30, 31). The formation of singlet oxygen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) was obtained by treating neurons with Rose Bengal (RB)

(1-20  $\mu$ M) or toluidine blue (TB) (1-30  $\mu$ M) and then cultures were illuminated for different periods of time (11). All preincubations were carried out for 60 min before addition of XO, GO or luminic stimuli. A broadband visible power light was used at 2 mJ/cm<sup>2</sup>/sec. Wavelengths were 514 nm for RB and 645 nm for TB. When cells were perfused, experiments were made in a Krebs buffer [CaCl<sub>2</sub>, 1.8 mM, MgCl<sub>2</sub>, 0.8 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.8 mM, Glucose, 5.5 mM, HEPES, 10 mM, NaCHO<sub>3</sub>, 3 mM, NaCl, 125 mM and KCl, 25 mM] with or without the mentioned treatments.

### Cell viability

Cell viability was estimated as MTT transformation at different times after treatment of cells. MTT (0.5 mg/ml) was added to the CGC and incubated for 15 min in Kreb's solution at 37°C. After incubation for 15 min at room temperature in darkness, formazan blue formed from MTT was extracted with 100% DMSO and quantified spectroscopically at 560 nm excitation wavelength. As previously shown (32, 1), there was a very good correspondence between the ability of cultures to transform MTT and the content of protein and DNA and the number of neurons that appear intact by phase-contrast microscopy. In addition, we have also found a good lineal correlation (0.965 of R<sup>2</sup>) between MTT and fluorescein diacetate (FDA) incorporation assays (13). Based on these findings we considered MTT assay a reliable method to evaluate cell survival in this preparation.

### Nuclear condensation

Cells plated on coverslips at a density of  $265 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> were cultured for 8 DIV and then were treated to induce ROS. After 6 hours of treatment, cells were incubated with 0.01% Hoechst 33258 in PBS for 10 min, then fixed in 4% fresh paraformaldehyde at 4°C for 30 min and mounted with methanol-glycerol 1:1 v/v. Cultures were examined with an epifluorescence microscope (Nikon) using a UV BA-2 filter and a barrier filter of 520 nm with a 340 nm excitation and 460 nm emission wavelengths.

### Intracellular calcium measurements

CGC intracellular calcium ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) was quantified using the fluorescent calcium indicator fura-2/AM, as previously described (1, 33). Briefly, cells grown on coverslips for 7-8 DIV were incubated with 5  $\mu$ M fura-2/AM and 0.02% pluronic F-127 for 1 h in cultured medium and washed twice. The coverslips were placed on a perfusion chamber and perfused with a medium containing the prooxidant treatments. Measurements of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> were carried out using a luminescence spectrometer (Spectronic Instruments, SLM Aminco-Bowman, Rochester, NY). The system

TESIS COM  
FALLA DE ORIGEN

allows real-time simultaneous acquisition of fluorescence measurements of cellular population.  $[Ca^{2+}]_i$  was calculated from the ratio (R) of 340 nm to 380 nm excitation wavelength, using the following formula:  $[Ca^{2+}]_i = b Kd (R-R_{min}) / (R_{max}-R)$ ; where Kd is the dissociation constant of fura-2/AM; b is the ratio of fluorescent signals at 380 nm for  $Ca^{2+}$ -free and  $Ca^{2+}$ -saturated dye;  $R_{min}$  is R in the absence of external  $Ca^{2+}$ ;  $R_{max}$  is R in saturating  $[Ca^{2+}]_i$ . These parameters were determined by *in vitro* calibration using EGTA and ionomycin.

#### Caspase activity

After 1-6 h of treatment with prooxidants, CGC were washed with PBS and homogenized in a standard buffer [100 mM HEPES; 10% (w/v) sucrose; 0.1% (w/v) CHAPS; 10 mM DTT; 1 mM EDTA; 1 mM PMSF; 1 mM NaF; 2 µg/ml aprotinin; 1 µg/ml pepstatin; and 5 µg/ml leupeptin]. Caspase activities were assayed by a fluorogenic technique (34) in a luminescence spectrometer (Spectronic Instruments, SLM Aminco-Bowman, Rochester, NY), using preferring substrates for each caspase. Ac-DEVD-AMC, Ac-YVAD-AMC, Ac-IETD-AMC and Ac-LEHD-AMC were used as substrate for caspase-3, caspase-1, caspase-8 and caspase-9 activities, respectively. Caspases activities were followed 20 min after addition of substrate (25 µM) and cell homogenate (60-90 µg/ml) in a standard solution. Results indicating caspase activity was expressed as the change in fluorescence intensity/hour/mg protein.

#### Immunofluorescence

The activation of caspase-3 was also measured by immunofluorescence using a specific antibody against the active fragment of caspase-3 (p19) (Cell Signaling Technology, Beverly, MA). Briefly, cell were washed twice with PBS and fixed in 4% freshly paraformaldehyde 4°C for 1 hour. Cells were washed three times 5 min with TTBS (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM and Tween 0.1%). Cells were incubated 1 h in blocking buffer (TTBS, fetal calf serum 5% and BSA 3%) and then incubated overnight with the primary antibody (1:100) in TBS supplemented with BSA 5%. After washing three times with TTBS for 5 min, cells were incubated with the secondary antibody (1:1000) [FITC-conjugated Goat Anti-Rabbit IgG, Jackson ImmunoResearch Lab Inc.]. Cell were washed and mounted. Cells were visualized in an epifluorescence microscope (Nikon) with fluorescence objective and filter (Nikon, B-2A filter and barrier filter of 520 nm using a 480 nm excitation and 510 nm emission wavelengths).

#### Translocation of Phosphatidylserine (PS)

Cells were plated on coverslips at a density of  $265 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> and incubated for 8 DIV. Cultures were incubated for different times in a medium with prooxidants and then cells were incubated for 15 min with Annexin-V-fluorescein (20 µg/ml) and propidium iodide (50 µg/ml). Cells were washed with PBS, fixed in 4% paraformaldehyde and mounted with methanol-glycerol 1:1 v/v. Cells were observed under epifluorescence microscopy equipped as described for immunofluorescence studies. Results are expressed as arbitrary units of fluorescence intensity.

#### Measurements of ROS

Cells plated on coverslips were cultured for 8 DIV and then incubated for 30 min with Mito Tracker Red (10 µg/ml), DHR-123 or H<sub>2</sub>DCF<sub>2</sub> (2 mg/ml) (13). The non-fluorescent DHR-123 and Mito Tracker Red are sequestered and oxidized by mitochondria and then converted into fluorescent compounds. H<sub>2</sub>DCF<sub>2</sub> is a non-fluorescent cytoplasmic dye that becomes fluorescent when it is oxidized. After incubation, cells were washed with Krebs's medium and the coverslips were mounted in a perfusion chamber with an angle of 50° respect to light source. Fluorescence was detected spectrofluorometrically (Spectronic Instruments, SLM Aminco-Bowman, Rochester, NY) using a 488 nm excitation and 530 nm emission wavelengths for Mito Tracker Red dye or 488 nm excitation and 515 nm emission for both DHR123 and H<sub>2</sub>DCF<sub>2</sub>. Results are expressed as absolute changes of fluorescence.

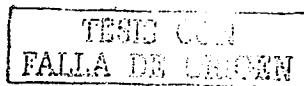
#### Statistical analysis

Data were expressed as means ± SDs, and statistical significance of the results was determined by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Fisher's test post-hoc, with statistical significance set at  $P < 0.05$ .

## RESULTS

#### Neuronal death induced by singlet oxygen, superoxide anion and hydrogen peroxide

When cultures were incubated under different conditions to induce oxidative stress (XXC, GO and RB) most of the neurons showed marked cell damage after 6 hours of treatment (figure 1). Morphological analysis under light microscopy observation showed that the GO condition (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation) induced a more severe neuronal damage than XXC and RB treatments (O<sub>2</sub><sup>-</sup> and O<sub>2</sub> formation, respectively) in which it could still be



possible to identify some processes and cell bodies after this time (figure 1).

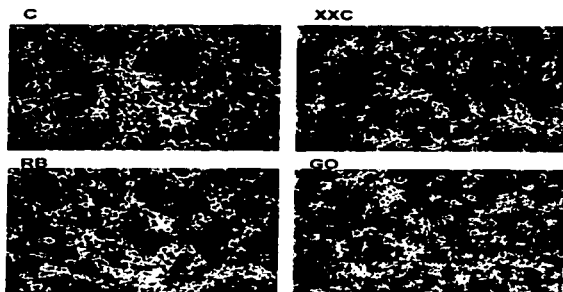


Figure 1. Effect of ROS in the morphology of CGC. Cells were cultured by 7 DIV, treated with the prooxidant conditions for 6 h and then observed in a phase contrast microscope, as detailed in Methods. Control cells maintained in K25 medium, treated cells with xanthine/xanthine oxidase/catalase (100 $\mu$ M, 45 mU/ml and 1 U/ml respectively, XXC), treated cells with Rose Bengal plus light (250  $\mu$ M, RB) and treated cells with glucose/glucose oxidase (6 mM and 100 mU/ml, GO). Scale bar = 20  $\mu$ m.

Figure 2A shows the concentration dependence of treatments on cell viability measured as MTT transformation. Cultures incubated with a condition leading to  $O_2^{\cdot -}$ , that is xanthine 100  $\mu$ M plus xanthine oxidase at different concentrations (10, 45 and 100 mU/ml) plus catalase (1 U/ml), showed a 21%, 45% and 88% of cell death respectively at 6 h after treatment (figure 2A). Other cultures were treated during 6 h with 6mM glucose plus glucose oxidase at different concentrations (10, 50 and 100 mU/ml) to induce  $H_2O_2$  formation. Under these conditions it was detected a cell death of 7%, 4% and 71%, respectively (figure 2A). Cells treated with Rose Bengal for 6 h at different concentrations (5, 20 and 50  $\mu$ M) and illuminated with visible light (2 mJ/cm<sup>2</sup>/sec for 20 min), a condition that generates singlet oxygen, showed neuronal death of about 0%, 58% and 93%, respectively (figure 2A).

The time course of CGC death induced by the 3 different treatments is shown in figure 2B. The incubation of CGC with GO shows a different time course as compared to XXC and RB treatment, which induce a 50% death after 5.5 h and 6.5 h,

respectively. GO treatment reduces cell viability to 50% after 2.5 h (figure 2B).

The effect of antioxidants was tested on the different experimental protocols to exclude other conditions than ROS formation induced by the experimental conditions (figure 2C). Cells were incubated simultaneously with the ROS formation conditions and the antioxidants and cell viability was evaluated after 6 h. Any of the antioxidants induced affected cell viability in control cells (figure 2C). Under these conditions, GO treated cells were markedly protected in the presence of catalase (10 U/ml) (CA), a condition that reduces  $H_2O_2$  formation. Similarly, two antioxidants that decrease  $O_2^{\cdot -}$  and  $^1O_2$  levels, superoxide dismutase (10 U/ml) (SOD) and histidine (1mM) (His), markedly reduced cell death induced by XXC and RB, respectively (figure 2C). An antioxidant cocktail containing 1% DMSO, SOD, CA and His at the same concentrations completely protected CGC from cell death in all experimental conditions (XXC, GO and RB) (figure 2C).

To confirm that the experimental conditions used in this study lead to ROS production, we evaluated the generation of ROS by means of three different fluorescent probes sensitive to oxidation in CGC treated with XXC, RB and GO for 2 hours. DHR123 and Mito tracker red was used to detect mitochondrial ROS and  $H_2DCFDA$  to detect cytosolic ROS. As shown in figure 2D all three probes were increased by the three protocols. The increase in fluorescence signal was bigger in GO treated cells than in XXC and RB treated neurons.

#### **Nuclear condensation and phosphatidylserine translocation induced by ROS**

Nuclear morphology of cells treated with different experimental conditions was analyzed by using the fluorescent Hoechst dye. Figure 3B shows treatments with all the experimental conditions (RB, GO and XXC). Control cells showed homogeneously stained and clear nuclei with regular (figure 3A). In contrast, GO, XXC and RB treated CGC, showed different nuclei morphology depending on the treatments: XXC and RB produced an increase in the number of condensed nuclei of 60%-70% showing fragmentation and a marked reduction in size (figure 3A,B), while in GO treated cells the total number of nuclei were affected, but condensation and size reduction was much less marked and no fragmentation was observed (figure 3A,B).

TESIS C.O.I  
FALLA DE ORIGEN

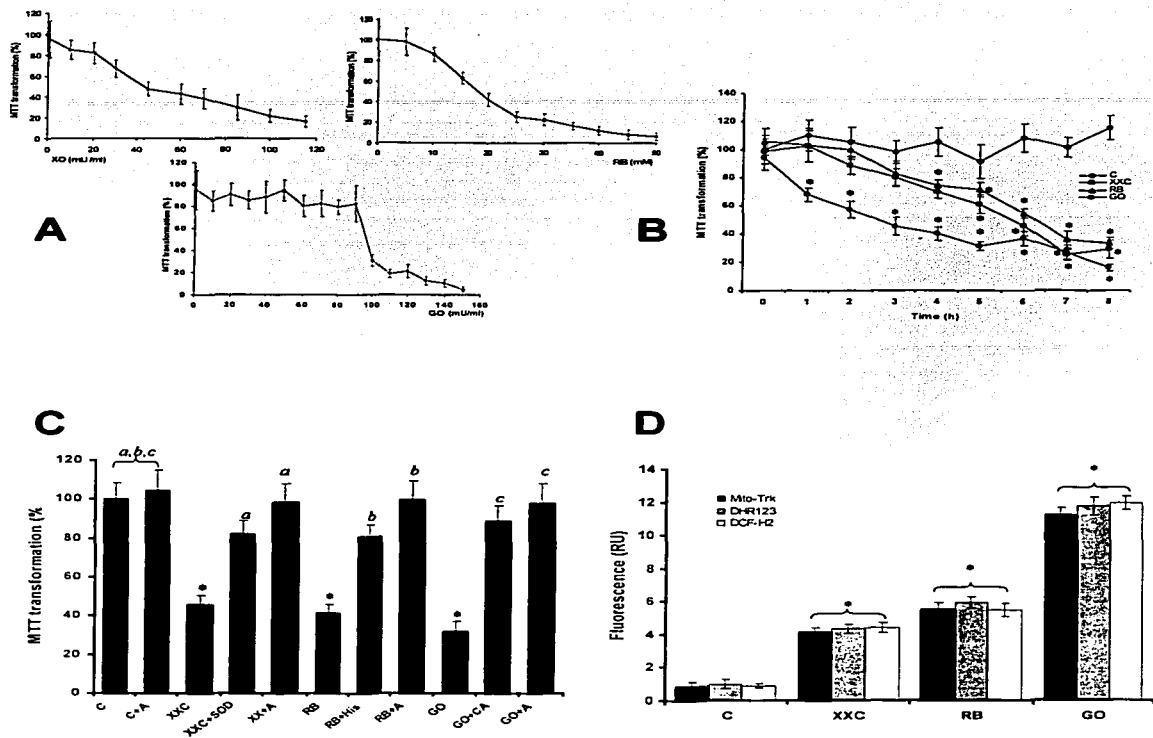


Figure 2. Effect of XXC, GO and RB treatments on ROS production and CGC viability. Cells were cultured by 7 DIV and treated for 6 h with xanthine/xanthine oxidase/catalase (XXC), glucose/glucose oxidase (GO) or 20 min with Rose Bengal plus light (RB) to induce superoxide anion, hydrogen peroxide and singlet oxygen formation, respectively. MTT transformation (A-C) or ROS formation (D) were evaluated as detailed in Methods. A. Concentration curve for XO, RB and GO and cell viability measured after 6 h. B. Time course of cell viability of CGC treated for 6 h with XXC (45 mU/ml of xanthine oxidase, 100  $\mu$ M of xanthine and 1 mU/ml of catalase), GO (100 mU/ml of glucose oxidase and 6 mM of glucose) and RB (20 mM and 2 mJ/cm<sup>2</sup>/sec during 20 min of visible light exposure). C. Effect of antioxidants on CGC viability after ROS formation. CA, catalase (1 U/ml); SOD, superoxide dismutase (SOD 10 U/ml); His, histidine (1mM); antioxidant cocktail called A (DMSO 1%, SO 10 U/ml, catalase 1 U/ml and His 1 mM). D. ROS formation in CGC treated with XXC, RB and GO for 2 h was evaluated with DHR123, Mito tracker red and H<sub>2</sub>DCFDA. Data are means  $\pm$  SD. <sup>a, b, c</sup>, significantly different from GO, XXC, RB and C, respectively. n = 5 in A, C and D and n = 6 in B. (P < 0.05).

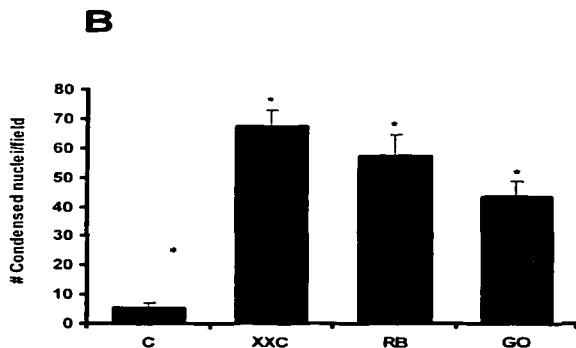
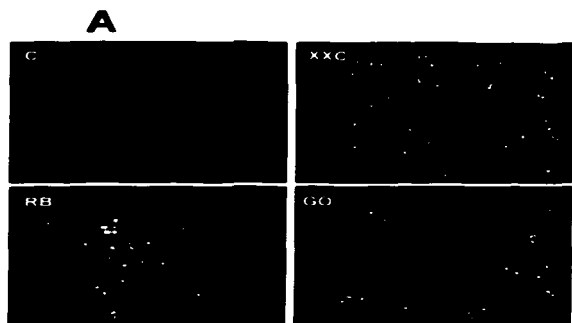


Figure 3. Effect of ROS on nuclear condensation of CGC. Cells cultured by 7 DIV were treated for 6 h with XXC, GO or RB and then incubated with Hoechst as detailed in Methods. *A*, micrographs of CGC under XXC, RB and GO treatments obtained with an epifluorescence microscope. *B* determination of the condensed nuclei in XXC, RB or GO treated cells. Values were obtained by counting condensed nuclei per field of five different fields in each experiment. Data are means of condensed nuclei per field  $\pm$  SD of 6 independent experiments. \* significantly different from control ( $P < 0.05$ ).

Although, under these conditions, CGC death is detected at this time, no typical nuclear condensation is visible.

Figure 4A shows phosphatidylserine (PS) translocation measured as FITC-annexin-V staining in combination with propidium iodide (PI) to detect membrane disruption. Control cells showed a low level of annexin and practically no PI labeling (inset). When cells were treated for 1 h with XXC, RB or GO a significant positive label for annexin-V was observed in all cases; however, PI labeling was

observed only with GO (figure 4A, insets), suggesting false-positive labels for annexin-V.

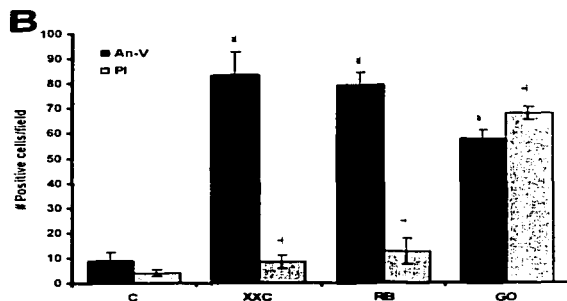
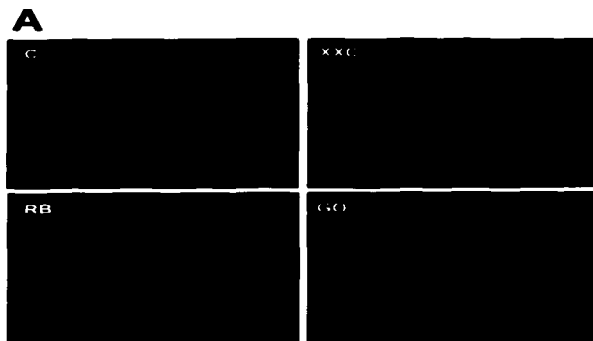


Figure 4. Effect of ROS on phosphatidylserine translocation in CGC. Cells cultured by 7 DIV were treated for 6 h with XXC, GO or RB and then incubated with Annexin-V (An-V) and propidium iodide (PI) as detailed in Methods. *A*, micrographs of CGC stained with An-V (green). Insets, PI staining (red). *B*, determinations of PS translocation and plasmatic membranal damage measured as PI positive labeling. Data were obtained by counting positive cells for An-V and PI of five different fields for each experiment. Data are means of positive cells for each dye  $\pm$  SD of 8 independent experiments. \* significantly different from control for An-V and PI respectively (0.05).

### Caspase activation by ROS

The involvement of caspases in the process of neuronal death induced by ROS was evaluated by different protocols. Cultures of CGN were treated for immunofluorescence for the active fragment of caspase-3, as described in Methods. Figure 5 shows the immunodetection of p19 at different times after treatments with GO, XXC or RB in CGN. Control cultures revealed a basal level of fluorescent cells. Similarly, no labeling was detected in cultures treated with GO after 1 and 2 h of treatment (figure 5). In contrast, XXC treated cells showed an increase in positive cells that was maximal after 2 hours (figure 5) and it decline 3 h after treatment (data not shown). RB also induced a marked increase in the number of positive cells, however, the fluorescence was present from early times (1h) and remained present after 3 h of treatments.

These results correlate well with caspase-3 activity measured fluorogenically (figure 6). The time course of caspase-3 activity shows that CGC treated with GO is not increased during the first 6 hours of treatment. We could even detect an unexpected and significant reduction of caspase-3 activity in GO treated cells (figure 6A). On the other hand, both XXC and RB treatment induced a significant activation of this caspase with a maximal activity achieved at 2 h of about 80%-100% as compared to control cells (figure 6A).

We further confirmed that the observed increase in caspase-3 activation by XXC and RB was due to ROS formation. Figure 6B shows that the presence of SOD completely abolishes caspase-3 activation induced by XXC treatment. Similarly, His was able to completely reduce the increase of the activity of this caspase promoted by RB treatment (figure 6B). The above mentioned decrease of caspase-3 activity by GO was also prevented with catalase (figure 6B) suggesting a possible action of  $H_2O_2$  on caspase-3.

The activity of other caspases in CGC treated with GO, XXC or RB is shown in figure 7. The activity of caspase-1, -8 and -9, was measured by using YVAD, IETD and LHED as substrates. Caspase-9 did not show any significant activation by XXC or RB at

any time (figure 7A). In the case of GO the activity of caspase-9 was even reduced as compare to control conditions (figure 7A).

Caspase-8 and caspase-1 showed a significant activation in cells treated with XXC. The activation followed a time course similar to that for caspase-3, with a maximal activity after 2 h of treatment (figure 7B,C). RB also induced the activation of both caspase-1 and -8; however, although the time course is similar to that observed for XXC, the magnitude of this activation was less marked (figure 7B,C). GO induced a significant, but small activation of both caspase-8 and -1 only at 1 hour of treatment. No significant difference was found for any of these two caspases after this time (figure 7B,C).

### Calcium levels and cell death

Cells treated with either RB or TB (Toluidin blue) showed a marked reduction of  $[Ca^{2+}]_i$  by 60-75% during the first 2-5 h of treatment (figure 8A). XXC treatment also induced a marked reduction of  $[Ca^{2+}]_i$  by 60% and 30% after 2 and 5 h of treatment, respectively (figure 8A). In contrast, no differences were found in  $[Ca^{2+}]_i$  of cells treated with GO after 2-5 h (figure 8A).

To explore whether the observed decrease in  $[Ca^{2+}]_i$  induced by XXC and RB could be related to CGC survival we used calcium ionophore ionomycin known to modify  $[Ca^{2+}]_i$ . When cultures are treated with either XXC or RB a partial but significant rescue of cell death is observed when cells are simultaneously incubated with ionomycin only at a concentration of 1  $\mu M$  (figure 8B). Higher concentrations of ionomycin evoke a reduction of cell viability and lower concentration did not exert any effect in both control and treated cells (figure 8B).

Cell viability was also evaluated by testing the effect of NMDA receptor activation, a condition known to increase  $[Ca^{2+}]_i$  in this preparation (32, 35). Table 1 show that the presence of 150  $\mu M$  NMDA significantly increase cell survival by 50% only when cells were treated with XXC or RB. In contrast, NMDA did not modify the CGC viability in cells treated with GO for 6 h (table 1).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

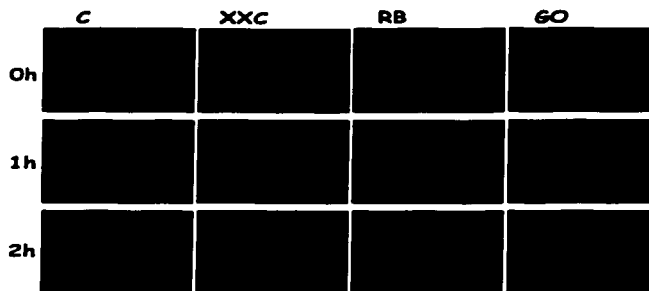


Figure 5. Effect of ROS on caspase-3 fragmentation in CGC. Cells cultured by 7 DIV were treated for 0-2 h with XXC, GO or RB and then treated for immunofluorescence to detect the caspase-3 active fragment (p-19) as detailed in Methods. Photographs were obtained in an epifluorescence microscope with a 20x oil immersion fluorescence objective and a Nikon fluorescence filter B-2A.

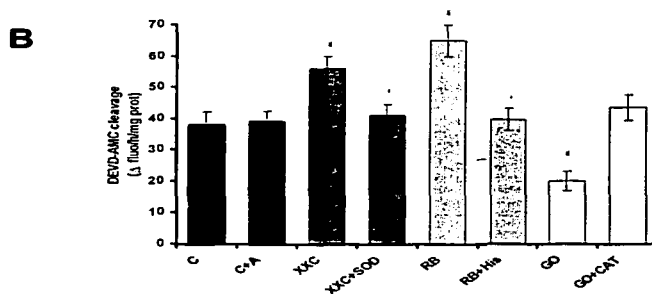
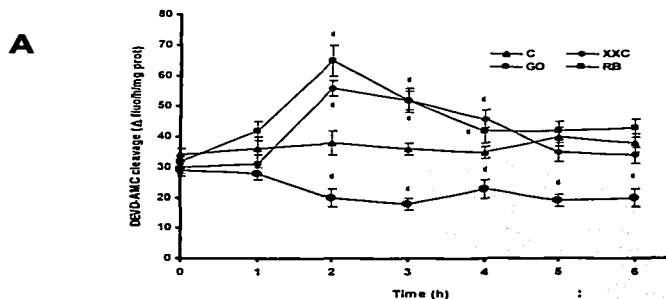


Figure 6. Effect of ROS in caspase-3 activity in CGC. Cells cultured by 7 DIV were treated for 0-6 h with XXC, RB or GO and then cell homogenates were incubated with the caspase-3 substrate (DEVD-AMC) as detailed in Methods. A, time course of caspase-3 activity in CGC treated with the prooxidant conditions. B, effect of antioxidants on the caspase-3 activity after 2h of treatment. Antioxidants were added simultaneously to the treatments. SOD, superoxide dismutase (10 U/ml); CAT, catalase (1 U/ml); His, histidine (1mM); A, antioxidants cocktail (DMSO 1%, SOD 10 U/ml, CAT 1 U/ml and His 1 mM). a, b, c significantly different from control. Values are means  $\pm$  SD of 5 independent experiments ( $P < 0.05$ ).

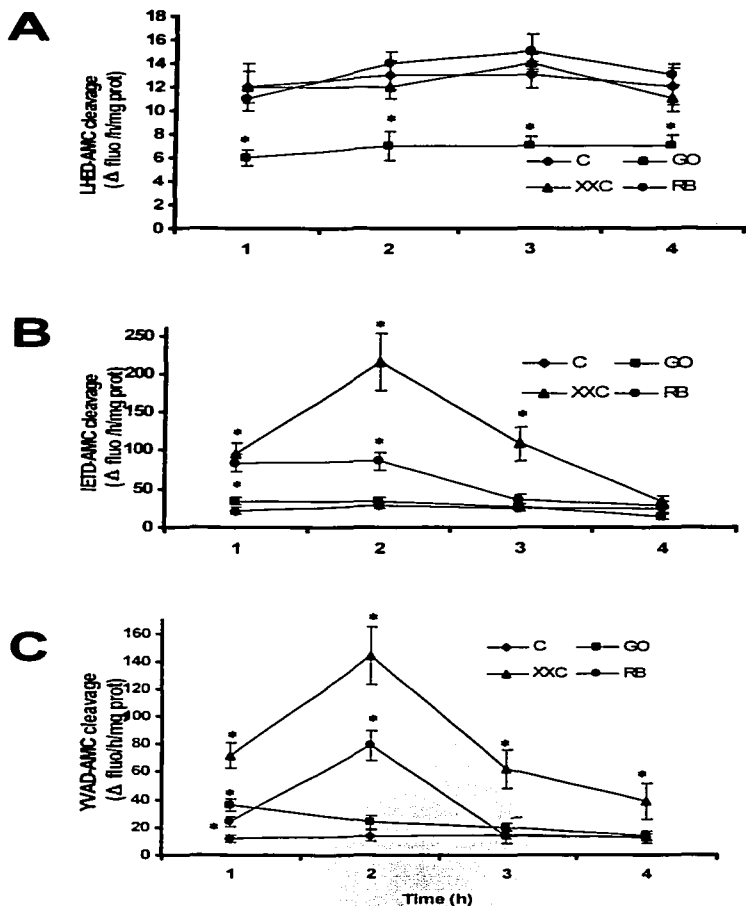


Figure 7. Effect of ROS on caspase-1, -8 and -9 activities in CGC. Cells cultured by 7 DIV were treated for 1-4 h with XXC, GO or RB and then cell homogenates were incubated with the caspase-1, -8 or -9 substrates (YVAD-AMC, IETD-AMC and LHED-AMC, respectively) as detailed in Methods. Time course of caspase-9 (A), caspase-8 (B) and caspase-1 (C) activities. \* significantly different from control at the same times. ANOVA analysis with  $P < 0.05$ .  $n = 4$ .

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Data are means  $\pm$  SEM of 5 experiments. \* Significantly different from control,  $P < 0.05$ .

## DISCUSSION

In the present study we used different protocols to produce specific ROS in cultured CGC. The combination of xanthine with xanthine oxidase plus catalase was utilized to generate superoxide anion ( $O_2^{\cdot -}$ ) (15, 22, 29), glucose oxidase in the presence of glucose led to hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) (30, 31) and the illumination of Rose Bengal induced the formation of singlet oxygen ( $^1O_2$ ) (11). In our work we showed that with the use of these treatments there exists an increase in ROS production, which were detected by 3 different oxidizing-sensitive fluorophores. The effect of  $H_2O_2$  on cultured neurons has been studied by adding this ROS directly to the culture medium (10) or by the use of the combined treatment of glucose and glucose oxidase to produce  $H_2O_2$  (30, 31). This last procedure induces the continuous production of small amounts of  $H_2O_2$  that can be regulated by controlling the activity of the enzyme and the substrate concentration. It has been suggested that this model results more similar to physiological and some pathological conditions leading to ROS formation. Some other pathological conditions, however, could involve a sudden increase in the ROS levels within a short period of time. This could be the case for the direct treatment with  $H_2O_2$ . In this paper we found that both experimental procedures to increase  $H_2O_2$  induced similar effect, at least in two of the parameters evaluated, MTT transformation and activity of caspase-3. Thus, most of the studies were carried by using the enzymatic protocol to produce  $H_2O_2$ .

In a previous study (13), we demonstrated the role of oxidative stress in the apoptotic death of CGC induced by potassium deprivation. The use of the present experimental paradigm was due to the interest to elucidate the specific participation of particular ROS like  $O_2^{\cdot -}$ ,  $^1O_2$  and  $H_2O_2$  in the process of cerebellar granule neurons death. Several studies have suggested that apoptotic or necrotic neuronal death evoked by external stimuli is accompanied by free radicals and ROS formation. (12, 13, 25, 36, 37, 38). In other studies, it is proposed that apoptotic neuronal death can be induced by direct ROS formation in culture (6, 7, 8, 9, 10, 14, 17, 22, 39). In agreement with these studies, in this work we found that  $O_2^{\cdot -}$ ,  $^1O_2$  and  $H_2O_2$  directly induced cell death in cultures of cerebellar granule neurons. Also, we further showed that particular antioxidants like SOD for XXC treatment, catalase for GO treatments and histidine for RB treatment, completely prevented all the observed changes induced by these conditions, including the apoptotic parameters evaluated as well as neuronal death.

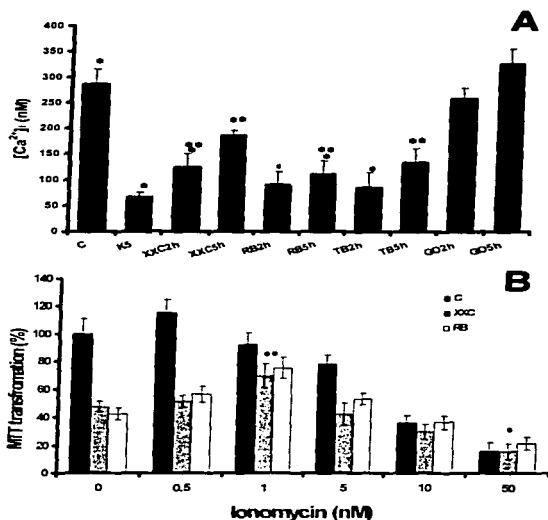


Figure 8. Effect of ROS and ionomycin in intracellular calcium levels and CGC viability. Cells cultured by 7 DIV were treated for 2-6 h with XXC, GO, RB and/or ionomycin and then intracellular calcium (A) or MTT transformation was measured as detailed in Methods. A, cells were loaded with FURA-2AM and intracellular calcium was measured after 2 or 5 h of XXC, GO and RB treatment. K5, cells transferred to a medium containing KCl 5 mM; TB, toluidine blue. \*, \*\* are significantly different from control and K5 conditions, respectively. B, cell viability of CGC treated 6h with the prooxidant conditions and the indicated concentrations of ionomycin. \*, \*\* significantly different to control, XXC and RB, respectively ( $P < 0.05$ ). Results are means  $\pm$  SD of 5 separated experiments.

Table 1. Effect of NMDA on cell viability of CGC treated with prooxidant conditions

	Control	+NMDA
K25	100 $\pm$ 12.1	103 $\pm$ 9.8
XXC	42.4 $\pm$ 5.3	59.3 $\pm$ 4.2*
GO	32.8 $\pm$ 4.9	35.2 $\pm$ 3.6
RB	45.6 $\pm$ 6.1	67.7 $\pm$ 5.4*

CGC were cultured 7 DIV and then treated with prooxidant conditions during 6h with or without 150  $\mu$ M NMDA. Cell viability was evaluated as MTT transformation as detailed in Methods

Thus, suggesting that the observed events induced by these treatments were directly related to the generation of an oxidative stress.

According to the experimental evidences obtained in the present study we could suggest that, depending on the nature of the ROS generated, there are at least two different mechanisms involved in the CGC death. The formation of  $H_2O_2$  seems to induce a necrotic-like cell death, while both  $O_2^{\cdot-}$ ,  $^1O_2$  would evoke a neuronal death with apoptotic features.

In GO treated neurons it was observed a marked membranal damage evidenced by the incorporation of propidium iodide, suggesting a necrotic-like neuronal death. In addition, two apoptotic parameters (40), phosphatidylserine translocation and caspase-3 and -8 activation, were absent in CGC treated with GO. In addition, this treatment induced changes in nuclear morphology, including a partial condensation and nuclear size reduction and a lack of fragmentation, which is different from the typical apoptotic nuclei. These results are in agreement with a recent study in PC12 cells (25), where  $H_2O_2$  can induce either necrotic or apoptotic death depending on  $H_2O_2$  concentrations, suggesting that the observed nuclear condensation showing atypical features could not be considered a good marker for apoptotic process.

As mentioned above, superoxide anion and singlet oxygen formation in CGC seem to induce apoptotic-like neuronal death. This suggestion is based on the observed apoptotic characteristics showed by cells under these conditions such as significant phosphatidylserine translocation together with the preservation of the plasmatic membrane integrity. Also, in contrast to the action of  $H_2O_2$ , the presence of  $O_2^{\cdot-}$  and  $^1O_2$  in CGC induced a marked activation of both initiator and effector caspases, like caspases -8, -1 and caspase-3, respectively. The activation of both caspase-1 and caspase-8 was higher in the superoxide anion than in the presence of singlet oxygen, which could imply a direct action of the  $O_2^{\cdot-}$  rather than  $^1O_2$ , which could be exerting its effect through the conversion to the superoxide anion; however, no experimental evidence exists to support such proposal.

The role of calcium was also explored in this model of cell death. On one hand, it was clear that calcium levels were modified depending on the protocol used to induce the formation of ROS. The condition leading to the necrotic-like death, i.e.  $H_2O_2$ , did not modified the basal levels of calcium concentration, while  $O_2^{\cdot-}$ ,  $^1O_2$ , that seem to induce apoptosis, markedly reduced the concentration of calcium to levels close to those attained when cells are transferred to a K5 medium, a condition leading to apoptotic death (32, 35). On the other hand, cell

death induced by  $O_2^{\cdot-}$  and  $^1O_2$  was partially reduced by increasing calcium levels by means of two protocols involving different calcium entry pathways. Based on these results and those obtained with ionomycin we could suggest that a low calcium and superoxide formation are necessary but not enough to activate the program of apoptotic cell death. However, the partial effect of NMDA on the rescue of CGC from death induced by  $O_2^{\cdot-}$  and  $^1O_2$  also suggests that there is an important calcium-independent component in the action of these particular ROS.

It is well known that in cultured cerebellar granule cells potassium deprivation induces a decrease in intracellular calcium levels that seems to trigger an apoptotic cell death process (35). In a previous study we suggested that apoptotic neuronal death induced by potassium deprivation also involves ROS generation, particularly superoxide anion (13). During this episode of neuronal death also occur a PS translocation, a nuclear condensation and the activation of initiator and effector caspases (13). In this regard, we and others (12, Valencia and Morán, in preparation) have suggested that the enzymatic complex NADPH-oxidase play a key role in the apoptotic death of CGC by the production of superoxide anion. Here, we demonstrated that this particular ROS could lead to the expression of apoptotic features in CGC in a similar way than potassium deprivation.

**Acknowledgements.** We acknowledge the technical assistance of Ms. Guadalupe Dominguez. We also thank Dr. José Rodríguez, Mr. Xavier Xifró and Mr. Alfredo Miñano from the Autonomous University of Barcelona, Spain for their technical support. This research was supported by grants 36235-N from CONACyT and IN203400 from DGAPA-UNAM. A.V. is supported by a CONACyT fellowship.

## REFERENCES

1. Morán J, Itoh T, Reddy U, Chen M, Alnemri E and Pleasure D. 1999. Caspase-3 expression by cerebellar granule neurons is regulated by calcium and cyclic AMP. *J Neurochem.* 73: 568-577.
2. Nardi N, Avidan G, Daily D, Zilkha-Falb R and Barzilai A. 1997. Biochemical and temporal analysis of events associated with apoptosis induced by lowering the extracellular potassium concentration in mouse cerebellar granule neurons. *J Neurochem.* 68: 750-759.
3. D'Mello SR, Galli C, Ciotti T and 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 USA.* 90: 10989-10993.

TESIS COM  
FALLA DE JULIEN

4. D'Mello SR, Borodetz K and Soltoff P. 1997. Insulin-like growth factor and potassium depolarization maintain neuronal survival by distinct pathways: possible involvement of PI3-kinase in IGF-1 signaling. *J Neurosci*. 17: 1548-1560.
5. Nicholls DG and Budd SL. 2000. Mitochondrial and neuronal survival. *Physiol Rev*. 1: 315-360.
6. Greenlund LJS, Deckwerth TL and Johnson EM 1995. Superoxide dismutase delays neuronal apoptosis: a role for reactive oxygen species in programmed neuronal death. *Neuron*. 14: 303-315.
7. Greenlund LJS, Krosmeier and Johnson EM Jr. 1995b. Role of Bcl-2 in the survival and function of developing and mature sympathetic neurons. *Neuron*. 3: 649-661.
8. Guo Q, Sebastian L, Sopher B, Miller M, Ware C, Martin G and Mattson M. 1999. Increase vulnerability of hippocampal neurons from presenilin-1 mutant knock-in mice to amyloid  $\beta$ -peptide toxicity: central roles of superoxide production and caspase activation. *J Neurochem*. 72: 1019-1029.
9. Ishikawa Y, Satoh T, Enokido Y, Nishio C, Ikeuchi T and Hatanaka H. 1999. Generation of reactive oxygen species, release of L-glutamate and activation of caspases are required for oxygen-induced apoptosis of embryonic hippocampal neurons in culture. *Brain Res*. 824: 71-80.
10. Wei T, Ni Y, Hou J, Chen C, Zhao B and Xin W. 2000. Hydrogen peroxide-induced oxidative damage and apoptosis in cerebellar granule cells: protection by Ginkgo Biloba extract. *Pharmacol Res*. 41: 427-433.
11. Zhuang S, Demirs JT and Kochevar IE. 2000. p38 mitogen-activated protein kinase mediates bid cleavage, mitochondrial dysfunction induced by singlet oxygen but not by hydrogen peroxide. *J Biol Chem*. 275:25939-25948.
12. Tammariello S, Quinn M and Estus S. 2000. NADPH oxidase contributes directly to oxidative stress and apoptosis in nerve growth factor-deprived sympathetic neurons. *J Neurosci*. 20: 1-5.
13. Valencia A and Morán J. 2001. Role of oxidative stress in the apoptotic cell death of cultured cerebellar granule neurons. *J Neurosci Res*. 64: 284-297.
14. Sée V and Loeffler JP. 2001. Oxidative stress induces neuronal death by recruiting a proteases and phosphatase-gated mechanism. *J Biol Chem*. 276: 35049-35059.
15. Satoh T, Numakawa T, Abiru Y, Yamagata T, Ishikawa Y, Enokido Y and Hatanaka H. 1998. Production of reactive oxygen species and release of L-glutamate during superoxide anion-induced cell death of cerebellar granule neurons. *J Neurochem*. 70: 316-324.
16. Patel M, Day BJ, Crapo JD, Fridovich I and McNamara JO. 1996. Requirement for superoxide in excitotoxic cell death. *Neuron*. 16: 345-355.
17. Virág L, Marmor DJ and Szabó C. 1998. Crucial role of apopain in the peroxynitrite-induced apoptotic DNA fragmentation. *Free Rad Biol Med*. 25: 1075-1082.
18. Zhuang S, Lynch MC and Kochevar IE. 1998. Activation of protein kinase C is required for protection of cells against apoptosis induced by singlet oxygen. *FEBS Lett*. 437: 158-162.
19. Salet C, Moreno G, Ricchelli F and Bernardi P. 1997. Singlet oxygen produced by photodynamic action causes inactivation of the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem*. 272: 21938-21943.
20. Moreno G, Possini K, Ricchelli F and Salet C. 2001. The effect of singlet oxygen produced by photodynamic action on the mitochondrial permeability transition differ in accordance with the localization of the sensitizer. *Arch Biochem Biophys*. 386: 243-250.
21. Manev H, Cagnoli CM, Atabay C, Kharlamov E, Ikonomic MD and Grayson DR. 1995. Neuronal apoptosis in an *in vitro* model of photochemically induced oxidative stress. *Exp Neurol*. 133: 198-206.
22. Englert RP and Shacter E. 2002. Distinct modes of cell death induced by different reactive oxygen species: amino acyl chloramines mediate hypochlorous acid-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 277(23):20518-26.
23. Samali A, Nordgren H, Zhivotovsky B, Peterson E and Orrenius S. 1999. A comparative study of apoptosis and necrosis in HepG2 cells: oxidant-induced caspase inactivation leads to necrosis. *Biochem Biophys Res*. 255: 6-11.
24. Kruman I and Mattson M. 1999. Pivotal role of mitochondrial calcium uptake in neuronal cell apoptosis and necrosis. *J Neurochem*. 72: 529-540.
25. Cole KK and Perez-Polo JR. 2002. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition prevents both apoptotic-like delayed neuronal death and necrosis after H(2)O(2) injury. *J Neurochem*. 82(1):19-29.
26. Kim SH, Won SJ, Sohn S, Kwon HJ, Lee JY, Park Jh, Gwag BJ. 2002. Brain-derived neurotrophic factor can act as a proneurotrophic factor through transcriptional and translational activation of NADPH oxidase. *J Cell Biol*. 159: 821-831.
27. Villalba M, Bockaert J and Journot L. 1997a. Concomitant induction of apoptosis and necrosis in cerebellar granule cells following serum and potassium withdrawal. *Neuroreport*. 8: 981-985.

28. Morán J and Patel AJ. 1989. Effect of potassium depolarization on phosphate-activated glutaminase activity in primary cultures of cerebellar granule neurons and astroglial cells during development. *Dev Brain Res.* 46: 97-105.
29. Lacy F, Gouch DA and Schimd-Schönbein G. 1998. Role of Xanthine Oxidase in Hydrogen Peroxide production. *Free Rad Biol Med.* 25(6):720-727.
30. Iglesias-De la Cruz MC, Ruiz-Torres P, Alcami J, Diez-Marques L, Ortega-Velazquez R, Chen S, Rodriguez-Puyol M, Ziyadeh FN, Rodriguez-Puyol D. 2001. Hydrogen peroxide increases extracellular matrix mRNA through TGF-beta in human mesangial cells. *Kidney Int.* 59: 87-95.
31. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. 2000. *Principles of Biochemistry*. Worth Publish. Sec. Edit. NY, USA. Chapter11, pag. 306.
32. Balazs R, Hack N and Jorgensen OS. 1990. Selective stimulation of excitatory amino acid receptor subtypes and the survival of cerebellar granule cells in culture. *Neuroscience.* 37: 251-258.
33. Itoh T, Itoh A, Horiuchi K and Pleasure D. 1998. AMPA receptor-mediated excitotoxicity in human NT2-N neurons results from loss of intracellular  $Ca^{2+}$  homeostasis following marked elevation of intracellular  $Na^+$ . *J Neurochem.* 71: 112-124.
34. Thornberry NA. 1994. Interleukin-1 beta converting enzyme. *Method Enzymol.* 244: 615-631.
35. Balazs R, Jorgensen OS and Hack N. 1988. N-Methyl-D-aspartate promotes the survival of cerebellar granule cells in culture. *Neuroscience.* 27: 437-451.
36. Atlante A, Gagliardi S, Marra E and Calissano P. 1998. Neuronal apoptosis in rats is accompanied by rapid impairment of cellular respiration and is prevented by scavengers of reactive oxygen species. *Neurosci Lett.* 245:127-130.
37. Azbill R, Mu X, Bruce-Keller A, Mattson M and Springer J. 1997. Impaired mitochondrial function, oxidative stress and altered antioxidant enzyme activities following traumatic spinal cord injury. *Brain Res.* 765: 283-290.
38. Schulz JB, Weller M and Klockgether T. 1996. Potassium deprivation-induced apoptosis in cerebellar granule neurons: a sequential requirement for new mRNA and protein synthesis, ICE-like protease activity, and reactive oxygen species. *J Neurosci.* 16: 4696-4706.
39. Guo Q, Fu W, Holtsberg W, Steiner S and Mattson M. 1999. Superoxide mediates the cell-death-enhancing action of presinilin-1 mutations. *J Neurosci Res.* 56: 457-470.
40. Fabisiak JP, Tyurin VA, Tyurina YY, Sedlov A, Lazo JS, Kagan VE. 2000. Nitric oxide dissociates lipid oxidation from apoptosis and phosphatidylserine externalization during oxidative stress. *Biochemistry.* 39: 127-138.

TESIS CON  
FALLA DE REGISTRO

## 7. DISCUSIÓN

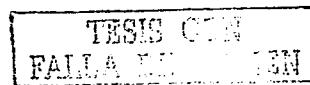
Durante la muerte apoptótica de las neuronas en cultivo se expresan y activan moléculas pro y antiapoptóticas como las caspasas (Gerhardt *et al.*, 2001; Hengartner, 2000; Lockshin *et al.*, 2000; Salvesen *et al.*, 1999; Zhung, *et al.*, 1999) y los miembros de la familia de Bcl-2, entre otras (Hu *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1999; Nuydens *et al.*, 2000). Muchos estudios han sugerido que el estrés oxidativo puede regular este proceso, ya sea en el sistema nervioso central (Halliwell, 1992; Petersén *et al.*, 2000; Sureda *et al.*, 1999), e involucran al anión superóxido y al metabolismo mitocondrial (Arai *et al.*, 1998; Du *et al.*, 1998; Fiskum *et al.*, 1999; Nicholls *et al.*, 2000; Yakes *et al.*, 1997). La formación de EOR induce tanto muerte necrótica como apoptótica que es a través de la mitocondria (Kroemer *et al.*, 1998) en neuronas de hipocampo y en neuronas simpáticas privadas de las señales tróficas (Chang *et al.*, 2002; Mattson *et al.*, 1993). Originalmente se propuso que en modelos neuronales, el estrés oxidativo se asociaba solamente con los procesos isquémicos/hipóxicos. Sin embargo, recientemente se ha demostrado en otros modelos de muerte que se genera una condición prooxidante, como en asociada a diversas patologías como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Huntington (Ceballos-Picot *et al.*, 1997).

En este trabajo demostramos que el estrés oxidativo no sólo es concomitante a la muerte apoptótica, sino que constituye una señal que genera y regula el programa apoptótico en su fase inicial. Durante la muerte neuronal por privación de potasio, el primer cambio es la reducción de  $[Ca^{2+}]_i$  (figura 6, artículo de Valencia y Morán, 2001). Posteriormente ocurren otros procesos tempranos como la translocación de PS y la activación de la caspasa-8 y de la caspasa-3, todos los cuales, salvo la reducción del calcio, se evitan completamente con un tratamiento antioxidante (figuras 7 y 8, artículo de Valencia y Morán, 2001). El estrés oxidativo que ocurre después de la disminución de la concentración del calcio y antes de la translocación de la PS y de la activación de las caspasas, aparece a las cuatro horas de haberse dado el estímulo apoptótico y es un efecto transitorio que dura alrededor de tres a cuatro horas (figura 4, artículo de Valencia y Morán, 2001).

Como ocurre con la translocación de la PS, la actividad de la caspasa-8 se inhibe por tratamientos antioxidantes. Sin embargo, hay que mencionar que en el caso de la caspasa-3 los antioxidantes no son completamente efectivos en evitar el procesamiento, y por lo tanto la actividad de la caspasa. Esto sugiere que hay otras vías intracelulares involucradas en la activación de esta caspasa y que en la muerte de estas células puedan existir otros componentes independientes de estrés oxidativo.

Con base en los cursos temporales de los distintos eventos observados en la muerte, concluimos que el estrés oxidativo es un proceso iniciador importante más que un ejecutor de la muerte apoptótica de las CGC privadas de potasio. Los episodios de estrés oxidativo más importantes ocurren temprano en el proceso (entre quince minutos y cuatro a seis horas) y de forma transitoria antes de que se detecten los cambios morfológicos y metabólicos. Las primeras evidencias de la degradación celular como son la condensación nuclear y la activación de caspasas, aparecen horas después de la formación de las EOR en las células. Esto sugiere que el estrés oxidativo no está desempeñando un papel ejecutor en la muerte celular. Asimismo, cuando se empezaron a notar las alteraciones morfológicas y metabólicas ya no se detectó estrés oxidativo. El papel que juegan las EOR en la muerte podría depender del modelo empleado, ya que en otras preparaciones se ha propuesto que el estrés oxidativo participa activamente como ejecutor de la muerte, basados en la observación de una coincidencia temporal de la formación de las EOR y la generación del daño celular (Wei *et al.*, 2000).

Existen una gran cantidad de estudios que sugieren la participación de las EOR en los distintos procesos fisiológicos y patológicos (Ceballos-Picot, *et al.*, 1997; Valencia y Morán, 2001; Wyllie *et al.*, 1980). Se ha propuesto que en la muerte neuronal participan las EOR de manera directa, induciendo la muerte, o bien como resultado de ésta, afectando la progresión del proceso. Muchos estudios sugieren que el  $O_2^-$ , el  $^1O_2$  y el  $H_2O_2$  podrían ser los responsables de estos procesos de muerte. Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de estudios realizados al respecto, no se ha definido cuáles son las EOR responsables de la muerte, particularmente en su fase inicial (Ceballos-Picot, *et al.*, 1997). Esto se ha debido en gran parte a las



dificultades técnicas existentes para estudiar estas EOR, las cuales tienen una vida media muy corta y se convierten unas en otras.

En el presente trabajo utilizamos un protocolo experimental dirigido a responder esta pregunta tratando de minimizar los problemas derivados de la naturaleza propia de las EOR. Manteniendo las células en una condición óptima de sobrevivencia como el alto potasio extracelular, indujimos la formación de  $O_2^-$ ,  $^1O_2$  o  $H_2O_2$  con un protocolo que induce la formación exclusiva de estas EOR (Englert, *et al.*, 2002; Iglesias-de la Cruz *et al.*, 2001; Lacy, *et al.*, 1998; Lehninger, 2000; Satoh, *et al.*, 1998; Zhuang, *et al.*, 1999). Con base en estos procedimientos encontramos que el peróxido de hidrógeno genera una muerte neuronal, que no muestra la presencia de marcadores apoptóticos, pero sí tiene algunas características necróticas, como lo es el daño membranal. Por otro lado, tanto el oxígeno singulete como el anión superóxido inducen muerte neuronal con características aparentemente apoptóticas. Estas incluyen la translocación de la PS, la condensación y fragmentación nuclear y la activación de caspasas-1, 3 y 8.

Es interesante mencionar que, a diferencia de las condiciones que forman el  $H_2O_2$ , los otros dos protocolos inducen una reducción marcada de calcio intracelular, lo que podría ser la causa inicial de la muerte, como ocurre en el caso de la condición de K5. Sin embargo, cuando modificamos las concentraciones del calcio intracelular (usando NMDA y ionomicina), se evita la muerte sólo de forma parcial. Por lo que tal vez durante la formación del  $O_2^-$  y/o del  $^1O_2$  se podrían estar generando dos vías de inducción de la muerte neuronal, una por efecto directo de las EOR ( $O_2^-$  y/o  $^1O_2$ ) y la otra por una disminución del calcio intracelular. Los mecanismos involucrados en la reducción de la concentración calcio intracelular observados en presencia del  $O_2^-$  y del  $^1O_2$  no son conocidos, pero es posible que se deba a una acción directa de las EOR sobre los canales de calcio sensibles a voltaje, responsables de la entrada continua del calcio bajo estas condiciones (Morán *et al.*, 1999).

La formación de las EOR genera siempre una reacción en cadena que tiene como consecuencia la generación de otras EOR, las cuales en su conjunto desarrollan un episodio de estrés oxidativo. Aun cuando la velocidad de formación y

reacción de estas EOR es del orden de milisegundos, es posible que el conjunto de las diferentes especies producidas continuamente estén involucradas en la muerte. En este trabajo sugerimos que la aparición en primera instancia de ciertas especies particulares ( $^1\text{O}_2$  y  $\text{O}_2^-$ ), así como su formación continua durante varias horas genera muerte con características apoptóticas. Los tiempos de exposición y la concentración de las moléculas reactivas parece que son factores determinantes para la inducción de un programa de muerte apoptótico o necrótico.

También es conveniente recordar que esta respuesta celular es el resultado de un método experimental que involucra un solo estímulo que difiere de lo que sucede en un organismo *in vivo* en el que se integran una serie de señales que pueden o no inducir muerte neuronal apoptótica. Los resultados del presente trabajo sugieren que las distintas EOR formadas inicialmente definen el tipo de muerte neuronal. Esto apunta a que las neuronas granulares del cerebelo en cultivo cuentan con un mecanismo para iniciar el programa apoptótico en presencia de unas EOR, y la muerte necrótica en presencia de otras EOR.

Un resultado interesante del presente estudio es la identificación de la NADPH-oxidasa en las CGC, un complejo enzimático que hasta hace poco era desconocido en neuronas y que es responsable de la generación de anión superóxido. Este complejo se asoció hasta hace poco casi exclusivamente a las células fagocíticas de la sangre. Sin embargo, recientemente se describió este complejo y otros de la misma familia, como la NADH-oxidasa dependiente de ascorbatc (Martín-Romero, *et al.*, 2002) en preparaciones neuronales y se relacionaron con el proceso de estrés oxidativo y de muerte celular (Tammariello *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2002).

En este trabajo encontramos que 4 de las 5 subunidades de la NADPH-oxidasa están presentes en las neuronas granulares de cerebelo (gp91-phox, p22-phox, p47-phox y p67-phox). Algunos experimentos preliminares indican que los niveles de las subunidades gp91-phox (subunidad catalítica del complejo) y la p47-phox se incrementan dos horas después del estímulo de muerte. También, se vio que hay una translocación de la subunidad p67-phox de la fase citosólica a la fracción celular de 1500 rpm en donde se localizan las membranas citoplasmáticas,



lo cual ocurre en respuesta al estímulo de muerte, lo que constituye una evidencia de la activación de la NADPH-oxidasa (Karlsson *et al.*, 2002). Encontramos también que después del estímulo apoptótico se induce la actividad de esta enzima. Así, pensamos que este complejo enzimático está estrechamente relacionado con el desarrollo de las etapas iniciales de la muerte de estas células bajo estas condiciones

Los datos obtenidos con el presente trabajo permiten sugerir que la activación de la NADPH-oxidasa está involucrada con el inicio del proceso de muerte. Sin embargo, no se ha identificado la señal previa que induce dicha activación. Es posible que la disminución del calcio intracelular, resultante de la privación de potasio, participe directa o indirectamente en la activación de esta. En este sentido, se ha propuesto recientemente que la activación de la NADPH-oxidasa depende de la fosforilación de algunas de sus subunidades (p47-phox y p67-phox) y que esta condición puede estar ligada a la acción de distintas cinasas como la proteína cinasa C (PKC: PKC  $\alpha$ , PKC  $\beta$ II, la PKC  $\zeta$ , y la PKC  $\delta$ ) (Fontayne *et al.*, 2002), así como al calcio (Zhou *et al.*, 1997). Quedaría por demostrar si en este modelo de muerte la reducción del calcio intracelular puede ser una señal de activación directa de la NADPH-oxidasa o de de las cinasas responsables de la activación de este complejo enzimático.

En conclusión, en este trabajo sugerimos que el estrés oxidativo podría ser una señal inicial de la muerte apoptótica y que la NADPH-oxidasa podría tener un papel central, aunque no único, en la activación del programa apoptótico, siendo el anión superóxido y/o el oxígeno en singulete, los responsables iniciales de la inducción de la muerte apoptótica de las neuronas del cerebelo en cultivo. Es necesario considerar que estos mecanismos propuestos forman parte de las vías de señalización celular que no son necesariamente exclusivas del proceso apoptótico y que además existen otras vías que no se han considerado aquí que también participan en la muerte/sobrevivencia celular.

## **8. CONCLUSIONES**

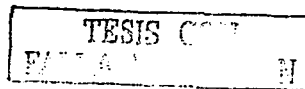
De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo podemos concluir que el estrés oxidativo parece participar como una señal inicial en la muerte apoptótica de las neuronas granulares inducida con la privación de potasio, y que es posterior a la reducción del calcio intracelular. El anión superóxido, generado por la NADPH-oxidasa, probablemente tenga un papel fundamental en la activación del programa apoptótico, sin que se pueda descartar un papel importante del oxígeno singulete. Estas ideas se basan en las siguientes observaciones:

- i) Las neuronas en cultivo privadas del potasio extracelular experimentan un estrés oxidativo durante el proceso de muerte apoptótica que ocurre después de la reducción en la concentración de calcio libre intracelular y antes de la translocación de la fosfatidilserina y la activación de caspasas-8 y -3.
- ii) Tanto la muerte neuronal como los indicadores apoptóticos inducidos por la privación de potasio disminuyen con varios antioxidantes, siendo la superóxido dismutasa el más efectivo.
- iii) En condiciones despolarizantes (25 mM de KCl) el anión superóxido y el oxígeno singulete inducen la muerte neuronal con características apoptóticas. El peróxido de hidrógeno induce una muerte tipo necrótica.
- iv) Durante la fase inicial de la muerte neuronal ocurre una activación y una mayor expresión de algunas subunidades de la NADPH-oxidasa. Esto ocurre después de la reducción del calcio intracelular, antes de la translocación de la fosfatidilserina y de la activación de las caspasas y simultáneo a la generación del estrés oxidativo. La inhibición específica de esta enzima evita la muerte apoptótica.

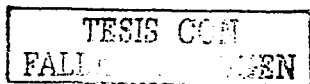
## 9. REFERENCIAS

- Arai T, Mori H, Ishii H, Adachi T, Endo N, Makino K, Mori K. 1998. Oxypurinol, a xanthine oxidase inhibitor and superoxide scavenger, did not attenuate ischemic neuronal damage in gerbils. *Pharmacol Letters*, 63: 107-112.
- Ashkenazi A, Dixit VM. 1998. Death receptors: Signaling and modulation. *Science*, 281: 1305-1308.
- Atabay C, Cagnoli E, Ikonovic M, Manev H. 1996. Removal of serum from primary cultures of cerebellar granule neurons induced oxidative stress and DNA fragmentation: protection with antioxidants and glutamate receptor antagonist. *J Neurosci Res*, 43: 465-475.
- Atlante A, Gagliardi S, Marra E, Calissano P. 1998. Neuronal apoptosis in rats is accompanied by rapid impairment of cellular respiration and is prevented by scavengers of reactive oxygen species. *Neurosci Lett*, 245:127-130.
- Atlante A, Valenti D, Gagliardi S, Passarella S. 2000. A sensitive method to assay the xanthine oxidase activity in primary cultures of cerebellar granule cells. *Brain Res Brain Res Protoc*, 6(1-2):1-5.
- Atlante A, Calissano P, Bobba A, Azzariti A, Marra E, Passarella S. 2000. Cytochrome c is released from mitochondria in a reactive oxygen species (ROS)-dependent fashion and can operate as a ROS scavenger and as a respiratory substrate in cerebellar neurons undergoing excitotoxic death. *J Biol Chem*, 275(47):37159-66.
- Balázs R, Jorgensen OS, Hack N. 1988. N-methyl-D-aspartate promotes the survival of cerebellum granule cells in culture. *Neuroscience*, 27: 437-451.
- Bobba A, Atlante A, Giannattasio S, Sgaramella G, Calissano P, Marra E. 1999. Early release and subsequent caspase-mediated degradation of cytochrome c in apoptotic cerebellar granule cells. *FEBS Lett*, 457(1):126-30.
- Burgoyne R, Graham M, Cambray-Deakin M. 1993. Neurotrophic effects of NMDA receptor activation on developing cerebellar granule cells. *J Neurocytol*, 22: 689-695.
- Caballero-Benitez A, Morán J. 2003. Caspase activation pathways induced by staurosporine and low potassium: role of caspase-2. *J Neurosci Res*, 71: 383-396.

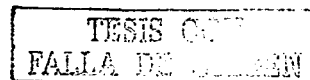
- Castilho R, Manus W, Nicholls D. 1999. Oxidative stress, mitochondrial function and acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *J Neurochem*, 72: 1394-1401.
- Ceballos-Picot I. 1997. The role of oxidative stress in neuronal death. Neuroscience Intelligent Unit. Springer. NY, USA. pp 203.
- Chan W, Yu JS, Yang S. 2000. Apoptotic signaling cascade in photosensitized human epidermal carcinoma A431 cells: involvement of singlet oxygen, c-Jun N-terminal kinase, caspase-3 and p21-activated kinase 2. *Biochem J*, 351: 221-232.
- Chang LK, Johnson M. 2002. Cyclosporine A inhibits caspase-independent death of NGF-deprived sympathetic neurons: a potential role for mitochondrial permeability transition. *J Cell Biol*, 157: 771-781.
- Chimini G. 2002. Repulsive encounters. *Nature*, 418: 139-141.
- Chua BT, Guo K, Li P. 2000. Direct cleavage by the calcium-activated protease calpain can lead to inactivation of caspases. *J Biol Chem*, 275: 5131-5135.
- Cohen GM. 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*, 326: 1-16.
- Crompton M. 1999. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J*, 341: 233-249.
- D'Mello SR, Galli C, Ciotti T, and 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 USA*. 90: 10989-10993.
- Deveraux Q, Reed J. 1999. IAP family proteins-suppressors of apoptosis. *Genes and Develop*, 13: 239-252.
- Dessi F, Charriaud-Marlangue C, Khrestchaitsky M, Ben-Ari Y. 1993. Glutamate-induced neuronal death is not a program cell death in cerebellar culture. *J Neurochem*, 60: 1953-1955.
- Diatchunk V, Iotani O, Koshkin V, Wikstroem P, Pick E. 1997. Inhibition of NADPH oxidase activation by 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride and related compounds. *J Biol Chem*, 272: 13292-13301.
- Ding D, Moskowitz S, Li R, Lee SB, Esteban M, Tomaselli K, Chan J, Bergold P. 2000. Acidosis induces necrosis and apoptosis of cultured hippocampal neurons. *Exp Neurol*, 162: 1-12.
- Du G, Mouthys-Mickalad A, Sluse F. 1998. Generation of superoxide anion by mitochondria and impairment of their function during anoxia and reoxygenation in vitro. *Free Radic Biol Med*, 25: 1066-1074.



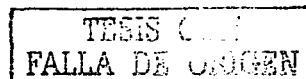
- Ellis RE, Yuan J, Horvitz HR. 1991 Mechanisms and functions of cell death. *Ann Rev Cell Biol*, 7: 663-698.
- Englert RP and Shacter E. 2002. Distinct modes of cell death induced by different reactive oxygen species: amino acyl chloramines mediate hypochlorous acid-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 7;277(23):20518-26.
- Fabisiak JP, Tyurin VA, Tyurina YY, Sedlov A, Lazo JS, Kagan VE. 2000. Nitric oxide dissociates lipid oxidation from apoptosis and phosphatidylserine externalization during oxidative stress. *Biochemistry*, 39: 127-138.
- Fiskum G, Murphy AN, Beal MF. 1999. Mitochondria in neurodegeneration: acute ischemia and chronic neurodegenerative diseases. *J Cereb Blood Flow Metab*, 19: 351- 369.
- Fontayne A, Dang PM, Gougerot-Pocidalo A, Benna JE. 2002. Phosphorylation of p47<sup>phox</sup> sites by PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ II,  $\delta$  and  $\zeta$  : effect on binding to p22<sup>phox</sup> and on NADPH oxidase activation. *Biochemistry*, 41: 7743-7750.
- Gallo V, Kingsbury A, Balazs R and Jorgensen OS. 1987. The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J Neurosci*. 7: 2203-2213.
- Gerhardt E, Kügler S, Leist M, Beier C, Berliocchi L, Volbracht C, Weller M, Bähr M, Nicotera P, Schulz JB. 2001. Cascade of caspase activation in potassium-deprived cerebellar granule neurons: targets for treatment with peptide and protein inhibitors of apoptosis. *Mol Cell Neurosci*, 17: 717-731.
- Gingham R, Harrison DC, Facci L, Skaper S, Philpott KL. 2001. Upregulation of death pathway molecules in rat cerebellar granule neurons undergoing apoptosis. *Neurosci Lett*, 302(2-3):113-6.
- Greenlund LJS, Deckwerth TL and Johnson EM 1995. Superoxide dismutase delays neuronal apoptosis: a role for reactive oxygen species in programmed neuronal death. *Neuron*. 14: 303-315.
- Golstein P. 1997. Controlling cell death. *Science*, 275: 1081-1082.
- Green DG, Beere HM. 2001. Mostly dead. *Nature*, 412: 133-134.
- Halliwell, B. 1992. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem*, 59; 1609-1623.
- Halliwell, B. 2003. Oxidative stress in cell culture: an under-appreciated problem? *FEBS letters*, 540:3-6.



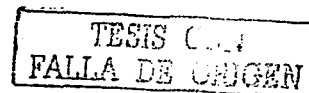
- Hengartner, MO. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407: 770-776.
- Hu Y, Benedict M, Wu D, Inohara N, Núñez G. 1998. Bcl-x<sub>L</sub> interacts with Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 4386-4391.
- Hua J, Hasabe T, Someya A, Nakamura S, Sugimoto K, Nagaoka I. 2000. Evaluation of the expression of NADPH oxidase components during maturation of HL-60 cells to neutrophil lineage. *J Leukoc Biol*, 68: 216-224.
- 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*, 82: 894-902.
- Iglesias-De la Cruz MC, Ruiz-Torres P, Alcami J, Diez-Marques L, Ortega-Velazquez R, Chen S, Rodriguez-Puyol M, Ziyadeh FN, Rodriguez-Puyol D. 2001. Hydrogen peroxide increases extracellular matrix mRNA through TGF-beta in human mesangial cells. *Kidney Int*, 59: 87-95
- Irani K, Goldschmidt-Clermont J. 1998. Ras, superoxide and signal transduction. *Biochem Pharmacol*, 55: 1339-1346.
- Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H, Nawata H. 2000. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes*, 49: 1939-1945.
- Itoh, M. 1984. The cerebellum and neural control. Raven Press. NY, USA. 580 pp.
- Itoh S, Yanagishita T, Aoki S, Koba S, Iwata T, Ishioka H, Arata H, Mukae S, Geshi E, Konno N, Katagiri T, Utsumi H. 1999. Generation of free radicals and the damage done to the sarcoplasmic reticulum during reperfusion injury following brief ischemia in the canine heart. *Jpn Circ J*, (5):373-8.
- Jones R, Hancock JT, Morice AH. NADPH oxidase: a universal oxygen sensor? 2000. *Free Radic Biol Med*, 29: 416-424.
- Jozza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Carol YL, Sasaki T, Elia A, Cheng HY, Ravagnan L, Ferri KF, Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida H, Kong YY, Mak T, Zúñiga-Pflücker JC, Kroemer G, Penninger JM. 2001. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*, 410: 549-554.
- Karlsson A, Dahlgren C. 2002. Assembly and activation of the neutrophil NADPH oxidase in granule membranes. *Antioxid Redox Signal*. 4(1):49-60.



- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26: 239.
- Kim SH, Won SJ, Sohn S, Kwon HJ, Lee JY Park Jh, Gwag BJ. 2002. Brain-derived neurotrophic factor can act as a pronecrotic factor through transcriptional and translational activation of NADPH oxidase. *J Cell Biol*, 159: 821-831.
- Kimonides VG, Khatibi NH, Svendsen CN, Sofroniew MV, Herbert J. 1998. Dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA-sulfaten (DHEAS) protect hippocampal neurons against excitatory amino acid-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95: 1852-1857.
- Kowaltowski A, Vercesi A. 1999. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 26: 463-471.
- Krajewski S, Krajewska M, Ellerby ML, Welsh K, Xie Z, Deveraux Q, Salvesen G, Bredesen D, Rosenthal R, Fiskum G, Reed J. 1999. Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 5752-5757.
- Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon. 1998. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol*, 60: 619-642.
- Kruman II, Mattson M. 1999. Pivotal role of mitochondrial calcium uptake in neuronal cell apoptosis and necrosis. *J Neurochem*, 72: 529-540.
- Kumar S, Vaux D. 2002. A Cinderella caspase takes center stage. *Science*, 297: 1290-1291.
- Lacy F, Gouch D, Schimd-Schönbein W. 1998. Role of xanthine oxidase in hydrogen peroxide production. *Free Radic Biol Med*, 25: 720-727.
- Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. 2000. *Principles of Biochemistry*. Worth Publish. Sec. Edit. NY, USA. Chapter 11, pag. 306.
- Li PF, Dietz R, von Harsdorf R. 1999. p53 regulates mitochondrial membrane potential through reactive oxygen species and induces cytochrome c-independent-apoptosis by Bcl-2. *The EMBO Journal*. 18: 6027-6036.
- Lockshin RA, Osborne B, Zakeri Z. 2000. Cell death in the third millennium. *Cell Death Differentiation*, 7: 2-7.
- Luo Y, Bond JD, Ingram VM. 1997. Compromised mitochondrial function leads to increase cytosolic calcium and to activation of MAP kinases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 9705-9710.

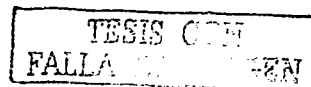


- Manev H, Cagnoli C, Atabay C, Kharlamov E, Iconomovic M. 1995. Neuronal apoptosis in an in vitro model of photochemically induced oxidative stress. *Exp Neurol*, 133: 198-206.
- Martin SJ, Green DR. 1995. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell*, 82: 349-352.
- Martín-Romero FJ, García-Martín E, Gutiérrez-Merino C. 2002. Inhibition of oxidative stress produced by plasma membrana NADH oxidase delays low-potassium-induced apoptosis of cerebellar granule cells. *J Neurochem*, 82: 705-715.
- Mattson MP, Zhang Y, Bose S. 1993. Growth factors prevent mitochondrial dysfunction, loss of calcium homeostasis and cell injury, but not ATP depletion in hippocampal neurons deprived of glucose. *Exp Neurol*, 121: 1-13.
- Meier P, Finch A, Evan G. 2000. Apoptosis in development. *Nature*, 407: 796-801.
- Mellquist UH, Hansson M, Brune M, Dahlgren C, Hermodsson S, Hellstrand K. 2000. Natural killer cell dysfunction and apoptosis induced by chronic myelogenous leukemia cells: role of reactive oxygen species and regulation by histamine. *Blood*, 96: 1961-1968.
- Morán J and Patel AJ. 1989. Effect of potassium depolarization on phosphate-activated glutaminase activity in primary cultures of cerebellar granule neurons and astroglial cells during development. *Dev Brain Res*. 46: 97-105.
- Morán J, Itoh T, Reddy U, Chen M, Alnemri E, Pleasure D. 1999. Caspase-3 expression by cerebellar granule neurons is regulated by calcium and cyclic AMP. *J Neurochem*, 73: 568-577.
- Moreno G, Poussini K, Ricchelli F, Salet C. 2001. The effect of singlet oxygen produced by photodynamic action on the mitochondrial permeability transition differ in accordance with the localization of the sensitizer. *Arch Biochem Biophys*, 386: 243-250.
- Nardi N, Avidan G, Daily D, Zilkha-Falb R, Brazilai A. 1997. Biochemical and temporal analysis of events associates with apoptosis induced by lowering the extracellular potassium concentration in mouse cerebellar granule neurons. *J Neurochem*, 68: 750-759.
- Nicholls DG, Budd SL. 2000. Mitochondria and neuronal survival. *Physiol Rev*, 80: 315-360.
- Noh KM, Koh JY. 2000. Induction and activation by zinc of NADPH oxidase in cultured cortical neurons and astrocytes. *J Neurosci*, 20: RC111, 1-5.

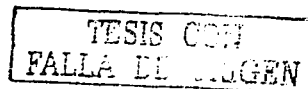




- Nuydens R, Dispersyn G, van Den Kieboom G, Jong M, Connors R, Ramaekers F, Borgers M, Geerts H. 2000. Bcl-2 protects against apoptosis-related microtubule alterations in neuronal cells. *Apoptosis*, 5: 43-51.
- Oppenheim R, Prevette D, Tytell M, Homma S. 1990. Naturally occurring and induced neuronal death in the chick embryo in vivo requires protein and RNA synthesis: evidences for the role of cell death genes. *Dev Biol*, 138: 104.
- Overbeeke R, Yildirim M, Reutelingsperger CPM, Haanen C, Vermes I. 1999. Sequential occurrence of mitochondrial and plasma membrane alterations, fluctuations in cellular  $Ca^{2+}$  and pH during initial and later phase of cell death. *Apoptosis*, 4: 455-460.
- Petersén Á, Castilho RF, Hansson O, Wieloch T, Brundin P. 2000. Oxidative stress, mitochondrial permeability transition and activation of caspases in calcium ionophore A23187-induced death of cultured striatal neurons. *Brain Res*, 857: 20-29.
- Pick E, Bromberg Y, Shprungin S, Gadba R. 1987. Activation of the superoxide forming NADPH oxidase in a cell-free system by sodium dodecyl sulfate. *J Biol Chem*, 262: 16474-16483.
- Satoh T, Numakawa T, Abiru Y, Yamagata T, Ishikawa Y, Enokido Y and Hatanaka H. 1998. Production of reactive oxygen species and release of L-glutamate during superoxide anion-induced cell death of cerebellar granule neurons. *J Neurochem*. 70: 316-324.
- Sakaguchi N, Inoue M, Ogihara Y. 1998. Reactive oxygen species and intracellular  $Ca^{2+}$ , common signals for apoptosis induced by gallic acid. *Biochem Pharmacol*, 55: 1973-1981.
- Salet C, Moreno G, Ricchelli F, Bernardi P. 1997. Singlet oxygen production by photodynamic action causes inactivation of the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem*, 272: 21938-21943.
- Salvesen GS, Dixit VM. 1999. Caspase activation: The induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 10964-10967.
- Samali A, Nordgren H, Zhivotovzky B, Peterson E, Orrenius S. 1999. A comparative study of apoptosis and necrosis in HepG2 cells: oxidant-induced caspase inactivation leads to necrosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 255: 6-11.
- Schulz JB, Weller M, Klockgether T. 1996. Potassium deprivation-induced apoptosis in cerebellar granule neurons: a sequential requirement for new mRNA and protein synthesis, ICE-like protease activity, and reactive oxygen species. *J Neurosci*, 16: 4696-4706.



- Shimohama S, Tanino H, Nawakami T, Okamura N, Kodama H, Yamaguchi T, Hayakawa T, Nonumura A, Chiba S, Perry G, Smith M, Fujimoto S. 2000. Activation of NADPH oxidase in Alzheimer's disease brains. *Biochem Biophys Res Comm*, 273: 5-9.
- Shpungin S, Dotan I, Abo A, Pick E. 1989. Activation of the superoxide forming NADPH oxidase in a cell-free system by sodium dodecyl sulfate. Absolute lipid dependence of the solubilized enzyme. *J Biol Chem*. 264(16):9195-203.
- Sumimoto H, hata K, Mizuki K, Ito T, Kage Y, Sakaki Y, Fukamaki Y, Nakamura M, Takeshige K. 1996. Assembly and activation of the phagocyte NADPH oxidase. *J Biol Chem*, 271: 22152-22158.
- Sureda FX, Gabriel C, Comas J, Pallàs M, Escobedo E, Camarasa J, Camins A. 1999. Evaluation of free radicals production, mitochondrial membrane potencial and cytoplasmic calcium in mammalian neurons by flow cytometry. *Brain Res Brain Res Protoc*, 4: 280-287.
- Susin SA, Lorenzo HK, Snow BE, Brothers GM, Magnion J, Jacotot E, Constantini P, Loeffler L, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, 397: 441-445.
- Tammariello S, Quinn M, Estus S. 2000. NADPH oxidase contributes directly to oxidative stress and apoptosis in nerve growth factor-deprived sympathetic neurons. *J Neurosci*. 20: 1-5.
- Thoenen H. 1991. The changing scene of neurotrophic factors. *TINS*, 14: 165.
- Thornberry NA, Lazebnik Y. 1998. Caspases: Enemies within. *Science*, 281: 1312-1316.
- Valencia A, Morán J. 2001. Role of oxidative stress in the apoptotic cell death of cultured cerebellar granule neurons. *J Neurosci Res*. 64: 284-297.
- Weaver CE, Park-Chung M, Gibbs TT, Farb D. 1997. 17 $\beta$ -estradiol protects against NMDA-induced excitotoxicity by direct inhibition of NMDA receptors. *Brain Res*, 761: 338-341.
- Wei T, Chen C, Hou J, Xin W, Mori A. 2000. Nitric oxide induces oxidative stress and apoptosis in neuronal cells. *Biochim Biophys Acta*, 1498(1):72-9.
- Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*, 68:251-306.



- Yakes FM, van Houten B. 1997. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persist longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 514-519.
- Yuan J, Yanker B. 2000. Apoptosis in the nervous system. *Nature*, 407: 802-809.
- Zhou H, Duncan RF, Robinson TW, Gao L, Forman HJ. 1997. Ca<sup>2+</sup>-dependent p47phox translocation in hydroperoxide modulation of the alveolar macrophages respiratory burst. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol*, 273: L1042-L1047.
- Zhuang S, Lynch M, Kochevar IE. 1998. Activation of protein kinase C is required for protection of cells against apoptosis induced by singlet oxygen. *FEBS Letters*, 437: 158-162.
- Zhuang S, Lynch M, Kochevar IE. 1999. Caspase-8 mediates caspase-3 activation and cytochrome c release during singlet oxygen-induced apoptosis of HL-60 cells. *Exp Cell Res*, 250: 203-212.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN