



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR

PAPEL DE LA NADPH-OXIDASA
EN LA MUERTE DE
ASTROCITOS EN CULTIVO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

MARIA GUADALUPE DOMINGUEZ MACOUZET

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JULIO MORAN ANDRADE

COMITÉ TUTOR: DRA. LOURDES MASSIEU TRIGO
DRA. ELIZABETH HERNANDEZ ECHEAGARAY

MÉXICO, D.F.

FEBRERO 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/026/11

ASUNTO: Oficio de Jurado

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 28 de junio de 2010, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del (la) alumno (a) **DOMINGUEZ MACOUZET MARÍA GUADALUPE** con número de cuenta **71075929** con la tesis titulada "**PAPEL DE LA NADPH OXIDASA EN LA MUERTE DE ASTROCITOS EN CULTIVO**", realizada bajo la dirección del (la) **DR. JULIO EDUARDO ROQUE MORÁN ANDRADE**:

Presidente: DRA. ALICIA ELIZABETH HERNÁNDEZ ECHEAGARAY
Vocal: DRA. ROCÍO ALCÁNTARA HERNÁNDEZ
Secretario: DR. JULIO EDUARDO ROQUE MORÁN ANDRADE
Suplente: M. EN C. ANGÉLICA BERENICE COYOY SALGADO
Suplente: DRA. LOURDES MASSIEU TRIGO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 18 de enero de 2011.

Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga
Coordinadora del Programa

MCAA/MJFM/ASR/ipp

Gracias a la vida,

que me ha dado tanto,

(Violeta Parra)

Caminante,

no hay camino,

se hace camino al andar...

Antonio Machado.

AGRADEZCO

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

A Conacyt Proyecto No. 79788 y a PAPIIT Proyecto No. IN233107 por el apoyo recibido durante la elaboración de esta tesis.

A los miembros de mi Comité Tutoral, Dr. Julio Morán Andrade, Dra. Lourdes Massieu Trigo y Dra. Elizabeth Hernández Echeagaray por compartir conmigo sus conocimientos para realizar este trabajo.

A mi director de tesis, Dr. Julio Morán, por su paciencia y confianza.

A los miembros del jurado: Dra. Elizabeth Hernández Echeagaray, Dra. Rocío Alcántara Hernández, Dr. Julio Morán, M. en C. Angélica Coyoy Salgado y Dra. Lourdes Massieu Trigo por el tiempo dedicado a la revisión de mi tesis y por sus valiosas sugerencias para la escritura de este trabajo.

DEDICADA

A mis hijos, Sergio, Javier y Alejandro. Porque son mi motivo más importante para vivir.

A mi pequeña Danita, que es una estrella en mi vida.

A mis hermanos Lourdes, Sergio, Juan José y Agustín y sus respectivas familias, con todo el cariño que les tengo.

A Ariel, compañero y hermano. Gracias por andar conmigo este camino (y por bailar el tango, también).

A mi tutor, jefe y amigo, Dr. Julio Morán, por su confianza, paciencia y presencia. Gracias por no dejarme claudicar.

A mi querida amiga Alette, que en los momentos difíciles, y también en los ligeros ha estado cerca.

A mis amigos y compañeros del laboratorio BL-302 (Alette, Angie, Sugis, Mauricio, Yaz, Pao, Dioné, Bere, Erika, Pato, Erick, Marce), que han vivido conmigo esta aventura. Por su ayuda, sus enseñanzas, su alegría y, también, por sus críticas que siempre ayudan a mejorar. A los que ya no están, pero permanecen en mi corazón.

A mis compañeros de estudios durante estos años, Silvia, Marlen, Ari, Alex y Vicente.

A mi amigos del IFC, a los del baile, a los de la vida.

I N D I C E

RESUMEN	4
ABSTRACT	5
1. INTRODUCCION	6
1.1 Muerte celular apoptótica	6
1.2 Especies reactivas de oxígeno	9
1.3 NADPH-oxidasa	11
Flavocitocromo b ⁵⁵⁸	12
p47 ^{phox}	12
p67 ^{phox}	12
p40 ^{phox}	13
1.4 NADPH oxidasa no fagocítica y la familia NOX	13
1.5 Activación de la NADPH oxidasa	14
1.6 Inhibidores de la NADPH-oxidasa	15
1.7 Células gliales	16
1.8 Astrocitos	17
2. ANTECEDENTES	20

3. HIPOTESIS	22
4. OBJETIVO	22
OBJETIVOS PARTICULARES	22
5. METODOLOGIA	23
5.1 Cultivo celular	23
5.2 Inducción de muerte	23
5.3 Viabilidad celular	23
5.3.1. MTT	23
5.3.2 Calceina-AM/Ioduro de Propidio	24
5.4 Detección de ERO	24
5.5 Actividad de NADPH oxidasa	25
5.6 Análisis de proteínas por Western Blot	26
5.7 Inmunocitoquímica	26
5.8 Análisis estadístico	27
6.RESULTADOS	28
6.1 El tratamiento con St produce un cambio en la morfología de los astrocitos	28
6.2 La St induce muerte dependiendo de la concentración	29
6.3 La reducción en la viabilidad de astrocitos inducida por St es dependiente de tiempo.	29

6.4 La St induce la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO)	33
6.5 Los antioxidantes reducen la producción de ERO inducida por St	36
6.6 Las ERO participan en la muerte de astrocitos Inducida por St	37
6.7 NADPH-oxidasa se expresa en astrocitos	39
6.8 La NADPH-oxidasa se activa con St	41
6.9 La inhibición de la NADPH-oxidasa reduce la producción de ERO	42
6.10 Participación de NADPH-oxidasa en la muerte de astrocitos	44
7. DISCUSION	47
8. CONCLUSIONES	51
9. BIBLIOGRAFIA	52

RESUMEN

En el Sistema Nervioso la muerte celular puede ocurrir mediante un mecanismo genéticamente programado en respuesta a condiciones patológicas o fisiológicas como la eliminación de células neurales durante el desarrollo. En diferentes modelos de neuronas en cultivo, la inducción de muerte genera una condición oxidante y el uso de antioxidantes la previene. En diferentes modelos de muerte de neuronas granulares de cerebelo en cultivo, la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) está mediada en parte por la activación del complejo enzimático nicotinamida adenina difosfato oxidasa (NADPH-oxidasa). Por otro lado, existe poca información sobre la muerte de células gliales y menos aún acerca del papel que juegan las ERO y la NADPH-oxidasa en este proceso. En el presente trabajo se evaluó la participación de las ERO en la muerte de astrocitos de cerebelo de rata en cultivo utilizando estaurosporina (St) como inductor de muerte. Por un lado, encontramos que las células mueren de manera dependiente de la concentración de St así como del tiempo de tratamiento. El tratamiento con St indujo un incremento en la generación de ERO después de 15 min con un máximo a las 2h del tratamiento. Además, el uso de antioxidantes redujo de manera significativa la producción de ERO, así como la muerte celular. Mediante ensayos de Western blot e inmunocitoquímica identificamos la expresión de algunas subunidades de la NADPH-oxidasa, incluyendo p67^{phox} y p22^{phox} y los homólogos de la subunidad catalítica Nox 1 y Nox 4. El tratamiento con diferentes inhibidores de NADPH-oxidasa disminuyó la producción de las ERO y de la muerte inducida por St. Estos datos muestran que la muerte de astrocitos de cerebelo de rata en cultivo inducida por St parece estar mediada por las ERO producidas por NADPH-oxidasa.

ABSTRACT

In the nervous system, cell death can occur through a genetically programmed mechanism in response to pathological and physiological conditions such as the elimination of neural cells during development. In different models of neuronal death, there is a generation of reactive oxygen species and cell death is prevented by antioxidants. In cerebellar granule neurons (CGN), the generation of reactive oxygen species (ROS) induced by different conditions leading to cell death is mediated by the activation of the enzyme nicotine amide diphosphate oxidase (NADPH-oxidase). On the other hand, there is little information on the death of glial cells and there is no information about the role of ROS and NADPH-oxidase in this process. In the present study we assessed the participation of the ROS in the death of cultured astrocytes of rat cerebellum using staurosporine (St) as death inductor. Here, we found that cells die in a St concentration and time-dependent manner. Treatment with St provoked an increase in the generation of ROS after 15 min of exposure which reached a maximum in 2h. In addition, the use of antioxidants significantly reduced the production of ROS as well as cell death. By using Western blot and immunocytochemistry assays, we identified the expression of some of the subunits of the NADPH-oxidase, including p67^{phox} and p22^{phox} and the catalytic subunits Nox1 and Nox4. Treatment with a variety of inhibitors of NADPH-oxidase induced a decrease in the production of ROS and cell death evoked by St. These data show that St-induced death in cultured astrocytes of rat cerebellum appears to be mediated by the ROS produced by NADPH-oxidase.

1. INTRODUCCION

El Sistema Nervioso (SN) posee una organización de redes neurales complejas que resultan del establecimiento de poblaciones y de conexiones neuronales y gliales generadas durante el desarrollo. El destino de las células depende en gran medida de diversas señales internas y externas que funcionan como estímulos tróficos y que, en algunos casos, determinan el número de células que formarán las distintas estructuras del sistema nervioso. Este proceso se da mediante la eliminación selectiva y regulada de células neuronales en periodos definidos del desarrollo (Baehrecke, 2002). A lo largo de la evolución se han seleccionado una serie de mecanismos programados genéticamente destinados a la eliminación de estas células. La muerte apoptótica es uno de los mecanismos involucrados en la eliminación de células neuronales tanto durante el desarrollo como en algunas condiciones patológicas (Gluckmann A, 1951; Oppenheim et al., 1990; Abramov et al., 2004; Reinehr et al., 2007).

1.1 Muerte Celular Apoptótica

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada, controlada genéticamente y altamente conservada a lo largo de la evolución. El término proviene del griego (*appo, lejos -toe-sis, caída*) y se refiere a la caída de las hojas de un árbol, aludiendo a la similitud morfológica entre ambos procesos (Granville, 1998). Este tipo de muerte se distingue de otros por sus características morfológicas y bioquímicas. Entre los cambios morfológicos destacan la condensación de la cromatina, la fragmentación del núcleo, el encogimiento del soma celular, la formación de cuerpos apoptóticos y algunas alteraciones en la membrana celular (Korsmeyer, 1995). Entre las características bioquímicas de la apoptosis se encuentra una fragmentación del ADN, la translocación de la fosfatidilserina al exterior de la membrana plasmática y la activación de una familia de proteasas de cisteína conocidas como caspasas (Hengartner, 2000). Cabe hacer notar que no todas las características morfológicas ni todas las

bioquímicas aparecen simultáneamente durante el proceso apoptótico (Kroemer, 1997; Kroemer, 2005).

La muerte apoptótica se puede iniciar por dos vías, la ruta extrínseca y la ruta intrínseca (Fig.1). En el caso de la ruta extrínseca, la apoptosis puede ser inducida por señales extracelulares como ligandos de receptores de muerte que se presentan como factores solubles o en la superficie de otra célula. Los receptores de muerte transmiten la señal apoptótica iniciada por ligandos específicos como son el factor de necrosis tumoral α (TNF α), ligando de Fas (FasL) y el ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF α (TRAIL). Cuando la muerte se desencadena por esta vía el proceso es muy rápido (Ashkenazi, 1998). Una vez que se une el ligando al receptor existe un cambio conformacional en los dominios intracelulares del receptor de muerte. Estos cambios activan el Dominio de Muerte Asociado a Fas (FADD), el cual permite la unión de proteínas adaptadoras, algunas de las cuales podrán interactuar con caspasa 8 y de esta forma desencadenar la apoptosis (Muzio,1998; Slee, 1999; Berglund, 2000; Thorburn, 2004).

La ruta intrínseca o mitocondrial se inicia con la liberación de citocromo c mitocondrial al citoplasma en respuesta a rayos ultravioleta (UV), o rayos gamma frecuentemente utilizados en el tratamiento contra el cáncer y que forma el apoptosoma al asociarse con Apaf-1 y la procaspasa-9. Este proceso requiere de ATP y la formación del complejo induce la activación de la caspasa-9 que, a su vez, activa a la caspasa-3 (Fig. 1).

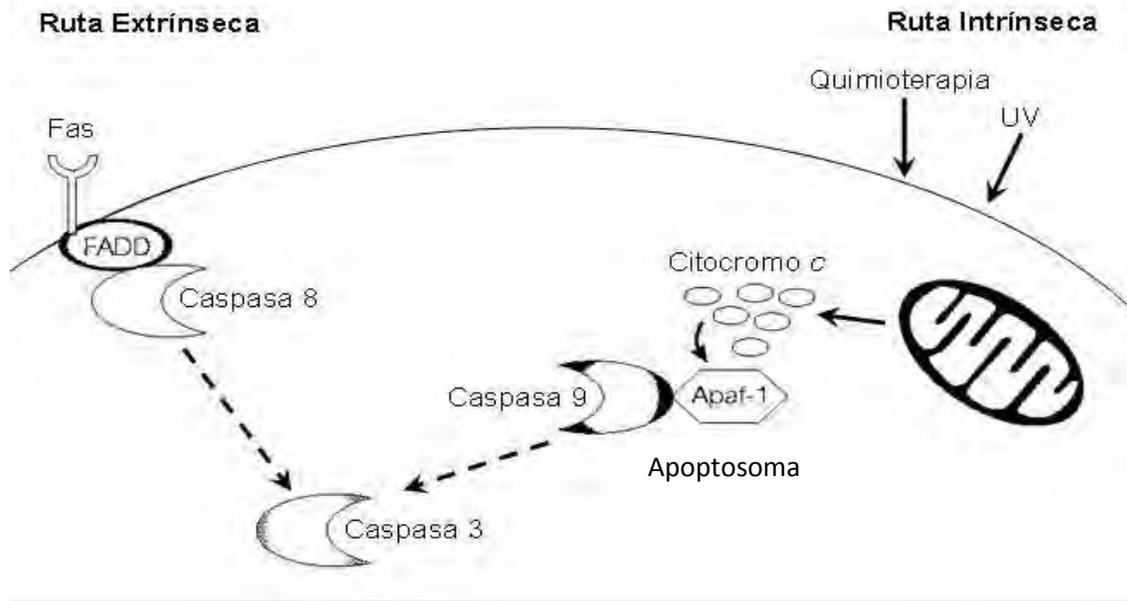


Fig. 1. Rutas de muerte apoptótica. Ruta extrínseca: el ligando (Fas) se une a su receptor (FADD), se recluta y se activa la caspasa 8, la cual activa directamente a la caspasa 3. Ruta intrínseca: se libera el citocromo c de la mitocondria, se une a Apaf-1 y pro-caspasa 9 formando el apoptosoma, que en presencia de ATP activa a la caspasa 9 y subsecuentemente a la caspasa-3. FADD, proteína con dominio de muerte asociada a Fas; UV, luz ultravioleta. (Modificado de Salvesen y Duckett, 2002).

La muerte apoptótica puede inducirse de forma experimental por diversas condiciones físicas o químicas. Uno de estos inductores de muerte celular es la estaurosporina, un inhibidor de proteínas cinasas (Ikemoto et al, 1995; Cagnoli et al, 1996; Caballero y Morán, 2003).

Uno de los eventos que parece estar involucrado en la apoptosis es el estrés oxidante. El estrés oxidante ocurre cuando se pierde el equilibrio entre las especies reactivas de oxígeno (ERO) generadas y la capacidad de los sistemas antioxidantes para reducir sus niveles. La producción de ERO parece ser esencial en la etiología de varias enfermedades neurodegenerativas, en la neurotoxicidad inducida por toxinas proapoptóticas, como el yoduro de 1-metil-4-fenilpiridina (MPP+), y en la apoptosis que se observa durante el desarrollo del sistema nervioso (Przedborsky et al, 1996). La protección obtenida por la administración de

antioxidantes apoya esta conclusión. La administración exógena de oxidantes puede inducir muerte apoptótica, necrótica y autofágica dependiendo de la concentración de la especie reactiva de oxígeno utilizada y del tipo celular del cual se trate (Valencia y Morán, 2008).

1.2 Especies reactivas de oxígeno

El oxígeno molecular es el aceptor final de electrones de la cadena respiratoria mitocondrial y de otras vías metabólicas. Como producto secundario de las reacciones químicas que se llevan a cabo en estas vías se producen las ERO (Halliwell y Gutteridge, 1999). Las ERO agrupan a los radicales de oxígeno como el anión superóxido, el oxígeno en singulete y el radical hidroxilo, además de los derivados de oxígeno que no son radicales como el peróxido de hidrógeno, así como a los derivados de la reacción de éstas con radicales basados en nitrógeno, carbono o cloro, entre los que se encuentran el peroxinitrito, el ácido hipocloroso y los peróxidos orgánicos (Halliwell, 2006).

La reactividad de las ERO es altamente variable. El superóxido, por ejemplo, es capaz de funcionar tanto como reductor como oxidante dependiendo del potencial de la otra molécula reaccionante. A pesar de que es precursor de otras especies aun más reactivas, el superóxido reacciona con un número limitado de moléculas. El peróxido de hidrógeno (H₂O₂) es un oxidante aún más potente y más reactivo que el superóxido; sus blancos son relativamente limitados e incluyen a la metionina y ciertas cisteínas reactivas. Puede reaccionar con algunos metales de transición y generar radicales hidroxilo por reacciones de tipo Fenton (Halliwell y Gutteridge, 1992, Koppenol, 2001).



Los radicales hidroxilo son sumamente reactivos, iniciando reacciones de radicales libres en cadena que producen un daño oxidante muy marcado. Las

ERO reaccionan con el ADN, proteínas, lípidos y carbohidratos. De igual manera el oxígeno en singulete y el ozono tienen alta reactividad con los enlaces dobles de ácidos grasos insaturados, por ejemplo. Las moléculas oxidadas representan un daño potencial a dos niveles pues, por un lado, disminuyen o modifican su acción fisiológica, y por otro propagan la reacción de radicales libres dependiendo de la naturaleza del compuesto del que se trate (Mark et al, 1997), como es el caso de la oxidación lipídica.

Sin embargo, las ERO no siempre son dañinas y pueden ser incluso útiles mientras que su concentración se mantenga dentro de ciertos niveles. Se sabe, por ejemplo, que el radical superóxido regula la división celular en fibroblastos en cultivo y puede detener la cadena de la peroxidación lipídica al reaccionar con radicales alcoholilo (McCord, 1995). También se sabe que el radical superóxido y el peróxido de hidrógeno se producen en las células sanas (Saran y Bors, 1990, Halliwell y Gutteridge, 1992) e, incluso, hay enzimas cuya principal función es generar ERO de manera regulada ante estímulos específicos. Estas enzimas producen oxígeno reactivo en varios tipos celulares en respuesta a factores de crecimiento, citocinas y señales dependientes de calcio, poniendo de manifiesto un papel fisiológico de estas especies (Fridovich, 1977, Liochey y Fridovich, 1994). Uno de los efectos de los radicales libres es la modulación en la expresión de genes que son activados por factores transcripcionales sensibles al estado redox celular, tales como el Factor Nuclear κ B (NF κ B) Remacle et al, 1995, Cimino et al, 1997).

Las fuentes de las especies reactivas de oxígeno pueden ser varias (figura 2). Entre ellas, se encuentran la mieloperoxidasa, la óxido nítrico-sintasa, la hemoxigenasa, la xantina-oxidasa, la mitocondria y la NADPH-oxidasa.

La NADPH oxidasa es una enzima membranal que cataliza la producción de grandes cantidades de superóxido (O_2^-) a través de la reducción del oxígeno, durante la llamada “descarga respiratoria” en células fagocíticas como los

macrófagos, los neutrófilos y los eosinófilos (Dinauer *et al.*, 2005). El $O_2^{\cdot-}$ es producido por la reducción monovalente del oxígeno empleando los electrones del nicotinamida adenina difosfato reducida (NADPH), en la reacción:

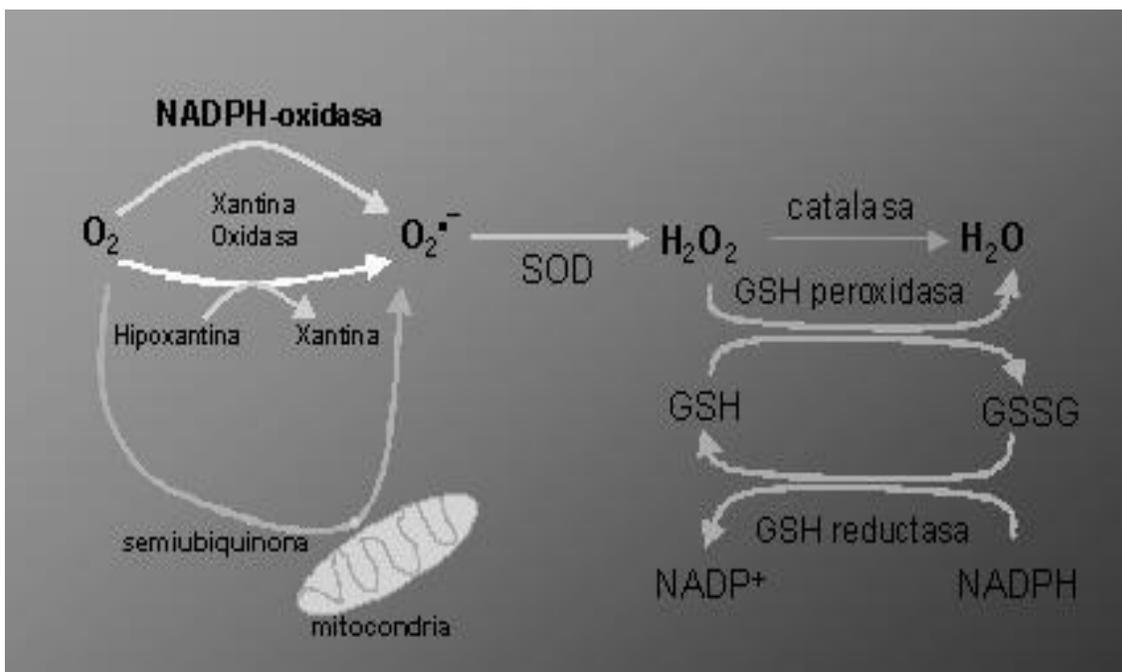


Fig. 2. Fuentes productoras de especies reactivas de oxígeno. (Tomado de Halliwell, 1992). Entre las diferentes fuentes productoras de ERO, se encuentran la Xantina oxidasa, la mitocondria y la NADPH oxidasa. SOD y catalasa protegen a la célula del daño generado por la oxidación. (SOD, superóxido dismutasa. GSH, Glutatión reducido, GSSG, glutatión oxidado).

1.3 NADPH-oxidasa

La NADPH-oxidasa es una enzima multimérica compuesta por las subunidades membranales Nox 2 y $p22^{phox}$, que juntas forman el flavocitocromo b^{558} , y por tres proteínas citosólicas: $p67^{phox}$, $p47^{phox}$, $p40^{phox}$ (Fig. 3).

Flavocitocromo b⁵⁵⁸

Está compuesto por Nox2 y p22^{phox} en un complejo 1:1 y es conocido como citocromo b⁵⁵⁸ por su espectro de absorción a 558 nm, y como citocromo b⁻²⁴⁵ por su potencial de oxidoreducción que es de -245V. La subunidad catalítica Nox2 es un flavocitocromo muy glucosilado de 570 aminoácidos, contiene sitios de unión a FAD y a NADPH y dos grupos hemo no idénticos, coordinados por dos pares de residuos de histidina (Biberstine-Kinkade *et al.*, 2001; Babior, 2004). Se ha propuesto que el flujo de electrones se mueve desde el NADPH al FAD y luego pasa a los grupos hemo hasta llegar al aceptor final que es el O₂.

p47^{phox}

Es una proteína compuesta de 390 aminoácidos, su secuencia COOH-terminal es muy básica y rica en residuos de serina y de arginina. La secuencia de aminoácidos de p47^{phox} también contiene dos dominios SH3, un dominio PX, y por lo menos una región rica en residuos de prolina, p47^{phox} se une al citocromo b⁵⁵⁸ durante su activación. p47^{phox} es la subunidad responsable de transportar el complejo citosólico (p47^{phox}-p67^{phox}-p40^{phox}) del citosol a la membrana plasmática durante la activación de la oxidasa. Es la organizadora de las subunidades de la NADPH-oxidasa, este proceso no ocurre *in vivo* sin una extensa fosforilación de p47^{phox}.

p67^{phox}

Es una proteína de 526 aminoácidos que también contiene dos dominios SH3, cuatro regiones tetratricopeptido-repite (TPR) y al menos una región rica en prolina. La p67^{phox} se asocia débilmente con el citoesqueleto y es fosforilada durante la activación de la enzima, pero en menor grado que p47^{phox}. Esta proteína interactúa con Rac 1/2 y con el citocromo b⁵⁵⁸ y puede regular su actividad catalítica mediante una secuencia llamada dominio de activación.

p40^{phox}

Es una proteína de 339 residuos de aminoácidos, la cual fue inicialmente identificada a través de su unión con p67^{phox}. Ésta contiene un dominio SH3 y un dominio PX, y es débilmente fosforilada durante su activación. La subunidad p40^{phox} no es requerida para la activación de la NADPH-oxidasa en un sistema libre de células. Su función *in vivo* es controversial.

1.4 NADPH-oxidasa no fagocítica y la familia NOX.

Diferentes especies celulares no fagocíticas son capaces de producir ERO. Recientemente se han identificado los homólogos de Nox2: NOX1, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 y DUOX2 (Lambeth *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2001). Las ERO que producen estas enzimas están vinculadas a diversos procesos fisiológicos, probablemente requiriendo que el O₂⁻ producido por ellas dismute a H₂O₂, que tiene mayor capacidad de difusión en los tejidos. Además, la producción no regulada de ERO por la NADPH-oxidasa puede participar en procesos patológicos como la hipertensión, la aterosclerosis, la diabetes y algunas enfermedades neurodegenerativas (Shimohama *et al.*, 2000; Cai *et al.*, 2003; Harrison *et al.*, 2003; Zekry *et al.*, 2003).

Se ha encontrado que NOX1, NOX3, NOX4 y NOX5 (Lambeth *et al.*, 2000) tienen una relación estructural muy cercana con NOX2, pero funcionalmente tienen algunas diferencias; (i) la NADPH-oxidasa de células no fagocíticas parece generar bajos niveles de superóxido, incluso en células no estimuladas, (ii) aunque su actividad puede no estar regulada en algunas condiciones patológicas, la producción de superóxido es mucho menor que en neutrófilos activados, (iii) una proporción importante del superóxido que se genera es intracelular, mientras que en los neutrófilos activados se considera que el O₂⁻ se genera en el compartimento extracelular (Li y Shah, 2003).

1.5 Activación de la NADPH oxidasa

En el estado basal, las subunidades p67^{phox}, p47^{phox} y p40^{phox} se encuentran como un complejo pre-ensamblado en el citosol. Al activarse la NADPH-oxidasa, estas subunidades se translocan a la membrana, para lo cual la subunidad p47^{phox} se fosforila en múltiples residuos de serina (Hoyal *et al.*, 2003), lo que elimina la conformación auto inhibida de p47^{phox} y se expone un dominio SH3 en el extremo amino que puede interactuar con el dominio rico en residuos de prolina de p22^{phox}. La subunidad p47^{phox} fosforilada puede unir fosfoinosítidos, lo que también contribuye a su estabilización en la membrana (Ago *et al.*, 2003). La GTPasa Rac se recluta a la membrana de manera independiente del resto de las subunidades (Babior, 2004) para activar a la NADPH-oxidasa (Fig. 3).

En la célula existen sistemas antioxidantes como el glutatión, y sistemas enzimáticos como el de la superóxido dismutasa (SOD) y el de la catalasa, que protegen a la célula del daño generado por la oxidación (figura 2). En algunos modelos experimentales se ha visto que los antioxidantes pueden prevenir la muerte celular (Valencia y Morán, 2001, Pedruzzi *et al.*, 2004, Valencia y Kochevar, 2006). Los ratones deficientes de SOD2 desarrollan cardiomiopatía y neurodegeneración, demostrando la importancia de los sistemas antioxidantes en el funcionamiento normal del organismo (Mc Cord, 1994).

Diferentes grupos han propuesto que la generación de ERO puede ser considerada un estímulo tanto inductor como ejecutor e incluso regulador de la muerte apoptótica (Kroemer, 1998, Nicholls y Budd, 2000, Valencia y Morán, 2001; Maycotte *et al.*, 2010). La muerte apoptótica en las NGC inducida por privación de potasio muestra un incremento en la producción de ERO a tiempos cortos; esta muerte puede ser prevenida por la administración de antioxidantes. Se ha sugerido que una de las principales ERO involucrada en este mecanismo es el anión superóxido. En general se puede decir que en condiciones fisiológicas, las ERO actúan como moduladores de las vías de transducción, ya sea como segundos mensajeros o como intermediarios de

reacción (Suzuki et al, 1997; Valencia y Morán, 2001; Ramiro Cortés y Morán, 2009).

NADPH-oxidasa Fagocítica (NOX2)

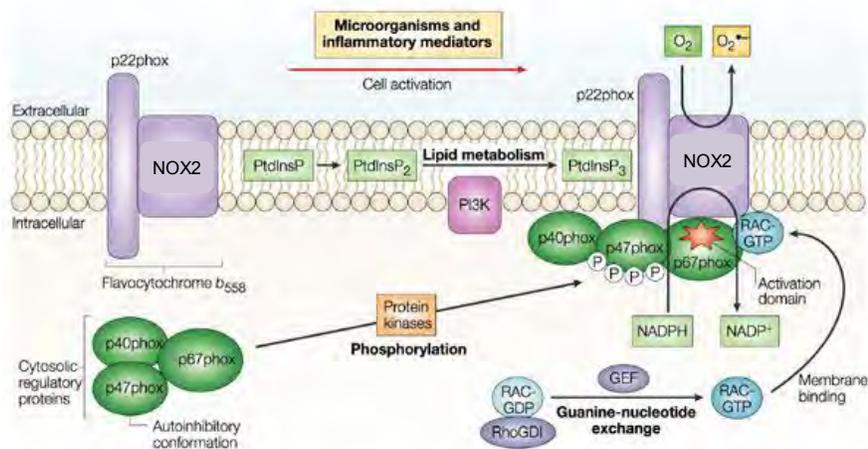


Fig. 3. Modelo de la estructura de la NADPH-oxidasa fagocítica y de su activación.

La activación de NOX2 ocurre, al menos, por tres disparadores de señalización que culminan con el ensamblaje de las proteínas reguladoras y el flavocitocromo b⁵⁵⁸. Ellos son; proteínas cinasas (PKC ó AKT) que fosforilan a p47^{phox}, enzimas metabolizadoras de lípidos (PI3K y fosfolipasa D) que producen fosfatidilinosoles 3P y ácido fosfatídico para que los dominios PX de p47^{phox} y p40^{phox} puedan unirse. Y, por último, proteínas intercambiadoras de nucleótidos que activan a Rac. Así se forma el complejo activo (Lambeth, 2004).

1.6 Inhibidores de la NADPH-oxidasa.

La NADPH oxidasa puede ser inhibida por varias moléculas endógenas entre las que destacan el óxido nítrico, esteroides, adrenalina, IL-10 e IL-4. Se han descrito algunos inhibidores exógenos de la enzima y entre los más usados están el difenil iodonio (DPI), que inhibe el transporte de electrones por Nox2

pegándose al sitio de unión a FAD; apocinina, y 4-(2-aminoetil)-benzeno-sulfonil fluorado (AEBSF), que inhiben a la NADPH-oxidasa, evitando el ensamblaje del complejo enzimático.

Existen numerosos estudios acerca de la participación de las ERO producidas por la NADPH-oxidasa tanto en condiciones fisiológicas (Shiose et al., 2001; Banfi et al., 2004; Kawahara et al.; Lee et al., 2005; Aima et al., 2010) como patológicas (Moreno et al., 2002, Soresca et al, 2002; Gorin et al., 2005). Los trabajos se han hecho en diversos tipos de tejido como el colón, el riñón, el hueso, etc. En el SN, los estudios relacionados con este complejo se han centrado en neuronas. Existe muy poca información sobre el papel que juega la NADPH-oxidasa de las células gliales, particularmente de astrocitos, en los procesos fisiológicos y patológicos del SN.

1.7 Células gliales.

El SN se compone por diferentes tipos celulares, que en su mayoría están representados por neuronas y células gliales. Estas últimas constituyen el 90% de las células en el cerebro humano y desempeñan una serie de funciones esenciales para la formación, mantenimiento y funcionamiento del sistema nervioso (Jessen, 2004; Hea, 2007).

Existen distintos tipos de células gliales en el SNC: los oligodendrocitos, las células de Schwann, la microglia y los astrocitos. Cada tipo glial desempeña funciones diferentes y presenta características únicas. Los oligodendrocitos y células de Schwann son células con poco citoplasma alrededor del núcleo, con procesos que se envuelven en si mismos alrededor de los axones de las neuronas y forman las cubiertas mielinizantes que permiten la propagación de los impulsos nerviosos (Jessen, 2004; Ness, 2005). La microglia se conforma por células con soma pequeño y varios procesos bifurcados que tienen alta movilidad (Hea, 2007; Pocock, 2007); su origen embrionario es distinto del de las demás células gliales,

pues derivan de progenitores extravasculares (mieloide/mesenquimal) y de progenitores circulantes (monocitos y macrófagos); la microglia constituye el sistema inmune del SNC (Chan, 2007). Las primeras células gliales que surgen durante el desarrollo corresponden a la glia radiada, llamadas así por su forma bipolar alargada; estas células desempeñan un papel importante en la migración neuronal y en la producción de células neuronales y no neuronales, incluidos los astrocitos y oligodendrocitos. La mayor parte de los astrocitos y oligodendrocitos se generan en la zona subventricular (ZSV) la cual es la mayor zona germinal gliogénica. Distintas citocinas desempeñan un papel crítico en la diferenciación de estas células (Young, 1996; Ihrig, 2008).

1.8 Astrocitos

De las diferentes especies de células gliales, los astrocitos son las células más abundantes. Estas células poseen numerosos procesos que emergen radialmente y entretejen una compleja comunicación con los somas y procesos neuronales. Los astrocitos proveen un importante soporte estructural y metabólico (Wang y Bordey, 2008).

Bajo condiciones muy variadas los astrocitos son células capaces de realizar múltiples funciones, las que dependen de su localización e interacción con distintos tejidos y/o tipos celulares. Por ejemplo, los astrocitos participan en la formación de las sinapsis (sinaptogénesis) y modulan su eficacia y mantenimiento mediante la liberación de distintas señales (Barres, 2001). Además, estas células poseen receptores a distintos neurotransmisores que pueden ser activados durante la transmisión nerviosa, y conducir a la elevación de Ca^{2+} y a la liberación de glutamato modulando la transmisión sináptica y la excitabilidad neuronal (Haydon, 2001). Esta elevación en el calcio puede propagarse a través de los astrocitos (enlazados mediante uniones estrechas), pudiendo modular la actividad neuronal en una zona distinta a aquella en la que se originó el estímulo (Rochon, 2001).

Por otro lado, los astrocitos son capaces de regular la homeostasis extracelular mediante mecanismos moleculares que permiten remover y metabolizar neurotransmisores como glutamato (previniendo la neurotoxicidad mediada por glutamato) y GABA (Chen, 2003). Otra función de gran importancia que desempeñan los astrocitos es la remoción de K^+ extracelular que se acumula durante largos periodos de actividad neuronal y que evita la alteración de la excitabilidad eléctrica de las neuronas (Walz, 2000; Gee, 2005).

Además de su papel en el mantenimiento fisiológico, los astrocitos tienen una importante respuesta al daño y a la enfermedad. Las reacciones más comunes de los astrocitos en condiciones patológicas son el hinchamiento celular, la hipertrofia-hiperplasia (astrogliosis) y la proliferación (astrocitosis). Estas reacciones pueden ocurrir en respuesta a infecciones virales, como en la demencia inducida por el VIH-SIDA, o por daño traumático al cerebro, como por isquemia/hipoxia, esclerosis múltiple, síndrome de Down y enfermedad de Alzheimer (Pekny, 2007, Heales, et al, 2004, Bambrick et al, 2004, Sheline et al, 2004) entre otras.

En las primeras etapas del daño al SNC, los astrocitos reactivos tienen un efecto protector sobre las neuronas participando en distintos procesos biológicos como la regulación de iones extracelulares y niveles de neurotransmisores, la reparación de la matriz extracelular, el soporte trófico a las neuronas y la protección de las células contra un estrés oxidante (Wang and Bordey, 2008); sin embargo, una respuesta prolongada de los astrocitos (reactividad) puede interferir en otros procesos como son la regeneración de nervios y algunos productos producidos por los propios astrocitos. Esta situación puede resultar adversa y estar involucrada en algunas patologías como ocurre en algunas enfermedades neurodegenerativas (Mahesh, 2006). Durante la gliosis reactiva ocurre una muerte considerable de astrocitos, que puede propagarse a las células vecinas e incrementar la muerte de los astrocitos. Tradicionalmente se ha aceptado que en

astrocitos la muerte necrótica es predominante en los modelos de daño al SNC; sin embargo, recientemente se ha acumulado evidencia apuntando a que la muerte apoptótica tiene una mayor trascendencia en procesos fisiológicos y patológicos en el SNC (Croisier, 2006).

Los astrocitos son células capaces de adquirir distintas morfologías dependiendo del lugar donde se localicen y su interacción con distintos tipos celulares. *In vivo* se han descrito morfológicamente 2 tipos de astrocitos. Unos poseen forma de estrella con procesos largos que sobresalen alrededor del soma, se localizan en la materia blanca y son llamados astrocitos fibrosos. El otro tipo tiene forma aplanada, con una morfología amorfa, semejantes a fibroblastos, y se conocen como astrocitos poligonales o protoplásmicos y se localizan tanto en la materia blanca como en la materia gris. Ambos tipos de astrocitos son positivos al anticuerpo contra la proteína glial fibrilar ácida (GFAP) aunque muestran una serie de características bioquímicas distintas. Los astrocitos tipo 1 además de expresar GFAP, expresan también la glicoproteína Ran-2, no expresan gangliósido GD3, tienen aspecto poligonal y no derivan de las células O-2A. Los astrocitos tipo 2 expresan GFAP, no expresan Ran-2, expresan GD3, tienen forma estrellada y derivan de las células O-2A (células progenitoras que pueden derivar en oligodendrocitos o astrocitos de este tipo (Blázquez, 2001).

También es común encontrar astrocitos con características intermedias entre los dos tipos, lo que sugiere que posiblemente ambas morfologías son intercambiables (Safavi-Abbasi, 2001; Karasek, 2004; Wang y Bordey, 2008).

2. ANTECEDENTES

Las células gliales forman parte del Sistema Nervioso (SN). Es sabido que los astrocitos son las células gliales más abundantes en el cerebro. De un tiempo a la fecha, se ha descubierto que los astrocitos juegan un papel de gran importancia para el funcionamiento del SN, así como en las patologías y aún en la muerte de las células que lo conforman.

Uno de estos papeles, es la defensa contra las ERO ya que los astrocitos tienen un alto contenido de antioxidantes. Esta afirmación se apoya en los datos que revelan que las neuronas en cultivo son más vulnerables a compuestos como H_2O_2 , peroxinitrito e hidroxidopamina que las células astrogiales en cultivo (Dringen, R, 2000, Watts et la., 2005). En la mayoría de las regiones del SN, los astrocitos forman una envoltura casi continua alrededor de los cuerpos celulares y de los procesos de poblaciones completas de neuronas.

Recientemente se han descubierto enzimas cuya única función bioquímica es la producción de ERO, incluida la NADPH-oxidasa. Este complejo genera ERO de manera regulada y produce ERO en varias células y tejidos como respuesta a factores de crecimiento, citocinas y señales de calcio (Lambeth, 2004). En investigaciones de nuestro grupo y de otros se ha demostrado la presencia de esta enzima en neuronas y astrocitos de cerebelo (Abramov et al., 2004, Coyoy et al., 2008, Liu et al, 2004, Reinher, 2007).

La participación de esta enzima en la iniciación o preservación de estados patológicos, es importante. Por ejemplo, el péptido β amiloide causa una disfunción neuronal por la activación calcio-dependiente de una NADPH- oxidasa de astrocitos (Abramov, et al., 2004) asociado a un incremento en la actividad de la NADPH-oxidasa (Shimohama, 2000). En el hinchamiento hipoosmótico inducido por amonio hay una activación de NADPH-oxidasa en astrocitos, lo que conlleva a las neuronas vecinas a un aumento en la sensibilidad al glutamato, a la inhibición de la cadena respiratoria y al vaciamiento neuronal de ATP de modo reversible (Stewart, et al., 2000).

Por otro lado, existe controversia en cuanto a la participación de NADPH-oxidasa en la producción de ERO asociada a la muerte celular. Por ejemplo, Liu et al. (2004), reportaron que la inhibición de la enzima NADPH-oxidasa induce la muerte de astrocitos, mientras que en neuronas se ha descrito que la generación de ERO por una NADPH-oxidasa conduce al daño de macromoléculas como lípidos, proteínas y ADN y muerte apoptótica (Coyoy et al, 2008; Güemez-Gamboa y Morán, 2009; Hernández-Martínez et al, en prensa).

Basados en estos antecedentes, y en la poca información acerca del papel de la NADPH-oxidasa en astrocitos, nos interesamos en investigar si los astrocitos de cerebelo expresan NADPH-oxidasa y si este complejo participa en la muerte celular.

3. HIPOTESIS

Si la generación de ERO por activación de la NADPH-oxidasa constituye una señal inicial en la muerte celular, la inhibición de su actividad inducida por estaurosporina reducirá o retrasará el proceso de muerte en astrocitos.

4. OBJETIVO

Evaluar la expresión de la NADPH-oxidasa en astrocitos de cerebelo en cultivo y determinar su participación en la muerte de éstos inducida por St.

OBJETIVOS PARTICULARES

Evaluar la viabilidad de astrocitos en cultivos primarios tras la estimulación por St.

Conocer la expresión de NADPH-oxidasa en astrocitos de cerebelo en cultivo.

Evaluar el efecto de los inhibidores de la NADPH-oxidasa en condiciones fisiológicas y de muerte celular inducida por St.

5. METODOLOGIA

5.1 Cultivo celular

Se utilizaron cultivos primarios de astrocitos obtenidos de cerebelo de ratas Wistar de 8 días de nacidas (Morán, 1989). La suspensión celular fue sembrada a una densidad de 0.8×10^6 en cajas de plástico y sobre cubreobjetos en cuyo caso, fueron previamente cubiertos por poly-L-lisina a una concentración de 5-25 $\mu\text{g/ml}$. El medio de cultivo utilizado se constituye por medio basal Eagle suplementado con suero fetal bovino inactivado por calor al 10%, glutamina 2 mM, penicilina 50 U/ml y estreptomycinina 50 $\mu\text{g/ml}$. Los cultivos fueron incubados a 37°C en una atmósfera húmeda, con una presión parcial de CO_2 5% y 95% aire. Después de 8 días en cultivo, se cambió el medio de las células por medio fresco, cada tercer día hasta su uso.

5.2 Inducción de muerte

La muerte de astrocitos se indujo con estaurosporina (St), un inhibidor de proteína cinasa C que se ha demostrado que induce muerte apoptótica en diferentes modelos experimentales. Las células se trataron con St (0.1 – 0.5 μM) por diferentes tiempos (desde 15 min hasta 48h).

5.3 Viabilidad celular

5.3.1. MTT

La viabilidad celular se midió por la técnica de transformación de 3-(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) que se basa en la transformación del compuesto en azul de formazán debida a la actividad mitocondrial de las células vivas. Los astrocitos se incubaron durante 15 minutos con MTT (0.5 mg/ml) a 37°C . Se retiró el medio y se extrajo el azul de formazán con DMSO al 100% para hacer una cuantificación espectrofotométrica a una D.O. de 570 nm. Los resultados de la viabilidad se reportan como absorbancia (directamente

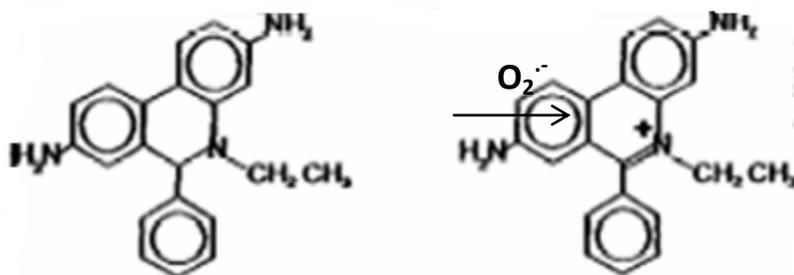
proporcional a la viabilidad celular) y como referencia se representa al control como 100%.

5.3.2. Calceína-AM/ioduro de propidio

Otra técnica empleada para cuantificar la viabilidad, fue la incubación de las células con $1\mu\text{M}$ de calceína-AM/ioduro de propidio. La calceína es un fluorocromo permeable a la membrana celular que dentro de la célula es procesado por esterasas y fluoresce al excitarse a una longitud de onda de 520 nm. El ioduro de propidio entra a la célula cuando ésta se encuentra dañada. Las células tratadas con St y con antioxidantes o inhibidores de la NADPH- oxidasa, fueron incubadas 15 min con calceína y 10 min con IP, posteriormente se lavaron con PBS y se observaron al microscopio para determinar el número de células muertas.

5.4 Detección de ERO.

Se determinó la producción de ERO mediante microscopía de fluorescencia usando dihidroetidina, la cual se transforma en etidio cuando es oxidada por el O_2^- , éste se intercala con el ADN, lo que permite observar el núcleo de la célula de color rojo.



Hidroetidina

Etidio

Simultáneamente, para hacer la co-localización de los núcleos marcados con etidio, se utilizó Hoechst que es un colorante lipofílico fluorescente capaz de marcar el ADN y es utilizado comúnmente para visualizar los núcleos y las mitocondrias de las células. El Hoechst es excitado con luz ultravioleta alrededor de 350 nm y emite una luz azul fluorescente alrededor de una longitud de 460 nm.

Las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos y 1 día después de realizar el último cambio de medio se hicieron los tratamientos respectivos y después de 2h se incubaron a 37°C con dihidroetidina (3.2 µM) durante 30 min. Posteriormente las células se lavaron tres veces con buffer de fosfatos (PBS), se fijaron con formaldehído al 4% a 4°C durante 15 min, se retiró el fijador y se lavaron con PBS. Las células se incubaron con Hoechst 32258 (0.1%) durante 10 minutos y se lavaron con PBS 2 veces más. Las preparaciones se montaron con PBS-glicerol 1:1 v/v. Las preparaciones se observaron en un microscopio de fluorescencia (Nikon Diaphot TMD, Nikon Corporation, Japón) usando el filtro UV-2B para observar los núcleos marcados con Hoechst y con un filtro 2G de rodamina (ex 510-560 y em 590 nm) las marcadas con etidio.

5.5 Actividad de NADPH-oxidasa

Para calcular la actividad de la enzima NADPH-oxidasa se utilizó la técnica descrita por Shpungin y col. (1989) que la mide indirectamente a través de la reducción de citocromo c por el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) formado, como se muestra en la siguiente reacción:



La producción de $O_2^{\cdot-}$ se midió en un ensayo de cinética cuantitativa basado en la reducción de citocromo c. Las células cultivadas fueron homogenizadas en un amortiguador salino (KH_2PO_4 150 mM y Na_2PO_4 150 mM) a pH 7.4 suplementado con $MgCl_2$ 1 mM, EGTA 1 mM, NaN_3 2 mM y glicerol 50% (v/v). El homogenado se incubó con una mezcla de reacción que contiene 65mM de fosfato K-Na, pH 6.8 a 24°C durante 90s adicionado de citocromo c (86 µM), FAD (10 mM) y SDS (0.1 mM) y DTT (1%). La reacción se inició con la adición de 0.2 mM de NADPH, y la mezcla de reacción. La reducción de citocromo c se midió espectrofotométricamente a 550 nm por 60s. Finalmente se ajustó el resultado de

la actividad enzimática con la cantidad de proteína total por muestra. Los resultados se expresan como la diferencia de la absorbancia por hora por miligramo de proteína. La concentración de proteína fue determinada por el método de Bradford (1976).

5.6 Análisis de proteínas por Western Blot

Las células se homogenizaron en el amortiguador de lisis (25 mM Tris HCl; 50 mM NaCl; 1% (v/v) NP-40; 0.2% (w/v) SDS y una mezcla de inhibidores de proteasas. Los homogenados de astrocitos se separaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE, 10%) según Laemmli (1970). Las proteínas resueltas fueron transferidas a membranas de polifluoruro de vinileno (PVDF) a 100V por 1h. Las membranas fueron bloqueadas durante 1 h a temperatura ambiente con 5% de leche libre de grasas en TBS. Se incubaron los anticuerpos primarios anti-NOX1, anti-NOX4, anti-p22^{phox}, anti-p47^{phox} y anti-p67^{phox} (Santa Cruz California, USA), a una concentración de 1:100 durante toda la noche a 4°C. Después de lavarse, se trataron con un anticuerpo secundario anti-goat 1:12500 (ZyMax). Las bandas se visualizaron usando quimioluminiscencia (CDP-Star, Bio Labs), siguiendo el protocolo del fabricante y se expusieron a una placa Kodak X-OMAT-K.

5.7 Inmunocitoquímica

Se cultivaron los astrocitos sobre cubreobjetos durante 1.5 semanas. Se lavaron con PBS dos veces y se fijaron con formaldehído 20 min. Se bloquearon con una solución de suero fetal bovino (SFB)/PBS 2% y tritónX100 (0.003%) durante 2h a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron con los anticuerpos anti-NOX 1, anti-NOX4 anti-p67^{phox}, anti-p22^{phox} toda la noche. Se lavaron con PBS delicadamente y se incubaron durante 1h con el anticuerpo secundario Alexa 488 (1:500). Se montaron las preparaciones en portaobjetos y se observaron en microscopio de fluorescencia Zeiss.

5.8 Análisis estadístico

Los datos son expresados como medias \pm ES. La significancia estadística fue determinada mediante un análisis t de Student de una vía. Al menos tres experimentos independientes por triplicado usando diferentes cultivos fueron hechos para cada ensayo. En el caso de las micrografías, se hicieron 3 fotografías por campo (3 campos) de 3 experimentos. El valor de $p < 0.05$ fue aceptado para indicar diferencia estadística significativa.

En la figura 4 se muestran estos cambios en astrocitos de cerebelo de rata cultivados por 1.5 semanas y tratados con St 0.5 μM durante 24h, captados mediante microscopía de contraste de fases. La totalidad de células observadas correspondió a astrocitos con base en las observaciones con microscopía de fluorescencia utilizando un anticuerpo contra la proteína glial fibrilar ácida (GFAP), una molécula que se expresa exclusivamente en células gliales (astrocitos y células de Schwann) (Fig. 4). Es interesante notar que estos cambios ocurren dentro de los primeros minutos de iniciado el tratamiento con St.

6.2 La St induce muerte dependiendo de la concentración.

En primera instancia, se llevaron a cabo una serie de experimentos para evaluar el impacto de la St sobre la sobrevivencia de astrocitos. Para ello, las células se mantuvieron en cultivo durante 1.5 semanas y se trataron con St a diferentes concentraciones (0.1 μM , 0.25 μM y 0.5 μM) por 24h. Como se muestra en la figura 5, observamos que este compuesto reduce la viabilidad de los astrocitos de una forma dependiente de la concentración, observándose un 50% de células muertas después de exponer los cultivos a una concentración de 0.5 μM durante 24h.

6.3. La reducción en la viabilidad de astrocitos inducida por St es dependiente de tiempo.

La Figura 6 muestra que con una concentración de 0.5 μM ocurre una reducción de la viabilidad de 10%, 35% y 50% después de 6h, 12h y 24h de tratamiento, respectivamente. Después de 48h aún pueden observarse algunas células vivas (no mostrado). De estos resultados se desprende que la St es un inductor de muerte para este tipo celular y que la muerte depende del tiempo y de la concentración utilizada. Basados en estas observaciones, los siguientes ensayos de viabilidad se realizaron utilizando St a una concentración de 0.5 μM y a un tiempo de exposición de 24h.

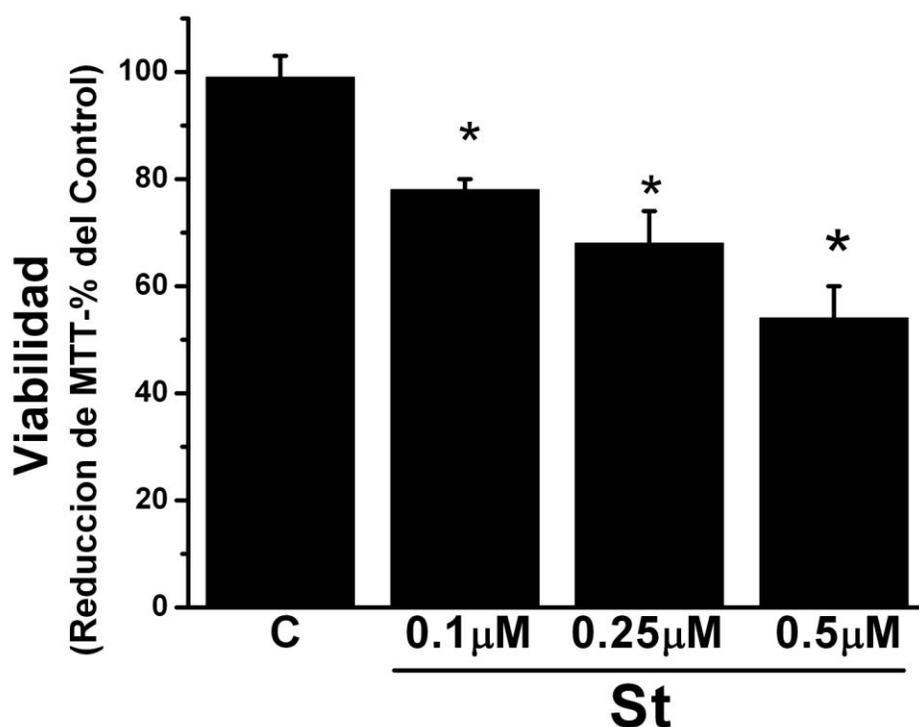


Fig. 5. Viabilidad de astrocitos tratados con distintas concentraciones de St. Se trataron las células con St a diferentes concentraciones (0.1 μM, 0.25 μM y 0.5 μM) y se monitoreó la viabilidad por MTT 24 hs después. Los resultados han sido normalizados y son promedios ± S.E.M. de 4 experimentos diferentes. *P ≤ 0.05 en comparación con el control.

Con la finalidad de evaluar la viabilidad utilizando otra estrategia experimental, se cuantificaron las células vivas teñidas con calceína-AM (400 nM) y las células muertas marcadas con ioduro de propidio (10 μM). Algunos astrocitos se dejaron intactos mientras que otros se trataron con St 0.5 μM durante 24h. Las figuras 7 y 8 muestran que, en las condiciones control, la gran mayoría de las células son positivas a calceína y que sólo unas cuantas se tiñen con ioduro de propidio. Esta relación se invierte notablemente en los astrocitos tratados con St, dato que coincide con la valoración realizada por la reducción de MTT.

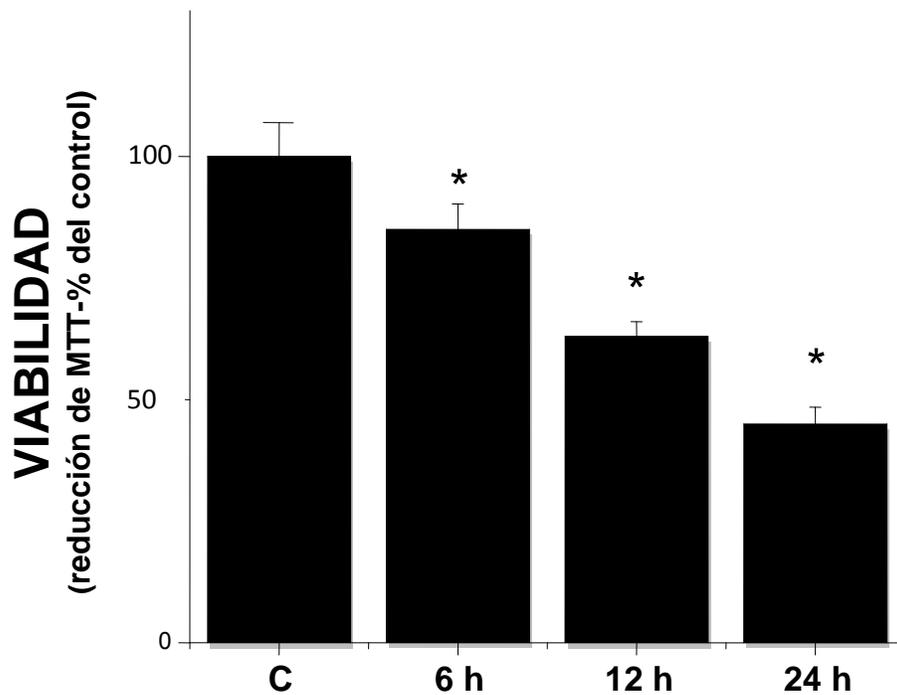


Fig. 6. Viabilidad de astrocitos tratados con St durante distintos períodos de tiempo. Se evaluó la viabilidad celular por la reducción de MTT a diferentes tiempos después de tratar a los astrocitos con St 0.5 μ M. La exposición a St por 6, 12 y 24 h, redujo la viabilidad celular 10%, 35% y 50%, respectivamente. Los resultados han sido normalizados y son promedios \pm S.E.M. de 4 experimentos diferentes. * $P \leq 0.05$ en comparación con el control. Estos resultados coinciden también con los datos obtenidos del conteo de núcleos marcados con Hoescht. La figura 9 muestra que después de 24 h de tratamiento con St el número de células se reduce 50% aproximadamente.

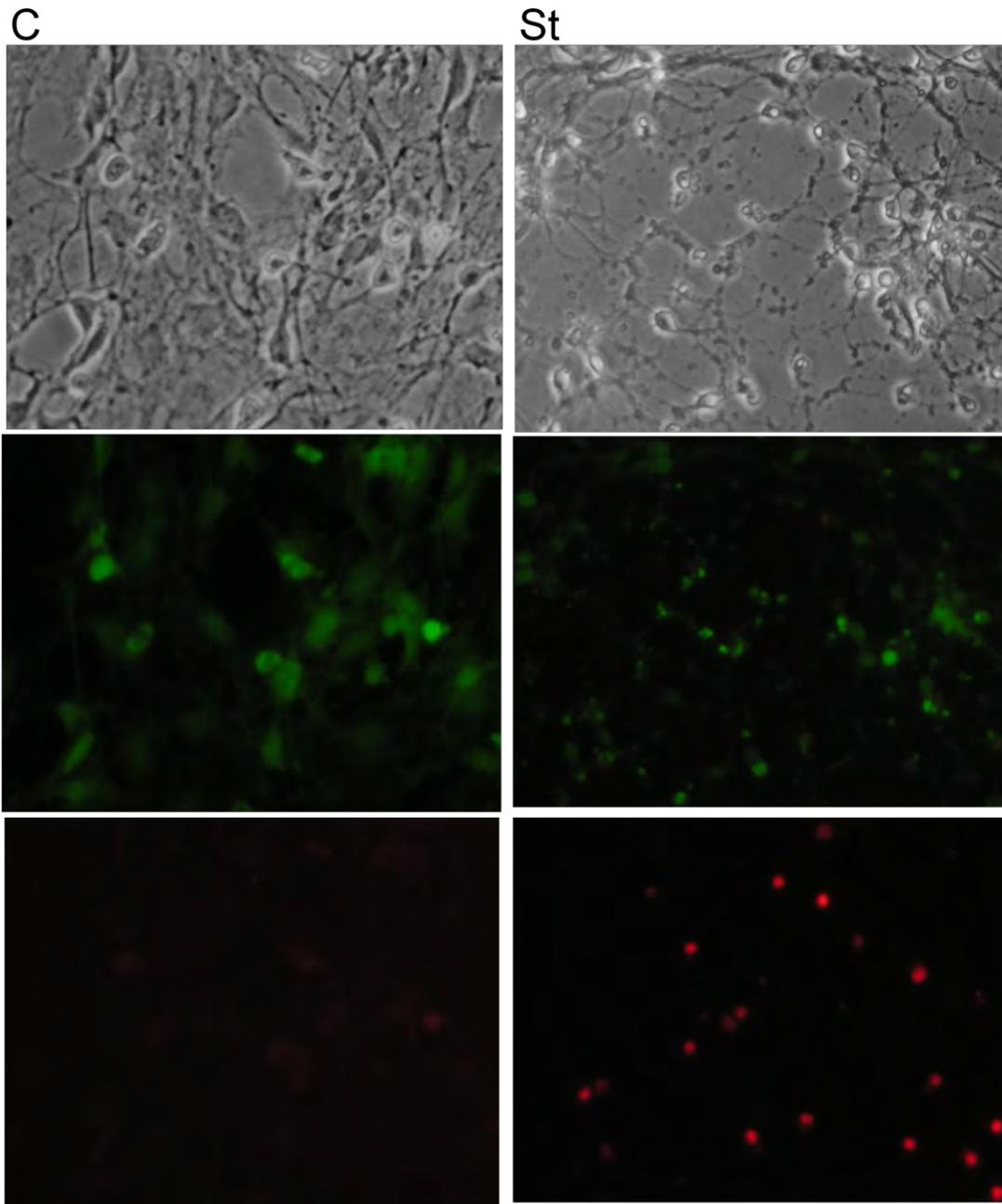


Fig. 7. Viabilidad de astrocitos por tinción con Calceína-AM vs IP. Las células positivas a IP (rojo) aumentan cuando son tratadas con St durante 24 h mientras que las positivas a Calceína (verde) disminuyen. Las fotografías de la izquierda muestran las células control (C) las de la derecha las células tratadas con St 0.5 μ M. (Ver protocolo en Metodología).

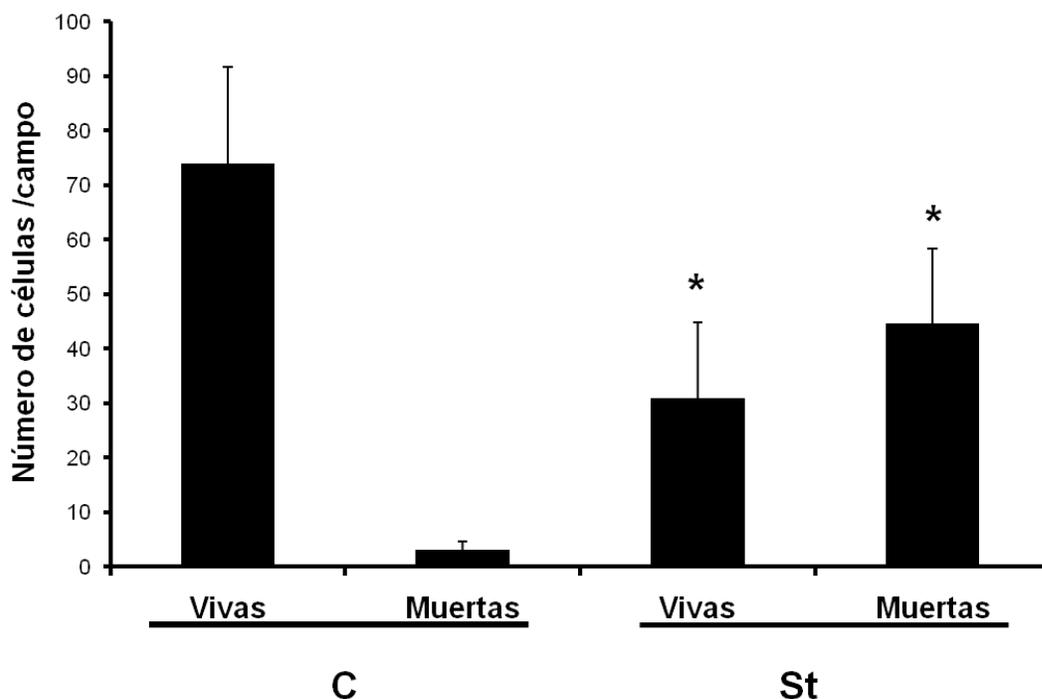


Fig. 8. Efecto de estaurosporina en el número de células vivas y células muertas. Se contaron las células control teñidas con calceína (vivas) y con IP (muertas) y las tratadas con St 0.5 μ M durante 24 h (Ver protocolo en Metodología). Los resultados son promedios \pm S.E.M. de 5 experimentos diferentes con 3 repeticiones por condición (3 campos c/u). * $P \leq 0.05$ en comparación con los controles.

6.4 La St induce la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO).

Uno de los eventos que participa en la muerte celular es la generación de ERO, por lo que en este estudio procedimos a cuantificar la producción de ERO inducida por St. La producción de ERO se determinó usando dihidroetidina (3.2 μ M). Bajo estas condiciones, se observó un aumento en la cantidad de ERO generadas cuando los cultivos se trataron con St 0.5 μ M por 2h (Fig. 10). Como un control positivo, se utilizó el sistema Xantina + Xantina oxidasa que es una condición pro-oxidante muy utilizada para evaluar la producción de ERO. La figura 10B muestra que la St multiplica de manera notable la producción de ERO con

relación a la células control. La figura 10A muestra imágenes representativas de células teñidas con etidio, indiativo de la presencia de ERO.

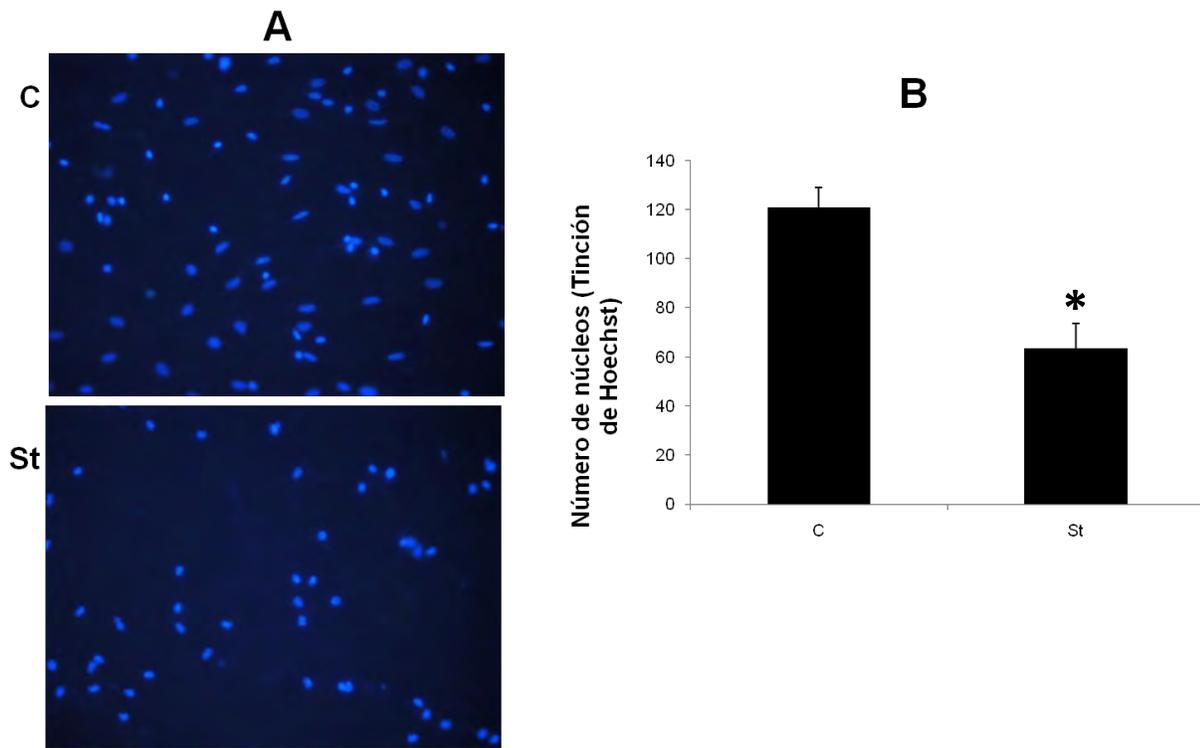
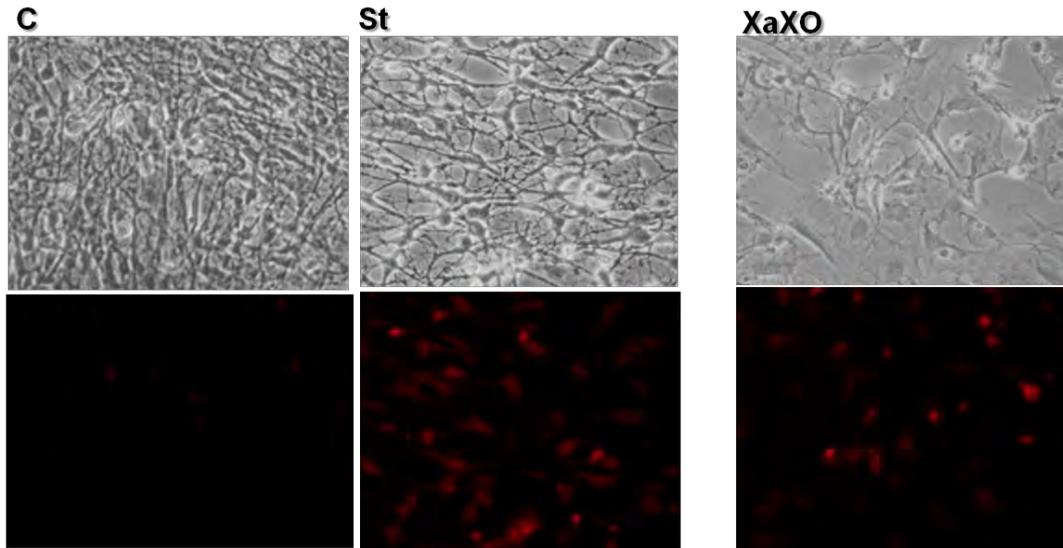


Fig. 9. La St reduce la viabilidad de astrocitos determinada por núcleos teñidos con Hoechst. Los astrocitos control (C) y los tratados con St 0.5 μ M por 24 h (St) se tiñeron con Hoechst 0.001% (véanse Métodos) y se observaron al microscopio de fluorescencia. Como puede apreciarse en el panel B, el número de células después del tratamiento con St se reduce 50% aproximadamente. Los resultados han sido normalizados y son promedios \pm S.E.M. de 3 experimentos diferentes con 3 repeticiones por condición (3 campos c/u). * $P \leq 0.05$ en comparación con el control

A



B

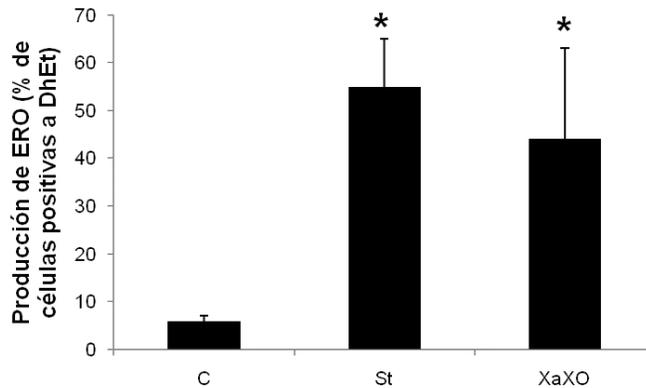


Fig. 10. Efecto de la St en la producción de ERO. Los astrocitos se trataron con St por 2h o con Xantina –Xantina Oxidasa, (XaXO) una condición pro-oxidante, durante 20 min. Se evaluó la generación de ERO con dihidroetidina (DhEt) como se indica en los métodos. A) Microfotografías representativas de astrocitos (contraste de fases y fluorescencia) positivos a DhEt. B) Las barras muestran el promedio normalizado \pm S.E.M de 5 experimentos (triplicado por condición con 3 campos cada uno). * $P \leq 0.05$ en comparación con el control.

Con la idea de conocer el curso temporal de la generación de ERO inducida por St se realizó una curva contra tiempo evaluando la oxidación de dihidroetidina en cultivos tratados con St $0.5 \mu\text{M}$. Como se aprecia en la figura 11, las ERO comienzan a formarse a partir de 1h del tratamiento y se observa un pico de

producción significativa a las 2h. En lo sucesivo los tratamientos con St para medir producción de ERO fueron de 2h.

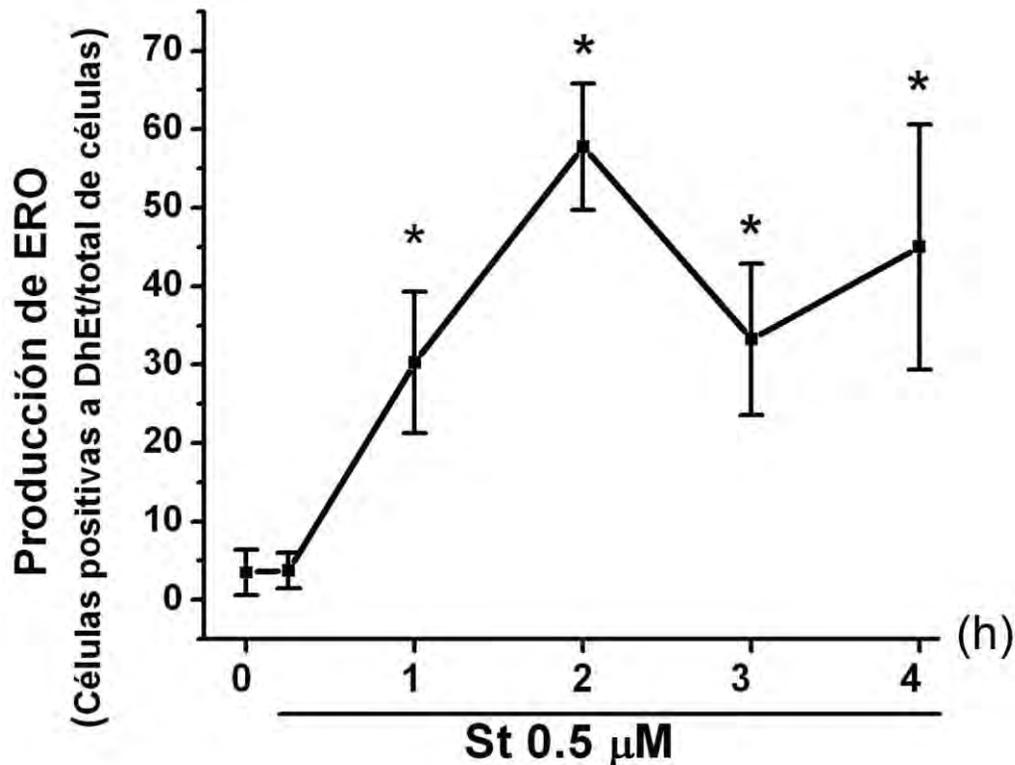


Fig. 11. Producción de ERO inducida por St en el tiempo. Se realizó una curva contra tiempo para evaluar la producción de ERO por la técnica de DhEt (ver Métodos). Los resultados son el promedio \pm S.E.M. de células positivas a DhEt/total de células por campo. (n=5, 3 repeticiones por experimento 3 campos c/u) *P \leq 0.05 en comparación con el control

6.5 Los antioxidantes reducen la producción de ERO inducida por St.

El uso de antioxidantes en los astrocitos tratados con St redujo la producción de ERO de manera significativa como puede notarse en la figura 12A. Cuando se trataron los astrocitos con St 0.5 μ M y simultáneamente con un flavonoide Kaempferol (20 μ M, Kaem) o un mimético de la superóxido dismutasa MnTMPyP

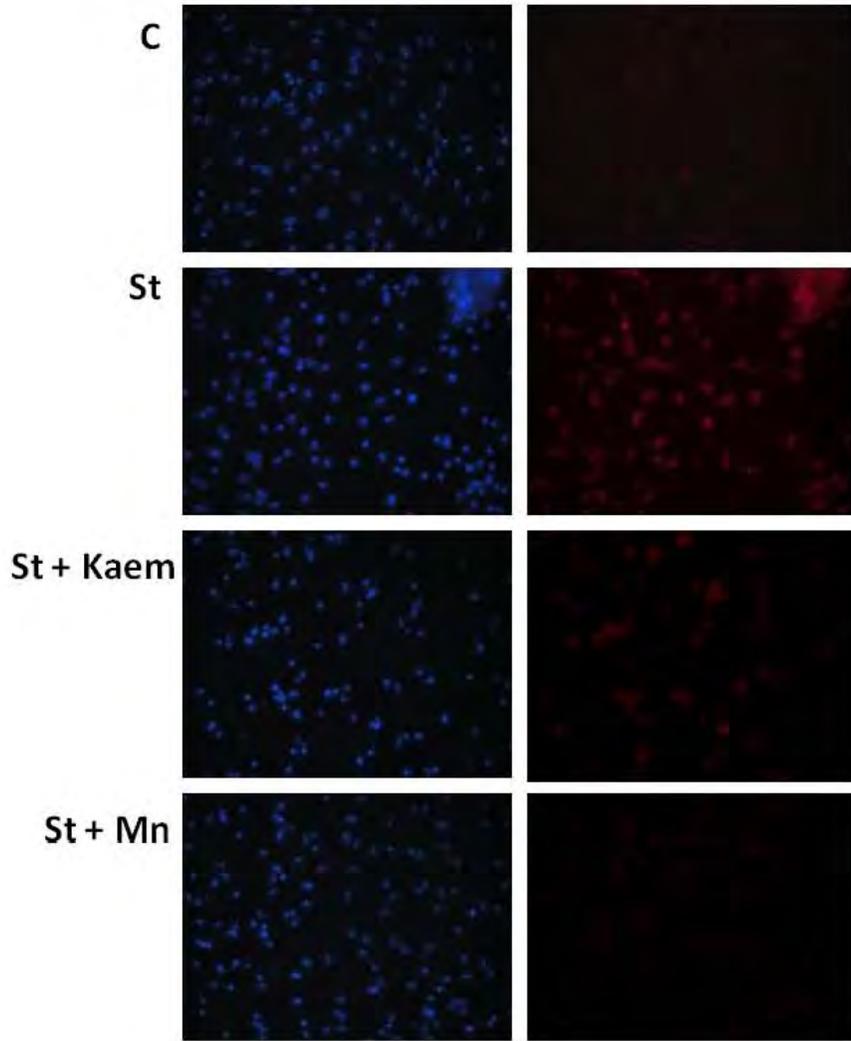
(50 μ M, Mn), se encuentra que la producción de ERO se reduce alrededor del 50% con relación a los astrocitos tratados únicamente con St (Fig. 12 B).

6.6 Las ERO participan en la muerte de astrocitos inducida por St.

En estudios previos se ha demostrado en diversos tejidos que las ERO participan como moléculas señalizadoras para la diferenciación, desarrollo o migración celular (Aimo et al, 2010, Tobar et al, 2008). En otros modelos las ERO se relacionan con la muerte (Güemez-Gamboa and Morán, 2009; Jian-Mei et al, 2007; Becker et al, 2006). En este estudio encontramos que una pequeña proporción de los astrocitos control son positivos a la marca de dihidroetidio por lo que nos propusimos definir si la reducción de ERO con el uso de antioxidantes inhibe o produce muerte en los astrocitos. Observamos que los antioxidantes como kaempferol y MnTMPyP administrados a los astrocitos control en cultivo durante 24h no afectan la viabilidad (no mostrado).

Por otro lado, el uso de estos antioxidantes disminuye la muerte de astrocitos inducida por St, evaluada tanto por el número núcleos teñidos con Hoechst (Fig. 13A) como por la relación de células marcadas con IP/calceína-AM (13B). Por lo que se observa que el kaempferol y el MnTMPyP reducen la muerte celular 50% (Fig. 13C).

A



B

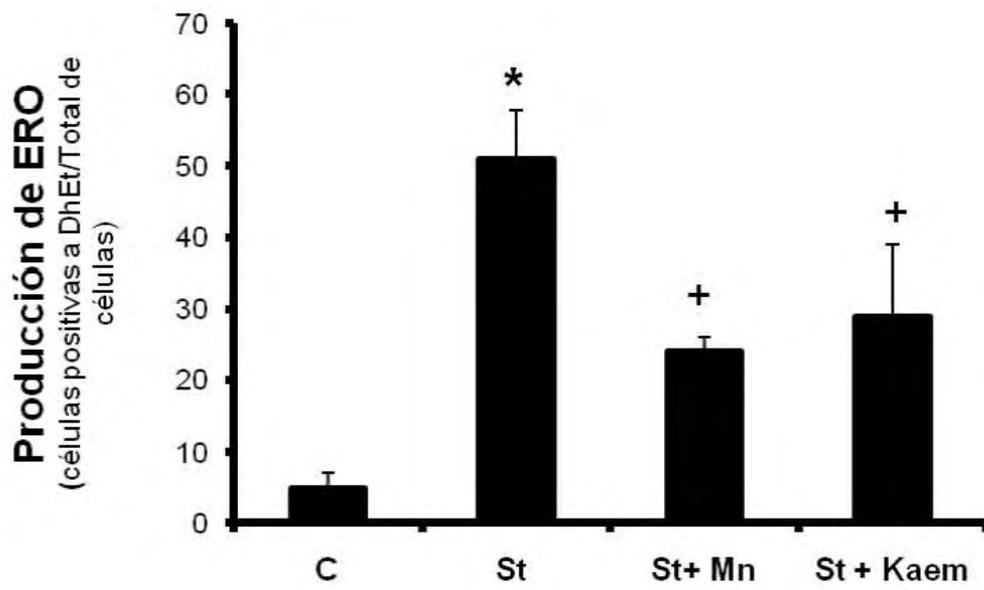


Fig. 12 Efecto de la administración de antioxidantes en los niveles de ERO inducido por St. Los astrocitos se trataron con St y 50 μ M de MnTMPyP (Mn) o 20 μ M de kaempferol (Kaem). A) Las fotografías muestran la producción de ERO medida con dihidroetidina (Ver métodos). B) Las barras son el promedio de células positivas a DhEt del total de células por campo \pm S.E.M. n=5, 3 repeticiones por experimento-3 campos c/u). $P \leq 0.05$ (*) comparada con el control (+) en comparación con St.

6.7 NADPH oxidasa se expresa en astrocitos.

Se ha descrito que una fuente de ERO involucrada en la muerte de neuronas es la NADPH-oxidasa. Esta enzima se ha encontrado en neuronas piramidales del hipocampo y en neuronas de Purkinje cerebelares (Mizuki *et al.*, 1998; Serrano *et al.*, 2003), entre otras, sin que se haya precisado su función.

En neuronas simpáticas en cultivo la NADPH-oxidasa parece tener un papel fundamental en la muerte neuronal apoptótica inducida por privación de NGF (Tammariello *et al.*, 2000). Por otro lado, en un estudio previo de nuestro grupo (Coyoy *et al.*, 2008) se demostró la presencia de ARNm y proteína de los homólogos de la subunidad catalítica de la enzima NOX 2 (gp91^{phox}), NOX 3 y NOX 4 en neuronas granulares de cerebelo. En este mismo trabajo se encontró que la NADPH-oxidasa participa en la generación de ERO que están implicadas en la muerte apoptótica de las neuronas granulares de cerebelo. Con base en estos antecedentes en el presente trabajo evaluamos la presencia de algunas subunidades de este complejo y encontramos por Western blot la expresión de las subunidades p22^{phox} y p67^{phox}, así como de los homólogos NOX 1 y NOX 4, como se muestra en la figura 15.

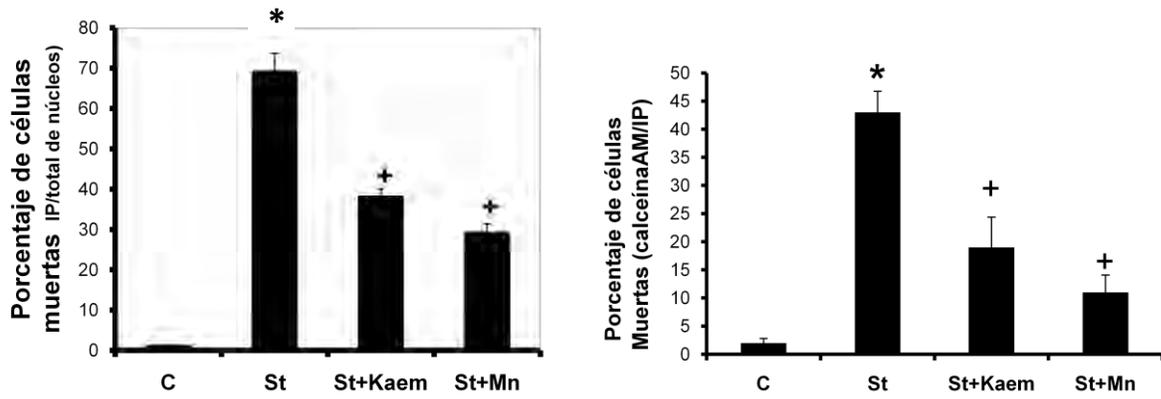
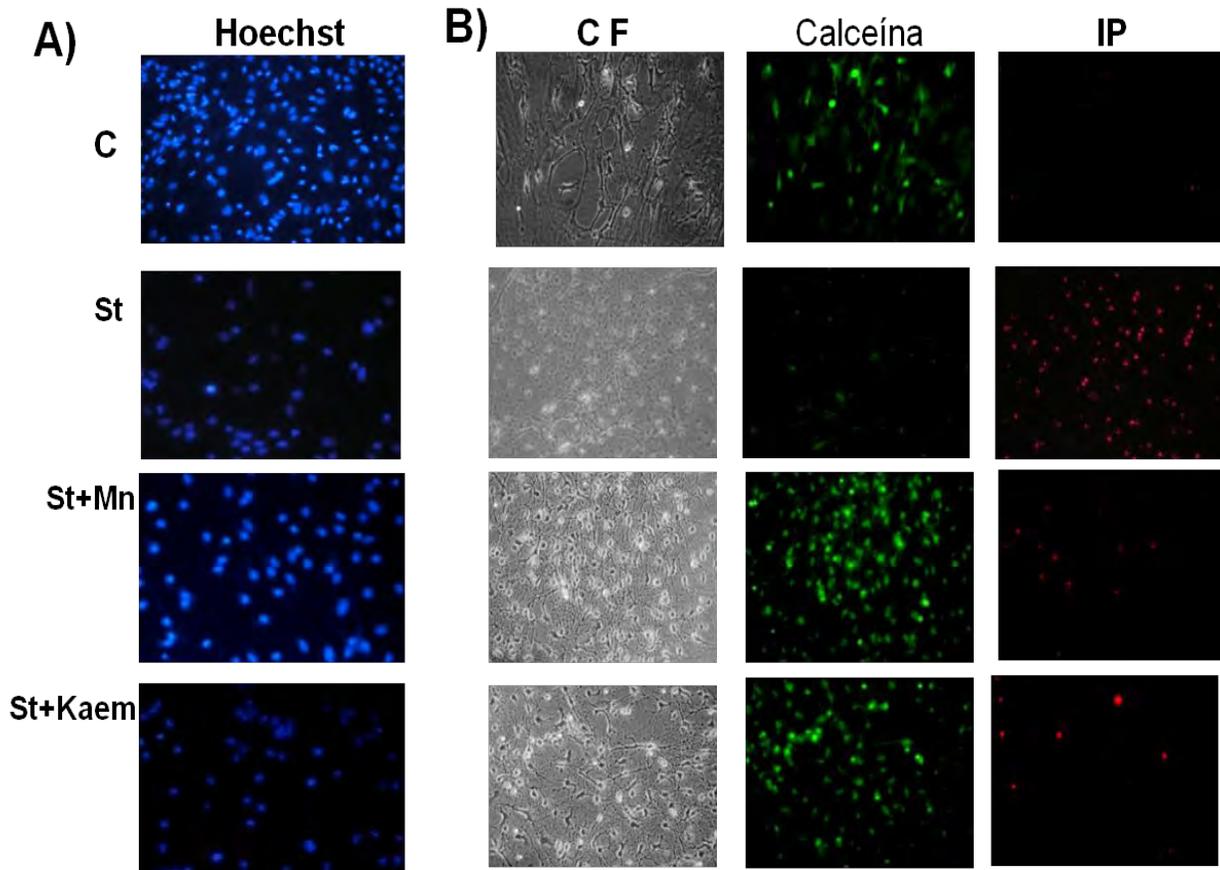


Fig. 13. Efecto de antioxidantes en la muerte de astrocitos inducida por St. Los astrocitos se trataron con St y antioxidantes (MnTMPyP (Mn), 50 μ M o Kaempferol Kaem (20 μ M) por 24 h y se midió la viabilidad por calceína-IP como se indica en métodos. A) Número de núcleos por condición teñidos con Hoechst. B) Microfotografías que muestran en verde las células vivas marcadas con calceína-AM y rojas las muertas marcadas con IP. Las barras son el promedio normalizado \pm S.E.M. de núcleos positivos a IP/total de núcleos teñidos con Hoechst por campo (n=5, 3 campos por 3 repeticiones por experimento). C) IP/Hoechst; D) IP/Calceína-AM ≤ 0.05 en comparación (*) con el control (+) con St.

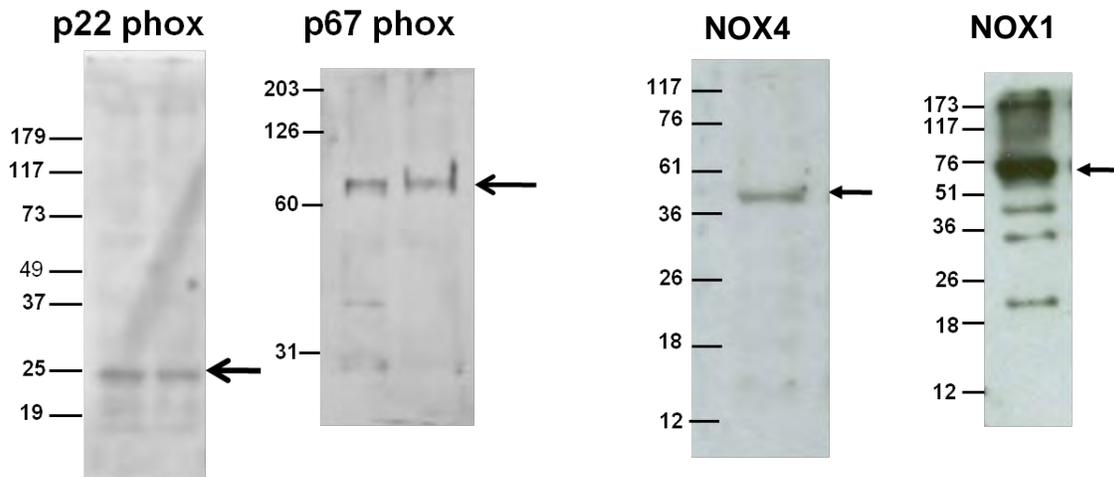


Fig 15. Expresión de p22^{phox}, p67^{phox}, NOX1 y NOX 4 en astrocitos de cerebelo de rata. Se lisaron los astrocitos después de 7 días en cultivo y se realizó un ensayo Western Blot como se indica en Métodos. Las flechas señalan la banda de cada subunidad indicada.

De igual manera, demostramos por inmunocitoquímica la presencia de la subunidades NOX 1 y p67^{phox} en los astrocitos en cultivo (fig. 16). Estos resultados junto con los obtenidos previamente apoyan nuestra hipótesis de que NADPH-oxidasa está involucrada en la producción de ERO en estas células

6.8 La NADPH-oxidasa se activa con St.

Puesto que St induce muerte, y aumenta la concentración de especies reactivas de oxígeno en los astrocitos, medimos la actividad de esta enzima en células tratadas con St para determinar si hay una participación de la NADPH-oxidasa bajo estas condiciones. En la figura 17 se muestra la actividad de la NADPH-oxidasa en células tratadas con St. Como puede observarse, hay un aumento en la actividad de la NADPH-oxidasa en relación con el control después de 2h de tratamiento. Esta actividad se inhibió en presencia de los inhibidores de la NADPH-oxidasa: 4-(2-aminoetil) benzesulfonil fluoruro

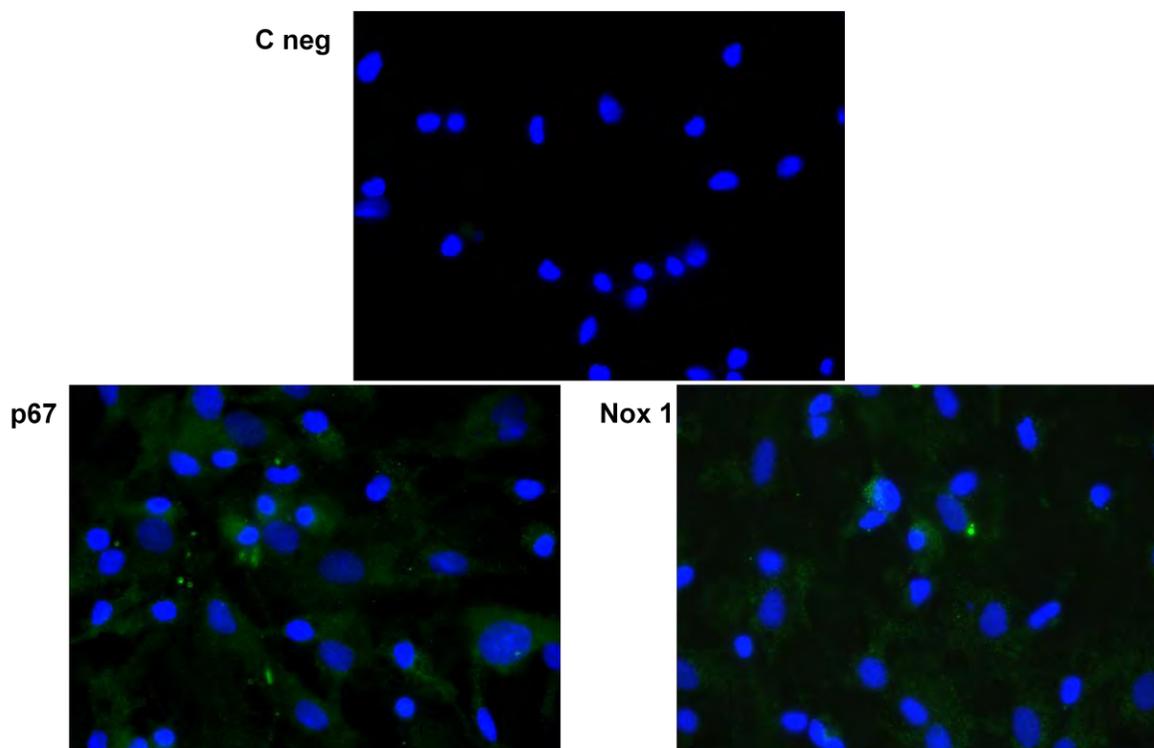


Fig. 16 Expresión de Nox 1 y p67^{phox} en astrocitos. Se cultivaron las células por 7 días y se hizo un ensayo de inmunocitoquímica para detectar la presencia de NOX 1 y p67^{phox} como se indica en Métodos. En verde, las subunidades indicadas. En azul, núcleos teñidos por Hoechst. C neg, control negativo, las células recibieron el mismo tratamiento pero únicamente se incubaron con el anticuerpo secundario.

hidrocloruro (AEBSF, 80 μ M), Apocinina (Apo, 750 nM) y difenil yodonio (DPI, 520 nM). Sin embargo, únicamente la apocinina inhibe dicha actividad de forma estadísticamente significativa.

6.9 La inhibición de la NADPH-oxidasa reduce la producción de ERO.

En congruencia con los resultados anteriores, encontramos que los inhibidores de la NADPH-oxidasa reducen de manera significativa la producción de ERO. Bajo estas condiciones AEBSF 80 μ M, apocinina 750 nM y DPI 520 nM redujeron la producción de ERO alrededor de 50%, 30% y 60%, respectivamente (Fig. 18)

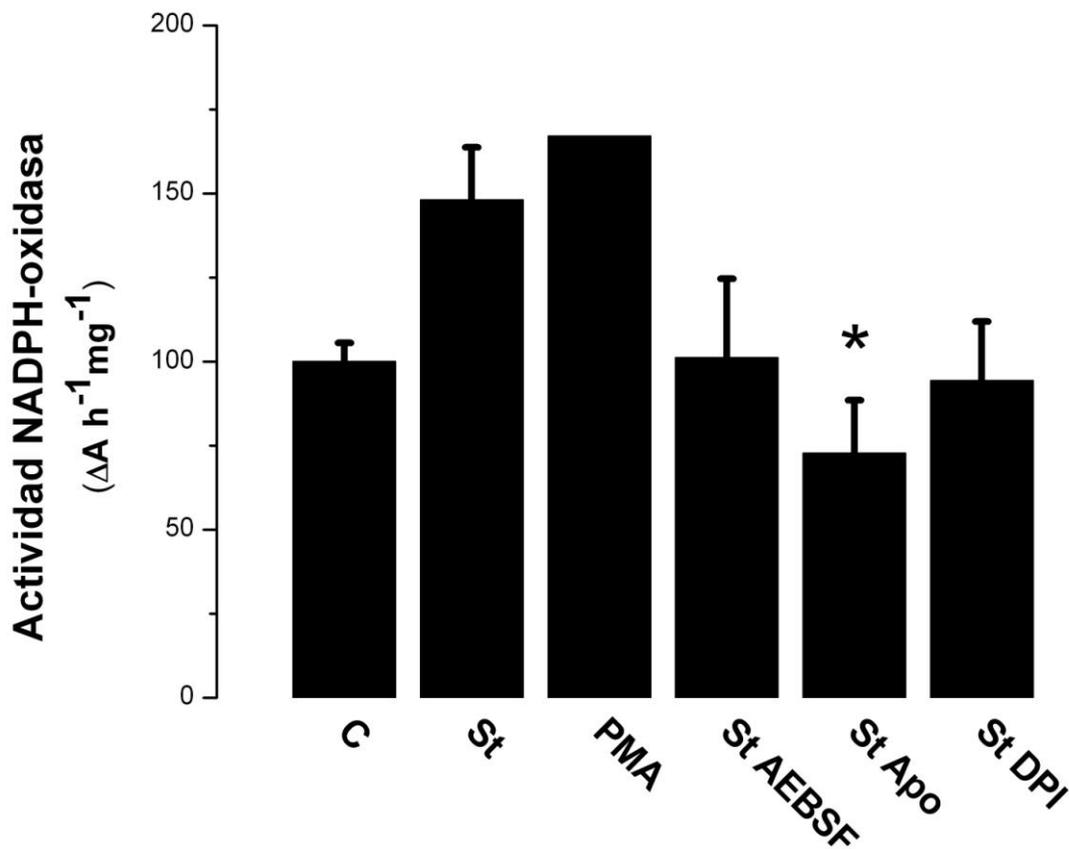


Fig. 17 Efecto de estaurosporina y de inhibidores de NADPH-oxidasa en la actividad de NADPH-oxidasa. Los astrocitos se trataron después de 1 semana en cultivo con St en ausencia y presencia de inhibidores de la enzima AEBSF (80μM), apocinina (Apo 750 nM), DPI (260 nM) o con un éster de forbol (PMA) durante 2 hs. La actividad de la enzima se midió por la reducción del citocromo C como se indica en Métodos. Los resultados se expresan como la media ± S.E.M de 3-6 experimentos independientes. (*) $P \leq 0.05$.

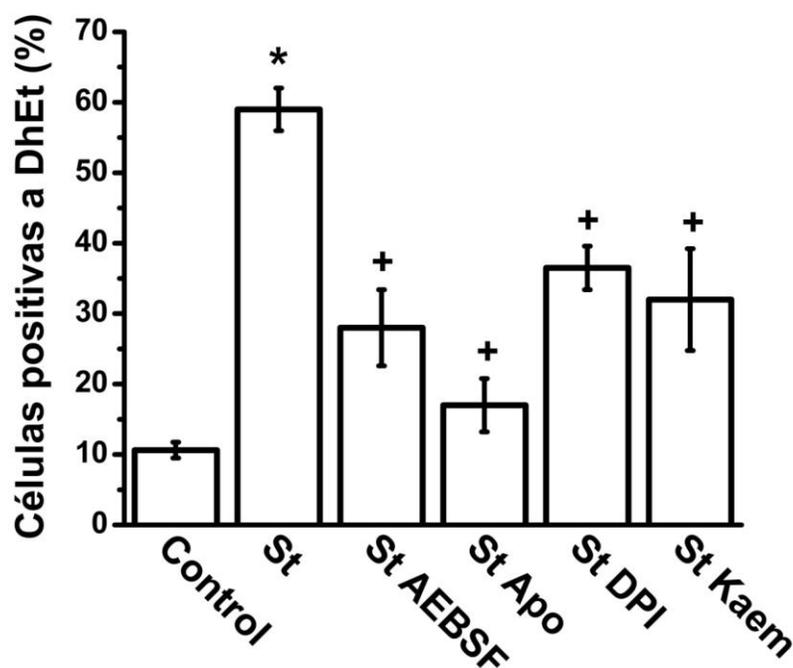


Fig. 18 Efecto de inhibidores de NADPH oxidasa en la producción de ERO inducida por estaurosporina. Después de 1.5 semanas en cultivo, los astrocitos fueron tratados durante 2 hs con St y los inhibidores de NADPH-oxidasa (AEBSF 80 μ M, Apocinina 750 nM, DPI 520 nM) o un antioxidante (Kaempferol 20 μ M). Se incubaron 15 min con DhEt y se realizó el experimento (ver Métodos). $P \leq 0.05$, $n=8$ en C y St ; $n=4$ St + inhibidores y St + Kaem(*) Significativa en relación con C; (+)Significativa en relación con St.

6.10 Participación de NADPH-oxidasa en la muerte de astrocitos.

En trabajos previos, nuestro grupo ha demostrado que las ERO son capaces de inducir la muerte celular por apoptosis en neuronas granulares de cerebelo, y que la NADPH-oxidasa es una fuente importante de estas ERO (Valencia y Morán, 2004; Coyoy et al, 2008; Güemez-Gamboa y Morán, 2009).

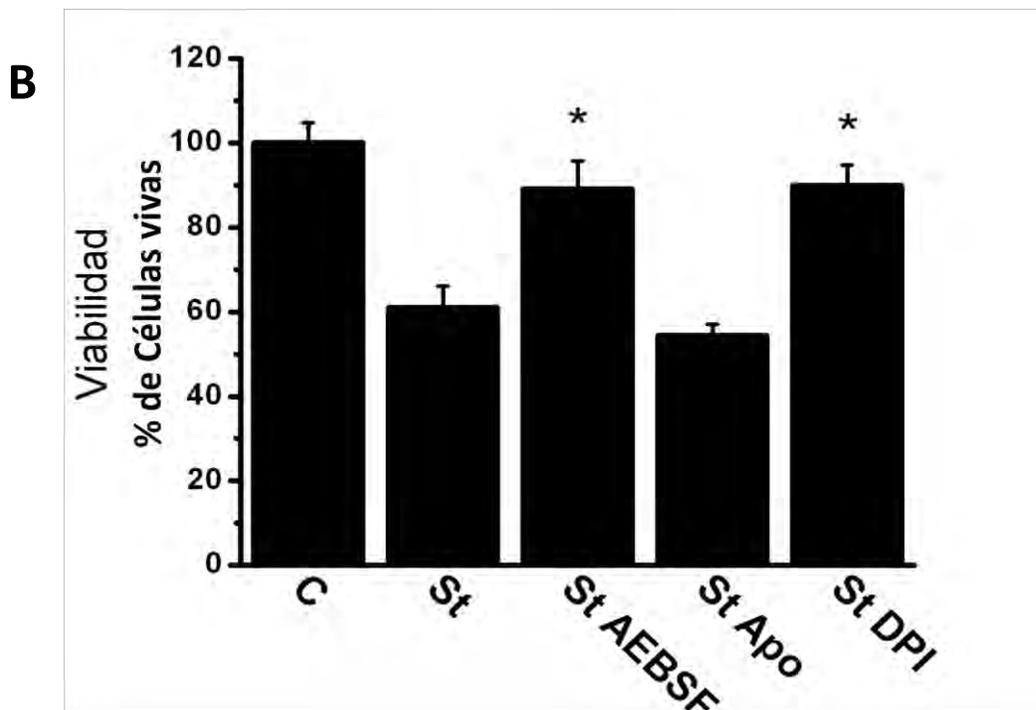
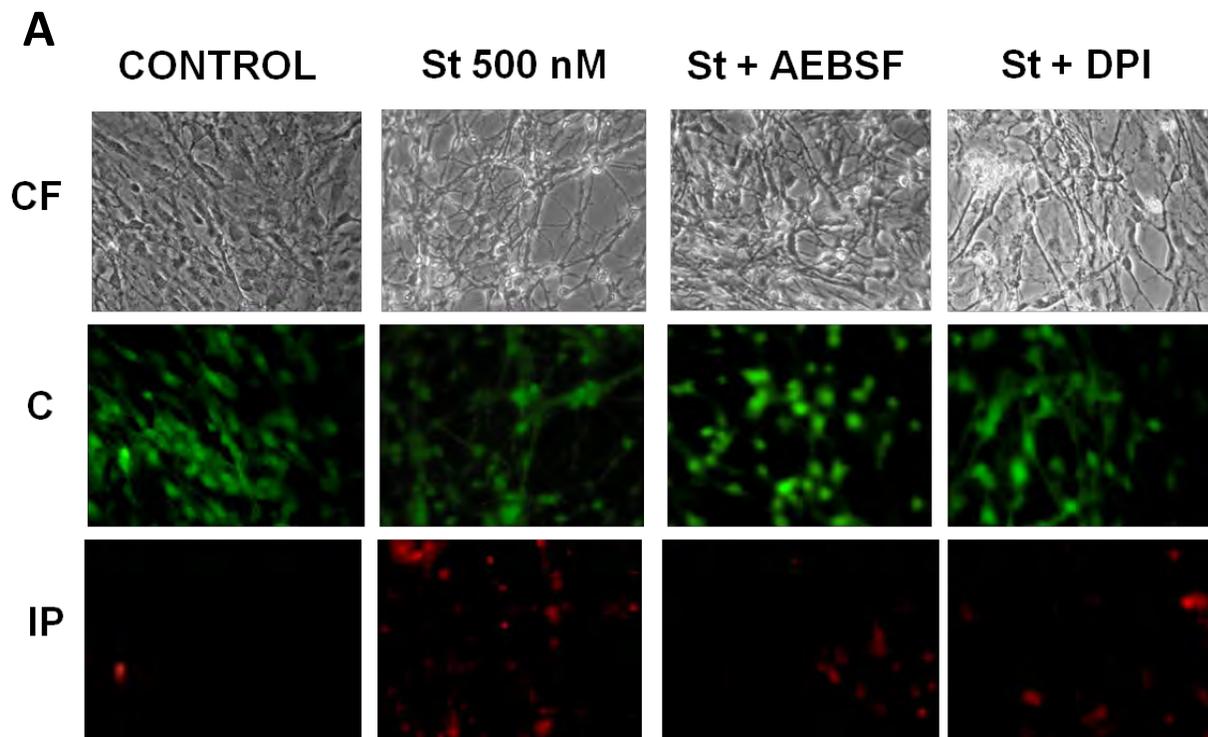


Fig.19 Efecto de inhibidores de NADPH oxidasa en la viabilidad de astrocitos. A) células tratadas con St e inhibidores de la enzima (Apo 750 nM, AEBSF 80 μ M y DPI 520 μ M por 24 h e incubadas con calceina-AM/IP. Verde, calceina; rojo, IP. B) Promedios \pm S.E.M. del número de células vivas por campo expresado como el porcentaje del total. *P \leq 0.05 con respecto a St (n=4-6).

Basados en estas referencias, y en los resultados obtenidos hasta ahora, decidimos evaluar la viabilidad celular utilizando los inhibidores de la NADPH-oxidasa simultáneamente con St. La técnica de MTT no resultó adecuada para evaluar la protección alcanzada con los inhibidores de la enzima pues las observaciones al microscopio no siempre coincidieron con la lectura reportada por el espectrofotómetro. Por ello, empleamos la técnica de calceína-AM/IP y encontramos que la muerte de los astrocitos inducida por St disminuyó en presencia de los inhibidores de la NADPH-oxidasa alrededor del 70% con respecto a las células tratadas únicamente con St (Fig. 19A). Sin embargo, la apocinina no presentó ningún efecto protector (Fig. 19A). La figura 19B resume los resultados obtenidos en estos experimentos.

7. DISCUSION

Los astrocitos son células gliales que se han definido como una población homogénea, con una morfología estrellada que extienden numerosos procesos hacia las neuronas y vasos circundantes en el tejido nervioso (Kimelberg, 2004). En cultivo, los astrocitos, después de varios cambios de medio, quedan libres tanto de neuronas como de los eritrocitos que suelen acompañar al cultivo primario de estas células. En nuestros resultados pudimos confirmar la homogeneidad de los cultivos de astrocitos de cerebelo utilizando un anticuerpo contra la proteína acídica fibrilar glial (GFAP), una proteína propia de los filamentos intermedios que distingue a los astrocitos de otros tipos celulares gliales. Como se muestra en la figura 1, las células fueron positivas para este anticuerpo. Esta figura también muestra el cambio que sufren los astrocitos al recibir un tratamiento con estaurosporina (St).

La St es un inhibidor de proteína cinasa C que tiene efectos citotóxicos y que induce la muerte en diferentes tipos celulares (Tamaoki T et al. 1986; Bertrand R et al, 1994; Keane R et al, 1997; Yue et al 1998; Caballero-Benítez y Morán, 2003; Zhang et al, 2008). En nuestras condiciones encontramos que la St reduce la viabilidad de las células de una forma dependiente de tiempo y concentración. Elegimos trabajar con una concentración de St 0.5 μ M que induce la muerte de alrededor de 50% de las células. Se utilizaron 3 técnicas para evaluar la viabilidad celular bajo las diferentes condiciones experimentales y en todos los casos se encontraron resultados similares. Así, los resultados obtenidos por la reducción de MTT para medir la viabilidad de los astrocitos fueron muy similares a los obtenidos de contar células positivas a yoduro de propidio o a núcleos teñidos con Hoechst.

Se sabe que hay un incremento en la generación de ERO durante la muerte celular (Valencia y Morán, 2001; Samhan-Arias et al, 2004; Güemez-Gamboa y Morán, 2009), por lo que nos interesó conocer el papel de las ERO y de la

NADPH-oxidasa en las células tratadas con St. También, en este sentido, nos pareció importante confirmar los datos reportados por Liu et al (2005) quien afirma que se requiere una cierta concentración basal de ERO en astrocitos para su sobrevivencia.

En este trabajo observamos que bajo condiciones control hay un nivel basal de ERO. Cuando los niveles basales de las ERO se reducen con antioxidantes o inhibidores de la NADPH-oxidasa la viabilidad de estas células no se modifica. En este sentido, pensamos que es posible que la diferencia entre los reportes de Liu y nuestro se deba al tipo de astrocitos empleados (corteza y cerebelo) y/o al estado de maduración de éstos, pues en el trabajo de Liu se utilizan cultivos que han sido resemebrados al menos una vez, lo que les confiere características distintas y no se consideran cultivos primarios (Fedoroff S, 1977).

Por otro lado, los astrocitos tratados con St muestran un incremento en la producción de ERO a partir de las 2h. Esta producción se reduce marcadamente con antioxidantes como el Kaempferol ($2\mu\text{M}$) y el MnTMPyP ($50\mu\text{M}$), de manera que el uso simultáneo de St con alguno de estos antioxidantes redujo la producción de ERO en 50%, aproximadamente. Además, observamos que el Kaempferol y el MnTMPyP redujeron claramente la muerte inducida por St. Estos resultados coinciden con lo observado en otros tipos de células *in vivo* e *in vitro* donde se ha demostrado que las ERO participan en una gran variedad de condiciones relacionadas con la muerte celular (Noh y Kho, 2000; Tamariello et al., 2000; Hwang et al., 2002; Kim et al., 2002; Valencia y Morán, 2004; Uttara, et al 2009).

Son múltiples las vías metabólicas capaces de producir ERO como sub-productos (Kim et al., 2002; Ramiro-Cortés y Morán, 2009). Por ejemplo, la mitocondria produce niveles importantes de ERO como sub-productos del metabolismo aeróbico (Lowell and Shulman, 2005; Jiménez-Jiménez et al., 2006). Además, durante la oxidación de los ácidos grasos que ocurre en los peroxisomas

se produce H_2O_2 . También, la actividad de flavoproteínas, las cicloxigenasas y xantina oxidasa conlleva a la generación de ERO. Recientemente, se le ha prestado especial atención a la NADPH-oxidasa que es una enzima productora de ERO exclusivamente (Lambeth, 2004).

En el sistema nervioso, se ha sugerido que la NADPH-oxidasa puede jugar un papel importante en distintos procesos fisiológicos y patológicos (Andersen, 2004; Jiménez-Jiménez et al., 2006; Ramiro-Cortés y Morán, 2009). En neuronas se han identificado prácticamente todas las subunidades de la NADPH-oxidasa (Kim et al., 2002; Coyoy et al., 2008). Sin embargo, hasta este momento no hay suficiente información al respecto en astrocitos. En el presente estudio identificamos por primera vez en astrocitos de cerebelo, utilizando análisis por Western blot e inmunocitoquímica, la presencia de diferentes subunidades de la NADPH-oxidasa, como $p22^{phox}$ y $p67^{phox}$, así como de dos homólogos de la subunidad catalítica, NOX 1 y NOX 4.

Sabiendo que la NADPH-oxidasa está presente en los astrocitos de cerebelo en cultivo, que el tratamiento con St incrementa su actividad y la producción de ERO, así como por el antecedente de que una NADPH-oxidasa es la fuente principal de ERO en neuronas (Wang et al., 2007; Coyoy et al., 2008; Güemez-Gamboa y Morán, 2009), probamos que las ERO producidas en respuesta al tratamiento con St fueran generadas por una NADPH-oxidasa. Por un lado, encontramos que el PMA, un éster de forbol que activa proteínas cinasas, incrementó la actividad de la NADPH-oxidasa. Además, encontramos que esta enzima está activa constitutivamente. Cuando los cultivos se tratan con St, la actividad de la NADPH-oxidasa aumenta en un 50% después de 2h. Esta actividad no se observa en presencia de cualquiera de los 3 inhibidores de la NADPH-oxidasa probados (AEBSF $80\mu M$ el DPI $520\mu M$ y la apocinina 750 nM). Por otro lado, los inhibidores AEBSF, apocinina y DPI redujeron significativamente la producción de ERO en astrocitos tratados con St.

Como se mencionó, cuando se utilizan los inhibidores de la NADPH-oxidasa no se ve un rescate total ni de la muerte, ni de la producción de ERO. Esto podría deberse a que las especies producidas por la enzima pueden también tener como origen a las mitocondrias, las cuales podrían experimentar un desacoplamiento que conllevaría a la producción de ERO (Abramov et al., 2004; Zhu, et al., 2009).

Finalmente, la inhibición de la NADPH-oxidasa con AEBSF y DPI redujo significativamente la muerte por St, lo que permite sugerir la participación de una NADPH-oxidasa en la muerte de astrocitos inducida por St. Curiosamente, la apocinina, no tuvo un efecto protector contra la muerte de astrocitos inducida por St, aunque este compuesto sí redujo de forma significativa la producción de ERO. En este sentido no encontramos una explicación, aunque podría especularse que la apocinina reduciría a las ERO más allá de los niveles fisiológicos llevando a una condición de muerte. En este sentido, encontramos que la apocinina redujo marcadamente los niveles de ERO e inhibió claramente la actividad de la NADPH-oxidasa.

Un dato interesante fue el cambio morfológico temprano que experimentaron los astrocitos en presencia de St. Aunque desconocemos los mecanismos asociados a este fenómeno, podríamos especular que la St a través de sus efectos inhibidores de proteína cinasas podría alterar la organización del citoesqueleto de los astrocitos.

8. CONCLUSIONES

En conclusión, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que bajo condiciones basales ocurre una generación de ERO a través de una NADPH-oxidasa. Hasta este momento no podemos descartar por completo la participación parcial de la mitocondria u otras enzimas en este evento. Por otro lado, la estaurosporina induce muerte de astrocitos en cultivo. Bajo estas condiciones, ocurre un incremento de ERO y de la actividad de la NADPH-oxidasa, lo que sugiere que la muerte de astrocitos inducida por St podría estar mediada por una generación de ERO producida por la activación de una NADPH-oxidasa.

9. BIBLIOGRAFIA

Abramov AY, Canevari L, Duchen MR (2004) β -amyloid peptides induce mitochondrial dysfunction and oxidative stress in astrocytes and death of neurons through activation of NADPH oxidase. *J Neurosci.* **24**:565-575.

Abramov AY, Canevari L and Duchen MR (2004) Calcium signals induced by amyloid β -peptide and their consequences in neurons and astrocytes in culture. *Bioch et Biophys Acta* **1742**:81-87

Ago T, Kuribayashi F, Hiroaki H, Takeya R, Ito T, Kohda D, Sumimoto H. (2003) Phosphorylation of p47phox directs phox homology domain from SH3 domain toward phosphoinositides, leading to phagocyte NADPH oxidase activation *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**: 4474-9.

Aimo L, Cherr GN and Oteiza PI (2010) Low extracellular zinc increases neuronal oxidant production through nadph oxidase and nitric oxide xynthase activation. *Free Rad Biol Med* **48**:1577-1587

Andersen, JK (2004). Oxidative stress in neurodegeneration:cause or consequence? *Nat Med* **10**:518-525

Ashkenazi A, D V (1998) Death receptors: signaling and modulation *Science.* **281**(5381): 1305-8.

Babior BM (2004). NADPH oxidase *Curr Opin Immunol*, **16**: 42-7.

Baehrecke, EH (2002) How death shapres life during development. *Mol Cel Biol* **3**: 779-787 (Revisión)

Bambrick L, Kristian T and Fiskum G. (2004) Astrocyte mitochondrial mechamisms of ischemic brain injury and neuroprotection. *Neurochem Res* **29**:601-608.

Barres B, S S (2001) Neurobiology. Cholesterol--making or breaking the synapse Science **294**(5545): 1296-7.

Berglund H, O. D., Sankar A, Federwisch M, McDonald NQ, Driscoll PC (2000) The three-dimensional solution structure and dynamic properties of the human FADD death domain J Mol Biol **302**(1): 171-88.

Bertrand R, Solary E, O'Connor P, Kohn KW and Pommier Y. (1994) Induction of a common pathway of apoptosis by staurosporine. **21**:314-321.

Biberstine-Kinkade KJ, DeLeo FR, Epstein RI, LeRoy BA, Nauseef WM, Dinauer MC (2001) Heme-ligating histidines in flavocytochrome b(558): identification of specific histidines in gp91(phox) J Biol Chem, **276**: 31105-12.

Blázquez Ortiz, Cristina. (2001) Cetogénesis en astrocitos: Caracterización, regulación posible papel citoprotector. Tesis doctoral. Madrid, España.

Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding Anal Biochem **72**:248-254.

Caballero-Benitez A, Moran J (2003) Caspase activation pathways induced by staurosporine and low potassium: role of caspase-2 J Neurosci Res **71**(3):383-96.

Cagnoli CM, Kharlamov E, Atabay C, Uz T, Manev H (1996) Apoptosis induced in neuronal cultures by either the phosphatase inhibitor okadaic acid or the kinase inhibitor staurosporine is attenuated by isoquinoline sulfonamides H-7, H-8, and H-9 J Mol Neurosci **7**(1):65-76.

Coyoy A, Valencia A, Güemez-Gamboa A, Morán J (2008) Role of NADPH oxidase in the apoptotic death of cultured cerebellar granule neurons Free Radic Biol Med **45**:1056-1064

Chan W, K. S., Rezaie P (2007) The origin and cell lineage of microglia: new concepts Brain Res Rev **53**(2): 344-54.

Cheng G, Cao Z, Xu X, van Meir EG, Lambeth JD. (2001) Homologs of gp91 phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4 and Nox5 *Gene*, **269**: 131-140.

Chen Y, S. R. (2003). Astrocytes and brain injury *J Cereb Blood Flow Metab* **23**(2): 137-49.

Chinery R, Brockman JA, Peeler MO, Shyr Y, Beauchamp RD, Coffey RJ (1997) Antioxidants enhance the cytotoxicity of chemotherapeutic agents in colorectal cancer: a p53-independent induction of p21WAF1/CIP1 via C/EBPbeta *Nat Med* **3**(11):1233-41.

Cimino F, Esposito F, Ammendola R, Russo T (1997) Gene regulation by reactive oxygen species *Curr Top Cell Regul* **35**:123-48. Revisión.

Croisier E, G M (2006) Glial degeneration and reactive gliosis in alpha-synucleinopathies: the emerging concept of primary gliodegeneration *Acta Neuropathol* **112**(5): 517-30.

Dinauer MC. (2005) Chronic granulomatous disease and other disorders of phagocyte function *Hematol*, 89-95.

Dringen R. (2000) Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog in Neurobiol* **62**:649-671.

Fedoroff, S. Primary cultures, cell lines and cell strains: terminology and characteristics in cell tissue and organ cultures in neurobiology. Ed S. Fedoroff and L. Hertz. 1977 Academic Press Inc (London) Ltd.

Fridovich I (1978) The biology of oxygen radicals *Science* **201**(4359):875-80.

Fridovich, I. (2004) Mitochondria: are they the seat of senescence? *Aging Cell* **3**:13–16.

Gee J, K J (2005) Astrocytes: regulation of brain homeostasis via apolipoprotein E
Int J Biochem Cell Biol **37**(6): 1145-50.

Granville D C C, Hunt D, McManus B (1998) Apoptosis: molecular aspects of cell
death and disease Lab Invest **78**(8): 893-913.

Halliwell B (2006) Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? J
Neurochem **97**:1634-1658. Revisión.

Halliwell B, Gutteridge JM (1992) Biologically relevant metal ion-dependent
hydroxyl radical generation. An update FEBS Lett **307**(1):108-12. Revisión.

Halliwell B, Gutteridge JM (1999) Free radicals in biology and medicine Oxford
Science Publications 3rd ed, Oxford University Press New York, USA.

Haydon P (2001) GLIA: listening and talking to the synapse Nat Rev Neurosci
2(3): 185-93.

Hea F, S Y (2007) Glial cells more than support cells? The International Journal of
Biochemistry & Cell Biology **39**: 661–665.

Heales SJR, Lam AAJ, Duncan, AJ and Land JM (2004) Neurodegeneration or
Neuroprotection: The pivotal role of astrocytes. Neurochem Res **29**:13-519

Hengartner M (2000) The biochemistry of apoptosis. Nature **407**(6805): 770-776.

Hernández-Martínez JM, Domínguez G, Blancas S and Morán J (2010). Oxidation of
biomolecules in the apoptotic death of cerebellar granule neurons induced by
potassium deprivation. Neurochem Res DOI:10.1007/s11064-010-0299-8.

Hoyal CR, Gutierrez A, Young BM, Catz SD, Lin JH, Tsihchlis PN, Babior BM.
(2003) Modulation of p47PHOX activity by site-specific phosphorylation: Akt-
dependent activation of the NADPH oxidase Proc Natl Acad Sci U S A, **100**: 5130-
35.

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 neurothrophin-4/5. *J Neurochem* **82**: 894-902

Ihrle R, A.-B. A. (2008) Cells in the astroglial lineage are neural stem cells *Cell Tissue Res* **331**(1): 179-91.

Ikemoto H, Tani E, Matsumoto T, Nakano A, Furuyama J (1995) Apoptosis of human glioma cells in response to calphostin C, a specific protein kinase C inhibitor *J Neurosurg* **83**(6):1008-16.

Jessen K (2004) Glial cells *Int J Biochem Cell Biol* **36**(10): 1861-7.

Karasek M, S. J., Zielińska A (2004) Ultrastructure of the central nervous system: the basics *Folia Neuropathol* **42** B:1-9.

Keane RW, Srinivasan A, Foster LM, Testa M, Örd T, Nonner D, Wang H, Reed JC, Bredesen DE and Kayalar C. (1997) Activation of CPP32 during apoptosis of neurons and astrocytes. *J of Neurosc Res* **48**:168-180.

Kim SH, Won SJ, Sohn S, Kwon HJ, Lee JY, Park JH, Gwang BJ (2002) Brain-derived neurotrophic factor can act as a pronecrotic factor through translational activation of NADPH oxidase. *J Cell Biol* **159**:821-831

Koppenol WH (2001) The Haber-Weiss cycle - 70 years later *Redox Rep* **6**(4):229-34. Revisión.

Knorrp T, Robinson SR, Crack PJ, Dringen R (2006) Glutathione peroxidase-1 contributes to the protection of glutamine synthetase in astrocytes during oxidative stress *J Neural Transm* **113**:1145-1155.

Korsmeyer S (1995). Regulators of cell death *Trends Genet* **11**(3): 101-5.

Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon (1998) The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis *Annu Rev Physiol* **60**: 619-642.

Kroemer G, E.-D. W., Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P, Zhivotovsky B, Blagosklonny MV, Malorni W, Knight RA, Piacentini M, Nagata S y Melino G (2005) Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death *Nature* **12**: 1463-1467.

Kroemer G, M S (2005) Caspase-independent cell death *Nat. Med.* **11**(7): 725-730.

Kroemer G, Z N, Susin SA (1997) Mitochondrial control of apoptosis *Immunol Today* **18**(1): 44-51.

Lambeth JD (2004) Nox enzymes and the biology of reactive oxygen *Nat Rev Immunol*, **4**: 181-189.

Liochev SI, Fridovich I (1994) The role of O₂⁻ in the production of HO₂: in vitro and in vivo *Free Radic Biol Med* **16**(1):29-33.

Liu Q, Kang J and Zheng R (2004) NADPH oxidase produces reactive oxygen species and maintains survival of rat astrocytes. *Cell Biochem Funct* **23**:93-100.

Lowell BB and Shulman GI (2005) The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **44**:239-267

Mahesh V, D K, Brann D (2006) Role of astrocytes in reproduction and neuroprotection *Mol Cell Endocrinol* **246**(1-2): 1-9.

Mark RJ, Lovell MA, Markesbery WR, Uchida K, Mattson MP (1997) A role for 4-hydroxynonenal, an aldehydic product of lipid peroxidation, in disruption of ion homeostasis and neuronal death induced by amyloid beta-peptide *J Neurochem* **68**(1):255-64.

Maycotte P, Guemez-Gamboa A, Moran J (2010) Apoptosis and autophagy in rat cerebellar granule neuron death: Role of reactive oxygen species *J Neurosci Res* **88**: 73-85.

McCord JM (1994) Mutant mice, Cu,Zn superoxide dismutase, and motor neuron degeneration *Science* **266**(5190):1586-7.

McCord JM (1995) Superoxide radical: controversies, contradictions, and paradoxes *Proc Soc Exp Biol Med* **209**(2):112-7. Revisión.

Mizuki K, Kadomatsu K, Hata K, Ito T, Fan QW, Kage Y, Fukumaki Y, Sakaki Y, Takeshige K Sumimoto H (1998) Functional modules and expression of mouse p40(phox) and p67(phox), SH3-domain-containing proteins involved in the phagocyte NADPH oxidase complex *Eur J Biochem*, **251**: 573-82.

Muzio M (1998) Signalling by proteolysis: death receptors induce apoptosis *Int J Clin Lab Res* **28**(3): 141-7.

Ness J, V M, Mclver S, Goldberg M (2005) Identification of oligodendrocytes in experimental disease models *Glia* **50**(4): 321-8.

Nicholls DG, Budd SL (2000) Mitochondria and neuronal survival *Physiol Rev* **80**: 315-360.

Pedruzzi E, Guichard C, Ollivier V, Driss F, Fay M, Prunet C, Marie JC, Pouzet C, Samadi M, Elbim C, O'Dowd Y, Bens M, Vandewalle A, Gourgerot-Pocidaló MA, Lizard G and Ogier-Denis E (2004) NAD(P)H oxidase Nox-4 mediates 7-ketocholesterol-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human aortic smooth muscle cells. *Mol and Cell Biol* **24**(24):10703-10717

Pekny MWU, Bogestål YR, Pekna MT (2007). The role of astrocytes and complement system in neural plasticity *Int Rev Neurobiol* **82**: 95-111.

Pocock J, K H (2007) Neurotransmitter receptors on microglia *Trends Neurosci* **30**(10): 527-35.

Przedborski S, Jackson-Lewis V, Yokoyama R, Shibata T, Dawson VL, Dawson TM (1996) Role of neuronal nitric oxide in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic neurotoxicity *Proc Natl Acad Sci USA* **93**(10):4565-71.

Ramiro-Cortés Y and Moran J (2009) Role of oxidative stress and JNK pathway in apoptotic death induced by potassium deprivation and staurosporine in cerebellar granule neurons *Neurochem Int* **55**:581-592.

Rappolee DA, Mark D, Banda MJ, Werb Z. (1988) Wound macrophages express TGF-alpha and other growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping *Science*, **241**: 708-12.

Reinher R, Gorg B, Becker S, Qvarskhava N, Bidmon HJ, Selbach O, Haas HL, Schliess F, Haussinger D (2007) Hypoosmotic swelling and ammonia increase oxidative stress by NADPH oxidase in cultured astrocytes and vital brain slices. *Glia* **55**:758-771

Remacle J, Raes M, Toussaint O, Renard P, Rao G (1995) Low levels of reactive oxygen species as modulators of cell function *Mutat Res* **316**(3):103-22. Revisión.

Rochon D, R I, Robitaille R (2001) Synapse-glia interactions at the mammalian neuromuscular junction *J Neurosci* **21**(11): 3819-29.

Safavi-Abbasi S, W J, Missler M (2001) Rapid morphological changes in astrocytes are accompanied by redistribution but not by quantitative changes of cytoskeletal proteins *Glia* **36**(1): 102-15.

Samhan-Arias AK, Martin-Romero FJ and Gutiérrez-Merino C. (2004) Kaempferol blocks oxidative stress in cerebellar granule cells and reveals a key role for

reactive oxygen species production at the plasma membrane en the commitment to apoptosis. *Free Rad Biol and Med* **37**:48-61.

Saran M, Bors W (1990) Radical reactions in vivo - an overview *Radiat Environ Biophys* **29**(4):249-62. Revisión.

Serrano F, Kolluri NS, Wientjes FB, Card JP, Klann E (2003) NADPH oxidase immunoreactivity in the mouse brain. *Brain Res*, **988**: 193-8.

Sheline, CT, Takata, T. Ying, H, Canzoniero LMT, Yang, A, Yu SP and Choi, DW (2004) Potassium attenuates zinc-induced death of cultured cortical astrocytes. *Glia* **46**:18-27

Shimohama S, Tanino H, Kawami N, Okamura N, Kodama H, Yamaguchi T, Hayakawa T, Nunomura A, Chiba, S, Perry G, Smith M y Fujimoto S. (2000) Activation of NADPH Oxidase in Alzheimer's disease brains. *Biochem and Biophys Res Commun*, **273**: 5-9

Slee E, A C, Martin S (1999) Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis *Cell Death Differ* **6**(11): 1067-74.

Stewart VC, Sharpe MA, Clark JB and Heales, SJ. (2000) Astrocyte-derived nitric oxide causes both reversible and irreversible damage to the neuronal mitochondrial respiratory chain. *J Neurochem* **75**:694-700.

Suzuki YJ, Forman HJ, Sevanian A (1997) Oxidants as stimulators of signal transduction *Free Radic Biol Med* **22**(1-2):269-85. Revisión

Tamaoki T, Normoto H, Takahashi I, Kato Y, Morimono M y Tomita F. (1986) Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca⁺⁺ dependent protein kinase. *Biochem and Biophys Res Com* **135**:397-402

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.

Thorburn A (2004) Death receptor-induced cell killing *Cell Signal*. **16**(2): 139-44.

Uttara B, Singh AV, Zamboni P and Mahajan RT (2009) Oxidative stress and neurodegenerative diseases: A review and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuropharm* **7**:65-74

Valencia A and Kochevar IE (2006) Ultraviolet A induces apoptosis via reactive oxygen species in a model for Smith-Lemli-Optiz syndrome. *Free Rad Biol Med* **40**:641-650

Valencia A and Morán J (2001) Role of oxidative stress in the apoptotic cell death of cultured cerebellar granule neurons *J Neurosci Res*, **64**: 284-97.

Valencia A, and Moran J (2004) Reactive oxygen species induce different cell death mechanisms in cultured neurons *Free Radic Biol Med*, **36**: 1112-25.

Walz W (2000) Role of astrocytes in the clearance of excess extracellular potassium *Neurochem Int* **36**(4-5): 291-300.

Wang DD y Bordey A (2008) The astrocyte Odyssey *Prog Neurobiol*, **86**(4):342-367

Wang , Sun AY, Simonyi A, Kalogeris TJ, Miller DK. Sun GY and Korthuis RJ (2007). Ethanol preconditioning protects against ischemia/reperfusion-induced brain damage: Role of NADPH oxidase-derived ROS. *Free Rad Biol Med* **43**:1048-60.

Wang T, Zhang B, Peng X, Perpetua M and Harbrecht BG. (2008). Bcl-xL prevents staurosporine-induced hepatocyte apoptosis by restoring protein kinase B/mitoge-

activated protein kinase activity and mitochondria integrity. *J Cell Physiol* **215**:676-683

Watts LT, Rathinam ML, Schecker S, Henderson GI (2005) Astrocytes protect neurons from ethanol induced oxidative stress in apoptotic death *J Neurosci Res* **80**:655-666

Young G, L. S. (1996) Persistence of multipotential progenitors in the juvenile rat subventricular zone *Dev Neurosci* **18**(4): 255-65.

Yue T, Wang Ch, Romanic AM, Kikly K, Keller P, DeWolf Jr WE, Hart T, Thomas HC, Storer B, Gu J, Wang X and Feuerstein GZ. (1998) Staurosporine-induced apoptosis in cardiomyocytes:a potential role of caspase-3. *J Mol and Cell Cardiol* **30**(3):495-507

Zhu D, Hu C, Sheng W, Tan K, Haidekker M, Sun A, Sun G, Lee J. (2009) NAD(P)H oxidase-mediated reactive oxygen species production alters astrocyte membrane molecular order via phospholipase A₂