

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO



FACULTAD DE CIENCIAS

PAPEL DE LA NADPH-OXIDASA EN LA MUERTE
APOPTÓTICA DE LAS NEURONAS GRANULARES DE
CEREBELO DE RATONES DEFICIENTES EN NOX2

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G A
P R E S E N T A :
ALICIA DIONÉ GÜEMEZ GAMBOA

DIRECTOR DE TESIS:
DR. JULIO EDUARDO ROQUE MORÁN ANDRADE

2005



2005047



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Alicia Dioné Güemez Gamboa

FECHA: 11-mayo-2005

FIRMA: [Signature]

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Papel de la NADPH-oxidasa en la muerte apoptótica de las neuronas granulares de cerebelo de ratones deficientes en Nox2."

realizado por Alicia Dioné Güemez Gamboa

con número de cuenta 09805061-7 , quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

- Director Propietario Dr. Julio Eduardo Roque Morán Andrade
- Propietario Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez
- Propietario Dra. Diana María Escalante Alcalde
- Suplente Dr. Jaime Iván Velasco Velázquez
- Suplente Dra. Rosa Estela Navarro González

[Handwritten signatures of the council members]

Consejo Departamental de Biología

[Signature]
M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA DE BIOLOGÍA

A Odón, *Odondebuena balearica*,
a Sadí, luchando contra la Malaria,
a mi abuela, la araña que vino de España
y a mi madre....
hay cosas que simplemente se heredan.

A tí,

Este trabajo se llevó a cabo bajo la dirección del Dr. Julio Morán Andrade en el Departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, con el apoyo de los donativos correspondientes a los proyectos 36235 de CONACyT y IN-222303 de PAPIIT, y con el de una beca de licenciatura otorgada por DGAPA-PAPIIT.

Agradezco a mis sinodales: Dr. Julio Morán Andrade, Dra. Clorinda Arias Álvarez, Dra. Diana Escalante Alcalde, Dr. Iván Velasco Velázquez, Dra. Rosa Navarro González, por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo, por su valiosa contribución y asesoría.

Se agradece el apoyo técnico de la Biól. Guadalupe Domínguez Macouzet.

RESUMEN

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada que representa un proceso activo que requiere de energía, síntesis de ARNm y de proteínas. Algunas de sus características son la condensación de la cromatina, el encogimiento celular, la fragmentación del ADN y la activación de un tipo específico de proteasas conocidas como caspasas. La apoptosis participa de forma importante durante el desarrollo embrionario y en condiciones patológicas del adulto.

Recientemente se ha sugerido que un ambiente oxidante, resultante de la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ERO), puede constituir un estímulo tanto inductor como ejecutor e incluso regulador de la muerte apoptótica. Todos los organismos producen ERO como subproducto del metabolismo aeróbico normal, particularmente en la respiración mitocondrial, pero también existen otras fuentes como la actividad de la NADPH oxidasa, identificada originalmente en fagocitos. Recientemente se han encontrado proteínas homólogas de NADPH oxidasa (Nox 2) denominadas Nox1 a Nox5, en distintos tipos celulares.

Se ha observado en diferentes neuronas en cultivo que la inducción de la muerte apoptótica genera una condición prooxidante, y que el tratamiento con antioxidantes inhibe o retrasa la muerte. Por otro lado, se ha propuesto que una de las ERO generadas bajo estas condiciones apoptóticas podría ser el anión superóxido formado por una NADPH oxidasa presente en neuronas.

Empleando como modelo el cultivo de neuronas granulares de cerebelo (NGC) de ratones y utilizando como inductores apoptóticos la privación de KCl extracelular (K5) y la aplicación de la estaurosporina (St), en este trabajo se analizó la participación de esta enzima en la muerte apoptótica de NGC de ratones deficientes en Nox 2. Primeramente validamos el uso de NGC de ratón como modelo de muerte apoptótica dilucidando así una controversia sobre los mecanismos de muerte en NGC de rata y ratón. Por otro lado, encontramos que las NGC de ratones deficientes en Nox 2 mueren de manera idéntica a la observada en ratones silvestres. Así, ambos estímulos, K5 o St, inducen la actividad de caspasas y una reducción de la viabilidad de manera similar en NGC de ambos tipos de ratones. También encontramos que en ambos casos se induce la activación de NADPH oxidasa y la producción de anión superóxido. En todos los casos el empleo del inhibidor de esta enzima, el difenilyodonio (DPI), disminuye la actividad de la enzima, la producción de EOR, la activación de caspasa-3 y la muerte neuronal.

Estos resultados nos indican que la Nox 2 no es indispensable para la muerte apoptótica de las NGC de ratón, lo que sugeriría la participación de otros miembros de la familia de las NADPH oxidasas en este proceso.

ÍNDICE

I. Introducción.....	1
1.1. Muerte apoptótica.....	1
1.2. Apoptosis en el sistema nervioso.....	3
1.3. Apoptosis, estrés oxidativo y NADPH oxidasa.....	4
1.4. Familia de las NADPH oxidasas (Nox).....	7
II. Antecedentes.....	10
III. Hipótesis.....	13
IV. Objetivos.....	13
V. Materiales y metodología.....	14
6.1. Animales.....	14
6.2. Cultivo de neuronas granulares de cerebelo de ratón.....	15
6.3. Inducción de muerte neuronal.....	15
6.4. Viabilidad celular.....	15
6.5. Actividad de caspasas.....	16
6.6. Actividad de NADPH oxidasa.....	16
6.7. Detección de anión superóxido.....	17
6.8. Estadística.....	17
VI. Resultados.....	18
6.1. Comparación de las neuronas granulares de cerebelo de ratón en cultivo con las NGC de rata en cultivo.....	19
6.2. Comparación en la viabilidad las NGC de ratón silvestre con las de ratón deficiente en Nox 2.....	21
6.3. Actividad de caspasas.....	22
6.4. Presencia de anión superóxido.....	24
6.5. Actividad de la NADPH oxidasa.....	26

6.6	Efecto del DPI en la viabilidad de las NGC.....	27
6.7	Efecto del DPI la actividad de caspasa 3.....	29
6.8	Efecto del DPI en producción de anión superóxido inducida por K5 en NGC de ratones deficientes en Nox2	30
VII.	Discusión.....	31
VIII.	Conclusiones.....	36
IX.	Referencias.....	37

I. INTRODUCCION

1.1. Muerte apoptótica

La muerte apoptótica o apoptosis es un mecanismo fisiológico utilizado por los organismos pluricelulares durante el desarrollo y la morfogénesis para controlar el número de células, para formar estructuras y para eliminarlas. Además, en el organismo adulto tiene un papel importante en la eliminación de células dañinas y en la homeostasis tisular (Vaux y Korsmeyer, 1999; Jacobson *et al.*, 1997).

Este tipo de muerte es un proceso activo y ordenado que requiere de energía, síntesis de ARNm y de proteínas (Oppenheim *et al.*, 1990), además de tener características bioquímicas, morfológicas y moleculares particulares. Algunas de sus características morfológicas son la condensación de la cromatina, el encogimiento celular y la preservación del sistema membranal, lo que permite la formación de cuerpos apoptóticos, los cuales son posteriormente fagocitados por macrófagos, evitando así que se vacíe el contenido celular y la consecuente reacción inflamatoria (Green y Beere, 2001).

Algunas características moleculares de la apoptosis incluyen la fragmentación del ADN, la traslocación de la fosfatidilserina de la capa interna de la membrana a la capa externa, la liberación del citocromo c de la mitocondria y la activación de proteasas de cisteína, denominadas caspasas, entre otras. (Fig. 1).

A diferencia de la apoptosis, la necrosis es un proceso de degeneración celular pasiva, donde la integridad tanto de la membrana plasmática como la interna se pierde, vaciando así el contenido citoplasmático y de los organelos al medio extracelular, lo cual genera un proceso inflamatorio en el área afectada (Hengartner, 2000)(Fig. 2).

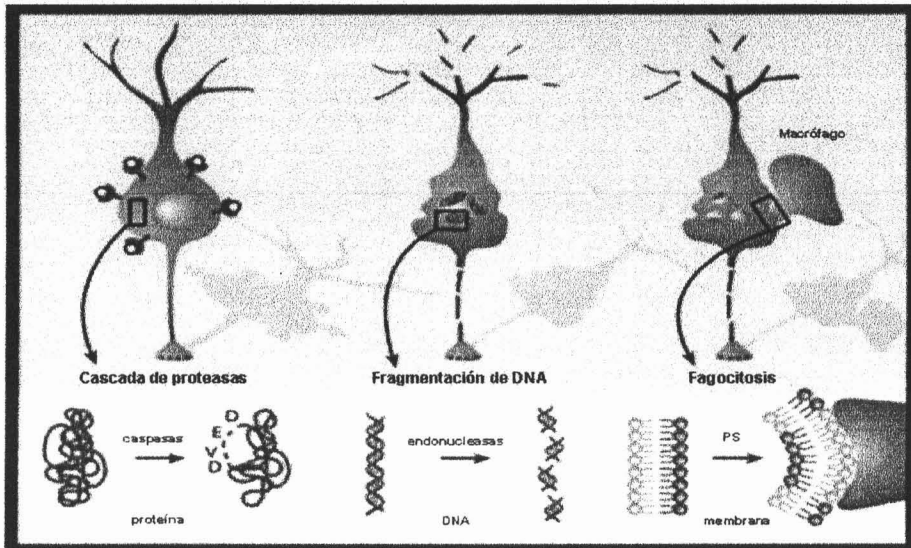


Figura 1: **Algunos eventos moleculares de la apoptosis** son la translocación de fosfatidilserina (PS), la fragmentación del DNA por endonucleasas y la activación de proteasas como las caspasas. DEVD es el sitio de corte de la caspasa 3.

Entre las proteínas que son sintetizadas durante la apoptosis, las caspasas tienen un papel muy importante, al estar involucrada tanto en el inicio como en la ejecución de la muerte apoptótica (Thornberry y Lazebnik, 1998). La mayoría de los cambios morfológicos observados durante este proceso se deben a la acción directa de este grupo de proteasas, las cuales son responsables del procesamiento proteolítico de proteínas nucleares y de citoesqueleto que llevan al desensamblaje celular (Hengartner, 2000).

Las caspasas se clasifican en iniciadoras y ejecutoras según la participación temporal que tengan en el proceso de muerte. Las caspasas con grandes prodominios como la 2, la 8 y la 9, funcionan como iniciadoras, al principio de la cadena proteolítica, mientras las que presentan un prodominio pequeño como la 3, la 6 y la 7, funcionan como efectoras (Thornberry y Lazebnik, 1998).

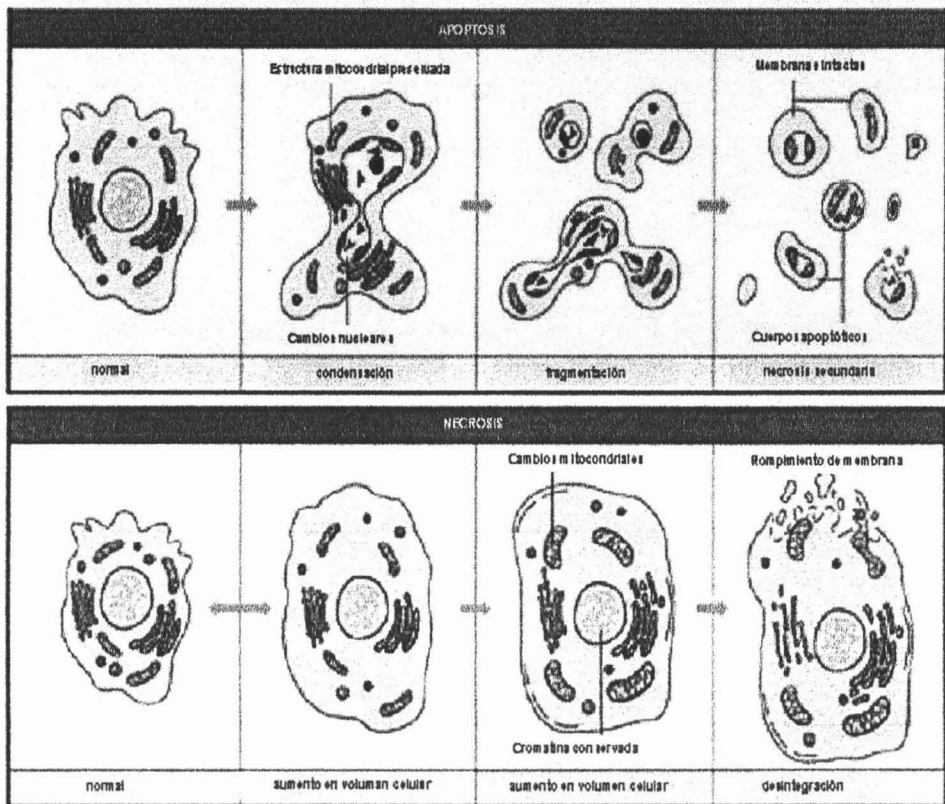


Figura 2. **Diferencia entre apoptosis y necrosis.** En la apoptosis existen cambios a nivel nuclear, pero las mitocondrias se preservan, también existe un encogimiento celular que lleva a la formación de cuerpos apoptóticos, ya que la membrana no pierde su integridad. En el caso de la necrosis no existen cambios nucleares sin embargo si hay cambios mitocondriales, además hay un hinchamiento que lleva a la lisis de las membranas y el vaciamiento del contenido intracelular.

Además de las caspasas existe una gran diversidad de moléculas que regulan la apoptosis como son la proteína adaptadora Apaf-1, el factor inductor de apoptosis (AIF), las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs), los miembros de la familia Bcl-2, que pueden ser proapoptóticos como Bax o antiapoptóticos como Bcl-2, entre otras (Danial y Korsmeyer, 2004).

En general existen dos mecanismos de inicio de la apoptosis: la vía intrínseca y la vía extrínseca. La primera involucra la liberación de moléculas proapoptóticas de la mitocondria, como Apaf-1 (factor apoptótico activador de proteasas) y el citocromo c, las cuales a su vez activan a la caspasa-9 por medio de la formación del apoptosoma. Una vez activa, la caspasa-9 activará a la caspasa-3 para continuar así con la cascada proteolítica. La vía extrínseca está mediada por la activación de receptores localizados en la membrana plasmática, los cuales reclutan a la caspasa-8 por medio de la proteína adaptadora FADD, lo que provoca que la caspasa-8 se autoactive por proximidad. (Hengartner, 2000; Danial y Korsmeyer, 2004).

1.2. Apoptosis en el sistema nervioso

La apoptosis es el tipo de muerte celular programada responsable de la eliminación fisiológica de muchas poblaciones celulares durante el desarrollo, un ejemplo de esto es lo que ocurre en el sistema nervioso central donde se ha estimado que más del 50% de las neuronas mueren durante el desarrollo embrionario y/o la maduración postnatal (Raff *et al.*, 1993; Burek y Oppenheim 1999).

El papel que desempeña la apoptosis durante el desarrollo incluye la formación óptima de conexiones sinápticas y la eliminación de neuronas innecesarias (Nijhawan *et al.*, 2000). Que una neurona muera o no durante el desarrollo depende principalmente del microambiente que la rodea. Si una neurona logra hacer una conexión exitosa con su célula blanco, ésta le aportará factores tróficos que promoverán su supervivencia (Sastry y Rao, 2000), si no, la neurona morirá; lo que sugiere que al principio del desarrollo hay una sobrepoblación de neuronas y que éstas compiten por los factores tróficos.

La apoptosis además de participar en el desarrollo del sistema nervioso (SN) también ha sido descrita en condiciones patológicas del adulto, ya que se ha

sugerido que participa en muchas enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer y la de Parkinson, entre otras (Nijhawan *et al.*, 2000).

1.3. Apoptosis, estrés oxidativo y NADPHoxidasa

La tensión oxidativa es producto de la acumulación de especies reactivas de oxígeno (EOR), entre las cuales se encuentran el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo ($\cdot OH$), el peroxinitrito ($ONOO\cdot$), entre otras. Tradicionalmente se había propuesto que el estrés oxidativo se asociaba exclusivamente con la muerte necrótica. Recientemente se ha descrito que este evento puede constituir un estímulo tanto inductor como ejecutor e incluso regulador de la muerte apoptótica (Atabay *et al.*, 1996; Schultz *et al.*, 1996; Kroemer, 1998; Sakaguchi *et al.*, 1998; Kowaltowsky *et al.*, 1999; Nichols y Budd 2000; Valencia y Morán 2001).

Las EOR fueron consideradas por mucho tiempo instrumentos de defensa, como en el caso de los macrófagos que las usan en la descarga oxidativa para eliminar a los microorganismos, y agentes dañinos que al acumularse producían envejecimiento celular. Algunas evidencias recientes apuntan a que las EOR tienen papeles más específicos en la fisiología normal de las células. En el caso del sistema nervioso, existen evidencias de estos episodios oxidativos tanto en patologías (enfermedades de Alzheimer y Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, síndrome de Down, entre otras) como en procesos fisiológicos durante el desarrollo del mismo (Halliwell, 1992; Tan *et al.*, 1998; Nijhawan *et al.*, 2000; Valencia y Morán, 2001).

Todos los organismos producen EOR como un subproducto del metabolismo aeróbico normal, particularmente en la respiración mitocondrial donde, a nivel del Complejo I de la cadena de transporte electrónico, hay una pérdida del 1-2% de electrones los cuales reducen parcialmente al O_2 para formar

O_2^- (Cadenas y Davies, 2000). Existen también otros medios de producción de EOR como la xantina-oxidasa, la cual puede formar O_2^- a partir de O_2 y el citocromo P450, entre otras; pero posiblemente el complejo enzimático más importante sea la NADPH oxidasa (Sauer et al., 2001).

La NADPH oxidasa es una enzima que transfiere electrones del NADPH al oxígeno molecular produciendo así el anión superóxido. El complejo identificado originalmente en fagocitos está compuesto por el flavocitocromo o citocromo b formado por 2 subunidades transmembrales (gp91-phox ó Nox 2 y p22-phox) y por 3 reguladores citosólicos (p67-phox, p47-phox y p40phox) y

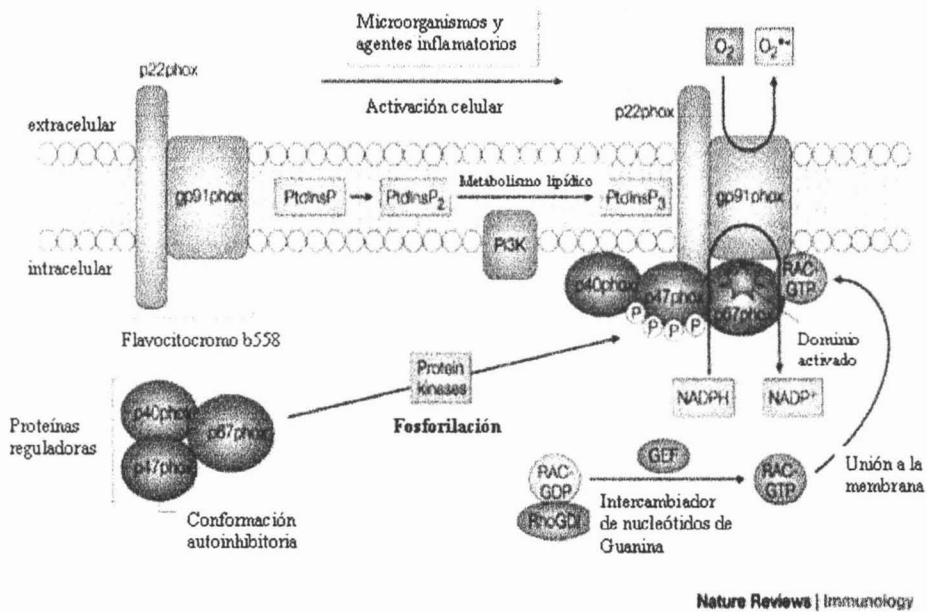


Figura 3. **Activación de la NADPH oxidasa de neutrófilos.** La activación de gp91phox ocurre cuando al menos tres señales resultan en el ensamblaje de las proteínas reguladoras con el flavocitocromo b588, estas señales son la fosforilación de p47phox, el metabolismo lipídico el cual provee de lípidos a los que p47phox y p40phox tienen sitio de unión, así como la traslocación de Rac a la membrana y su unión con p67phox para formar el complejo activo. (Lambeth, 2004)

requiere de una GTPasa, Rac1 o Rac2, para su activación (Henderson *et al.*, 1995, Clark *et al.*, 2004)(Fig 3).

La NADPH oxidasa fue originalmente descrita en neutrófilos (Babior *et al.*, 2002) donde es una fuente importante de anión superóxido durante la “descarga oxidativa” en respuesta de mediadores inflamatorios o microorganismos. Para su activación se requiere que el complejo citoplásmico se una al citocromo b. Esta interacción se previene en el estado de reposo de la enzima gracias a la conformación auto-inhibitoria de p47-phox, la cual requiere ser fosforilada para que pueda ser traslocada a la membrana plasmática y formar el complejo activo con gp91-phox (Nox 2), la subunidad catalítica (Groemping *et al.*, 2003). Se cree que esta fosforilación la lleva a cabo la proteína cinasa C (PKC), por lo que se le involucra en la regulación de la actividad de la NADPH oxidasa (Noh y Koh, 2000) (Fig 3).

1.4. Familia de las NADPH oxidasas (Nox)

Recientemente se han identificado proteínas homólogas a gp91-phox, denominadas Nox1 a Nox5 (por NADPH-oxidasa), en células no-fagocíticas como fibroblastos, células endoteliales, osteoclastos etc., así como en una gran variedad de tejidos como colon, riñones, glándula tiroides, entre otros (Lambeth *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2001; Lambeth, 2004; Geiszt y Leto, 2004). También se ha identificado otro tipo de proteínas homólogas denominadas Duox 1 y 2 (por Dual oxidasas), las cuales además de tener una región homóloga a gp91-phox tienen un dominio adicional homólogo a peroxidasa y un sitio de unión a Ca^{2+} (Fig 4) (Cheng *et al.*, 2001; Lambeth, 2004).

Todas estas enzimas son estructuralmente muy parecidas a Nox 2 (gp91-phox), ya que todas contienen un dominio de flavocitocromo en el extremo C-terminal, el cual tiene sitios de unión a FAD y NADPH. Además, en el extremo N-terminal tienen seis α -hélices transmembranales las cuales contienen 2 sitios

de unión a grupos hemo, siendo Nox 1, 3 y 4 las más parecidas. Nox 5 además tiene un dominio de unión a Ca^{2+} en el extremo N-terminal (Fig 4).

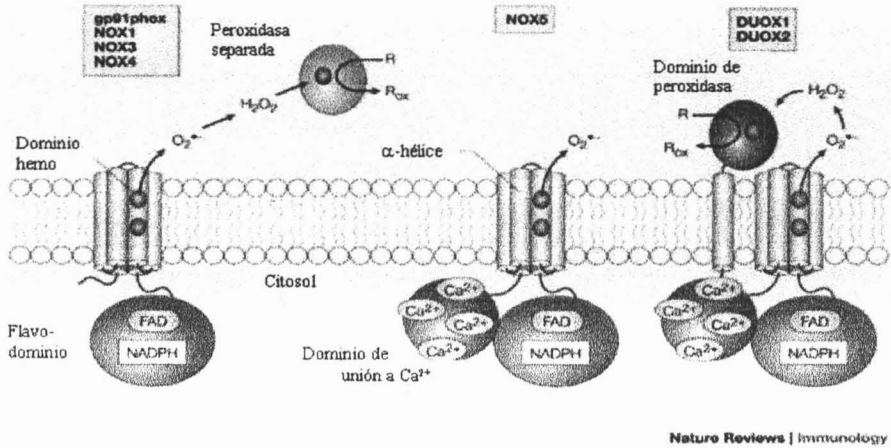


Figura 4. Estructura de los dominios de la familia de las Nox: Nox1, Nox3 y Nox4 son las más parecidas tanto en tamaño como en estructura de los dominios a gp91phox (Nox2). Nox5 tiene la misma estructura catalítica que Nox2, pero tiene además un dominio de unión a calcio. Duox1 y Duox2 tienen la misma estructura que Nox5, más una α -hélice seguida de un dominio homólogo a peroxidasa. (Lambeth, 2004)

Nox 1 fue el primer homólogo de gp91-phox que se identificó y fue descrito como una oxidasa mitogénica debido a que al ser transfectada a fibroblastos produce un incremento en la proliferación celular y la formación de tumores agresivos en ratones atímicos (Suh *et al.*, 1999). Trabajos posteriores apoyan esta afirmación (Arnold *et al.*, 2001), por lo que Nox 1 pudiera estar involucrada en la regulación mitogénica y con el cáncer; sin embargo, al suprimir Nox 1 en células cancerígenas de colon no se ve afectada la proliferación celular.

La Nox 3 parece tener una distribución más restringida. En particular se ha detectado en las otoconias (células del oído interno), donde se le ha involucrado en la morfogénesis ya que ratones deficientes en esta Nox presentan

trastornos motores, de coordinación, orientación y comportamiento (Paffenholz *et al.*, 2004).

Nox 4 podría tener la función de detectar los niveles de oxígeno en el riñón así como de regular la síntesis de la eritropoietina (EPO) (Geiszt *et al.*, 2000; Shiose *et al.*, 2001), además de ser responsable de la producción de O_2^- en osteoclastos, participando en la reabsorción ósea. (Yang *et al.*, 2001). Estudios recientes involucran a Nox 4 en la producción de EOR mediada por la vía de la insulina (Mahadev *et al.*, 2004).

Se ha sugerido que Nox 5 puede tener un papel en la proliferación celular de la línea DU 145 (Brar *et al.*, 2003), así como en la capacitación de los espermatozoides o en la reacción acrosomal (Baker y Aitken, 2004); además se ha encontrado ARNm en espermatoцитos en paquíteno (Banfi *et al.*, 2001).

Duox 2 es esencial para la síntesis de la tiroxina por medio de la iodación de la tiroglobulina, ya que se ha observado que mutaciones en ésta causan hipotiroidismo (Moreno *et al.*, 2002). También se ha detectado Duox 1 en la glándula tiroides, pero se desconoce qué función específica tiene. Por otro lado, se cree que ambas enzimas juegan un papel importante en la modificación de proteínas de matriz extracelular así como de otro tipo de moléculas por medio de la producción de EOR. (Edens *et al.*, 2001; Lambeth, 2004)

Todos los miembros de la familia Nox participan en diferentes vías de señalización, a pesar de que todas tienen en realidad la misma capacidad de producir O_2^- . Esto pudiera deberse a la alta especificidad de funciones según el tejido en el que se encuentren. Sin embargo, además de localizarse en los tejidos ya mencionados, las Nox también se expresan en otros tejidos (Cheng *et al.*, 2001; Krause, 2004), donde aunque su expresión no sea tan alta, pudieran también jugar un papel importante.

II. ANTECEDENTES

Las neuronas granulares de cerebelo (NGC) constituyen alrededor del 80% de esta estructura y una gran proporción de estas células son eliminadas durante su desarrollo. Estas neuronas se generan posnatalmente en la capa germinal externa, donde se diferencian y migran a la capa granular, donde reciben aferencias glutamatérgicas de los núcleos pontinos provenientes de la médula espinal. Se sugiere que estas aferencias actúan como señal trófica promoviendo la diferenciación y supervivencia de estas neuronas.

Los cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo son un modelo adecuado para el estudio de la apoptosis en el sistema nervioso. Las NGC pueden mantenerse en cultivo si están crónicamente despolarizadas con altas concentraciones de potasio (25mM de KCl: K25) (Gallo *et al.* 1987) o en presencia de un agonista de los receptores a glutamato, el N-metil-D-aspartato (NMDA) (Balázs *et al.*, 1988; Morán y Patel, 1989). Estas dos condiciones inducen un incremento en la concentración de calcio intracelular, lo que ayuda a mantener vivas a las células.

Estas células mueren apoptóticamente, después de 24 - 48 horas, al ser transferidas de este medio despolarizante a un medio con concentraciones fisiológicas de potasio (5mM de KCl: K5), lo que genera una reducción en la concentración intracelular de calcio (Gallo *et al.*, 1997; D'Mello *et al.*, 1993; Morán *et al.*, 1999; Gerhardt *et al.*, 2001). Se ha sugerido que esto es similar a lo observado durante el desarrollo cuando las NGC dejan de recibir las entradas presinápticas glutamatérgicas de las fibras musgosas. Existen otras condiciones experimentales muy utilizadas para inducir apoptosis en este modelo como la estaurosporina (St) (Taylor *et al.*, 1997; Caballero-Benítez y Morán, 2003).

Se ha demostrado en distintas preparaciones de células en cultivo que cuando las neuronas son privadas de un estímulo trófico, lo cual induce muerte apoptótica, se genera una condición prooxidante. Si esta condición es inhibida

con antioxidantes, la muerte se evita total o parcialmente, sugiriendo así la participación de las EOR (Atlante *et al.*, 1998; Castilho *et al.*, 1999). En NGC se ha observado que cuando las células son transferidas a K5 se genera un estrés oxidativo alrededor de las 3-4h de que se dio el estímulo apoptótico, antes de que aparezcan parámetros de muerte como actividad de caspasa 3 y traslocación de la fosfatidilserina; y que si este estrés es inhibido con antioxidantes tanto los parámetros apoptóticos como la muerte se inhiben significativamente. (Valencia y Morán, 2001).

Por otro lado, se ha propuesto que el anión superóxido podría ser la EOR preferentemente involucrada en la muerte de las neuronas granulares de cerebelo en cultivo (Atlante *et al.*, 1998; Martín-Romero *et al.*, 2002; Satoh *et al.*, 1998). En algunas preparaciones se ha encontrado que la mayor proporción de anión superóxido no proviene necesariamente de la mitocondria, sino de un complejo enzimático denominado NADPH oxidasa, el cual se ha demostrado recientemente que está presente en distintas neuronas en cultivo. En un modelo de neuronas corticales en cultivo se demostró recientemente que estas enzimas participa activamente en la inducción de la muerte neuronal (Noh y Koh, 2000; Kim *et al.*, 2002; Hwang *et al.*, 2002).

Uno de los primeros reportes que sugieren el papel de la NADPH oxidasa en la muerte apoptótica es el de Tammariello y cols. 2000 donde muestra que en neuronas simpáticas, la privación de NGF induce este tipo de muerte debido a un estrés oxidativo generado por la NADPH oxidasa. Lo anterior lo demuestran por medio de dos aproximaciones experimentales: 1) la utilización de un inhibidor farmacológico de la enzima, el DPI y 2) por medio de una inactivación genética de la misma (en ratones deficientes en Nox 2), ya que en ambos casos ve una reducción significativa en el número de células apoptóticas después de la privación de NGF, con respecto al control (Tammariello *et al.*, 2000).

Los ratones deficientes en Nox 2 tienen una inserción del gen de la ionomicina en el exón 3 de la subunidad catalítica por lo que no producen proteína funcional, lo que mimetiza la enfermedad de granulomatosis crónica, en humanos (Pollock *et al.*, 1995).

Por otro lado, también se ha sugerido la participación de la NADPH oxidasa (Nox 2) en la muerte de neuronas en estudios que demuestran que los ratones deficientes en esta enzima exhiben una reducción en la lesión después de la isquemia (Walder, 1997)

Así, los antecedentes anteriormente mencionados, sugieren una posible participación de EOR, en particular O_2^- , producidas por la NADPH oxidasa, las cuales podrían constituir una señal temprana en el proceso de la muerte apoptótica de las NGC. y que una aproximación útil para ver el papel de la misma en la progresión de la muerte es la utilización de ratones deficientes en Nox 2.

III. HIPOTESIS

Si la apoptosis tiene como señal temprana un aumento en la producción de anión superóxido, y si el anión superóxido es producido por la Nox 2, entonces en neuronas deficientes en esta subunidad habrá una disminución en la muerte apoptótica.

IV. OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar la participación de la Nox 2 en la muerte de neuronas granulares de cerebelo de ratón en cultivo.

Objetivos particulares

- 4.1 Establecer si las NGC de ratón mueren apoptóticamente bajo los estímulos de bajo potasio (K5) y estaurosporina (St 0.5 μ M) como lo hacen las NGC de rata.
- 4.2 Comparar parámetros de muerte apoptótica entre NGC de ratones deficientes en Nox 2 y de ratones silvestres, inducida por privación de potasio (K5) y estaurosporina (St 0.5 mM).

V. METODOS Y MATERIALES

5.1. Animales

Los ratones deficientes en Nox 2 se obtuvieron de Jackson Laboratories, U.S.A. y los ratones silvestres (cepa C57Bl6) se adquirieron en Harlan, México. Los ratones deficientes en Nox 2 tienen insertado el gen de la neomicina entre los exones 3 y 4, lo cual evita que se produzca la enzima funcional, la mutación no es letal por lo que los animales deficientes son homocigos (Pollock *et al.*, 1995). Para comprobar que efectivamente los ratones son deficientes se hizo una PCR para detectar el gen de resistencia a neomicina, donde se puede observar que únicamente los ratones deficientes presentan la banda esperada de alrededor de 350 pb, mientras que en los ratones controles no se observa dicha banda (fig. 5).

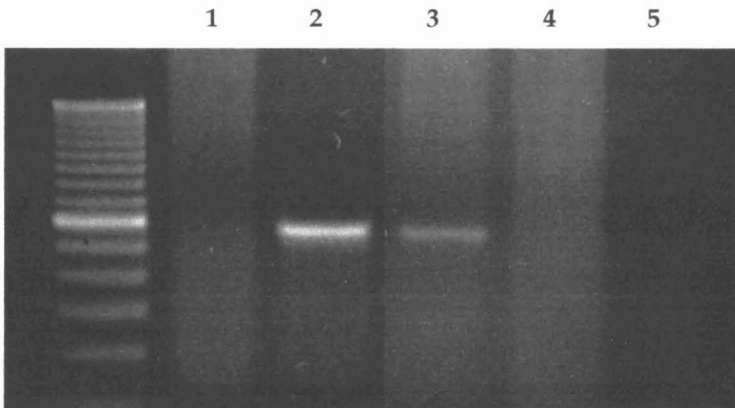


Figura 5: Identificación de ratones deficientes en Nox 2 por PCR: En 1 se muestra un control negativo contra neomicina, seguido de uno positivo (2), que concuerda con el peso esperado del producto (350 pb), posteriormente esta una muestra de ratón deficiente en Nox 2 (3), donde se aprecia la banda de neomicina, mientras que en el siguiente carril (4), del ratón control, no aparece esta banda; el último carril (5) es un control negativo donde no hay ADN.

5.2. Cultivo de neuronas granulares de cerebelo de ratón

Se utilizaron cultivos primarios de células granulares de cerebelo de ratón realizados de la misma manera que se describió este método para realizar cultivo de neuronas granulares de rata (Morán y Patel 1989). Brevemente, se obtiene una suspensión de neuronas disociadas de cerebelo de ratón de entre 7 y 8 días postnatales, que son sembradas en platos de cultivo previamente tratados con poli-L-lisina a una concentración de 5 µg/ml por 24 h, a una densidad de 1.5×10^5 células por ml. Para el cultivo se utiliza el medio basal Eagle suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino inactivado con calor, 2mM de glutamina, 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomycin. Se previene el crecimiento de células no neuronales adicionando citosina arabinosa después de 20h, lo cual permite que el cultivo este constituido al menos, por 95% de neuronas granulares (Balázs *et al.*, 1988). Los cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera húmeda saturada de vapor de agua con 5% de CO₂ y 95% de aire, por 7-8 días *in vitro* (DIV) hasta su uso.

5.3. Inducción de muerte neuronal

Los protocolos experimentales utilizados para inducir la muerte celular fueron la reducción de la concentración del potasio extracelular (de 25 mM de KCl a 5 mM de KCl). Para ello, las neuronas granulares de cerebelo de ratón se mantuvieron en un medio despolarizante (25 mM de KCl) durante 7-8 DIV y posteriormente se transfirieron a un medio con composición similar pero con concentraciones fisiológicas de KCl (5mM). En algunos experimentos las neuronas mantenidas en K25 por 7-8 DIV se trataron con estaurosporina (0.5 µM), un inhibidor de proteínas cinasas.

5.4. Viabilidad celular

Se midió mediante el ensayo de supervivencia por la técnica de transformación de 3-(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Esta técnica se basa en la transformación del MTT por la actividad mitocondrial de las células vivas a azul de formazán. Los cultivos se incuban durante 15 minutos con el MTT (0.5 mg/ml) a 37°C, se extrae el azul de formazán con DMSO al 100% para posteriormente cuantificarlo espectrofotométricamente; la absorbancia es directamente proporcional a las células viables. Los resultados son expresados como valores relativos del control, que representa el 100%.

La supervivencia neuronal también fue medida incubando los cultivos de NGC con 1µM de calceína-AM, un fluoróforo permeable que una vez dentro de las células es procesado por esterasas en las células metabólicamente activas, tornándose fluorescente al excitarse a una longitud de onda de 520 nM. Los resultados se expresan como promedio de los porcentajes de células metabólicamente activas (positivas a calceína) con respecto a los totales (imagen en contraste de fases).

5.5. Actividad de caspasa 3

La actividad de caspasa 3 se determinó por un método fluorogénico basado en la aparición de fluorescencia por la ruptura de un sustrato (25µM) acoplado a metil-cuomarina (Ac-DEVD-MCA) en un espectrofluorómetro. La actividad fue seguida por 15 min después de agregar el sustrato y el homogenado celular a 2.5 ml de amortiguador de lectura (100mM HEPES, 10 % (p/v) sacarosa, 0.1% (p/v) CHAPS, 10 mM DTT y 1mM EDTA). Los resultados fueron expresados como el cambio en la intensidad de la fluorescencia por hora por mg de proteína. La concentración de proteínas fue determinada por el método de Bradford (1976).

5.6. Actividad de NADPH oxidasa

La actividad de la NADPH oxidasa se midió utilizando la técnica descrita por Shpungin en 1989. Las neuronas se homogenizaron en un amortiguador salino (KCl 150 mM y NaCl 150 mM pH 7.4 suplementado con MgCl₂ 1mM, EGTA 1mM, NaN₃ 2 mM y DTT 1mM). Para detectar la actividad de la enzima se cuantifica la reducción del citocromo c, por el O₂⁻ producido por la misma, en un espectrotómetro a 550nm. La reacción se lleva a cabo 37°C en presencia del homogenizado y de la mezcla de reacción (amortiguador salino pH 7.4 suplementado con cit c 0.1 mM, FAD 10 μM y SDS 5mM), y se inicia al agregar 10 mM de NADPH, leyéndose durante 3 min. Los resultados de la actividad se expresan como la diferencia en la absorbancia por hora por mg de proteína. La concentración de proteínas fue determinada por el método de Bradford (1976).

5.7. Detección de anión superóxido

El anión superóxido se detectó usando dihidroetidina, la cual se oxida por el anión superóxido y se convierte en etidio que fluoresce al unirse al DNA. Brevemente, las células se incuban durante 20 minutos con dihidroetidina (3.2μM), se lavan 2 veces con PBS y se fijan durante 7 minutos a 4°C con formaldehído al 3% en PBS, protegido de la luz; posteriormente se utilizó un microscopio de epifluorescencia con filtro de rodamina (Ex 510-560 y Em 590). Se cuantifica el número de células fluorescentes y se hace un porcentaje con respecto al número total de células.

5.8. Estadística

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

VI. RESULTADOS

6.1 Comparación de las neuronas granulares de cerebelo de ratón con las NGC de rata en cultivo.

Las neuronas granulares de cerebelo (NGC) de rata en cultivo ha sido un modelo muy utilizado para estudiar una gran variedad de procesos y eventos neuronales, incluyendo los mecanismos moleculares y celulares de la muerte apoptótica del sistema nervioso. Existen pocos estudios basados en el empleo de NGC de ratón en cultivo y en el caso de la muerte apoptótica existen datos controversiales en relación a si estas células requieren despolarizarse para sobrevivir.

Debido a que los estudios planteados en este trabajo deben realizarse en neuronas de ratón por la conveniencia de utilizar ratones genéticamente modificados y, por otro lado, por los datos controversiales de que las NGC de ratón se comportan igual que las de rata, la primera parte de este estudio consistió en caracterizar la muerte de NGC de ratón inducida por privación de despolarización por potasio y St, y compararlo con lo observado en NGC de rata.

Para esto, se cultivaron NGC tanto de rata como de ratón en un medio de cultivo con 25 mM de KCl durante de 7-8 DIV. Un grupo de células se trató con 0.5 μ M estaurosporina (St) y otro grupo se transfirió a un medio idéntico al original, pero con 5mM de KCl (K5). Después de 24 horas se evaluó la morfología y la viabilidad neuronal se cuantificó por MTT. La figura 6 muestra que las NGC de ambas especies mueren con los dos tratamientos; sin embargo, las NGC de ratón parecen ser más sensibles a los tratamientos efectuados. Esto se observa en el panel superior de la figura 5 donde se muestra que el daño morfológico inducido por las mismas condiciones es mayor en las NGC ratón que en las de rata. Estos resultados se confirmaron al cuantificar la viabilidad neuronal por

medio de la transformación de MTT a los tiempos en que se evaluó la morfología neuronal.

Resultados similares se encontraron cuando las células se cultivaron crónicamente (7-8 DIV) en un medio con 5 mM KCl (K5), 10 mM KCl (K10) ó 10 mM KCl + 150 mM NMDA (K10+NMDA). Tanto K5 como K10 redujeron la viabilidad, como se había reportado, y el NMDA rescató de la muerte a las NGC. De nuevo, estas condiciones indujeron muerte tanto en NGC de rata como en ratón, siendo más sensibles estas últimas (Fig. 6).

Además de los parámetros de viabilidad medidos en las distintas condiciones, también se observaron parámetros apoptóticos como la actividad de la caspasa-3. En cultivos de NGC de rata la caspasa-3 se activa alrededor de las 3h y aumenta de manera significativa alrededor de las 8 h después de la privación de potasio y St (Caballero-Benítez *et al.* 2003). En cultivos de NGC de ratón la activación máxima de la caspasa-3 también se da alrededor de las 8 horas (resultados no mostrados), por lo que el comportamiento de las NGC de ambas especies correlaciona estrechamente.

Estos resultados muestran que las NGC de ratón mueren por acción de una privación de despolarización por potasio, como ha sido extensamente descrito en rata. Más aún, se puede mencionar que las NGC de ratón son más sensibles a los tratamientos descritos que las NGC de rata. Así, el modelo de muerte de NGC de ratón es útil para evaluar los parámetros de muerte que se presentarán en este estudio.

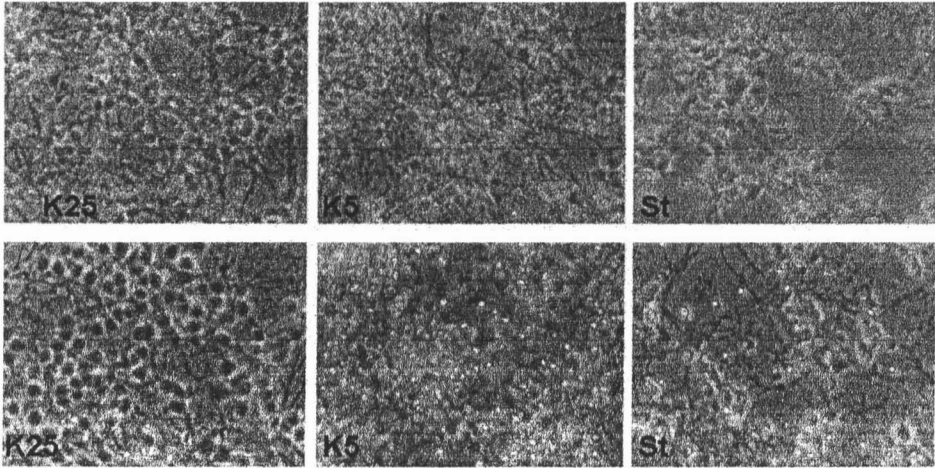
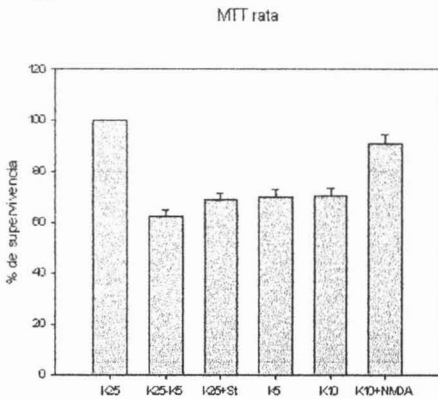
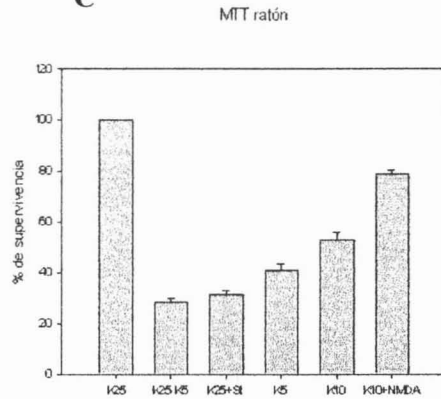
A**B****C**

Figura 6. Comparación de la viabilidad de las NGC de rata y ratón en respuesta a diferentes condiciones de muerte. Las NGC de ambas especies se mantuvieron por 8 DIV en K25 y posteriormente se trataron con estaurosporina ($0.5 \mu\text{M}$) (K25+St) o se transfirieron a un medio con KCl 5 mM (K25-K5). Después de 24h del tratamiento se tomaron micrografías (A: rata, panel superior y ratón, panel inferior) y se midió la transformación de MTT (B: rata y C: ratón), como se describe en Métodos. Un grupo de células fueron cultivadas en un medio con 5 mM KCl (K5), 10 mM KCl (K10) ó 10 mM KCl + $150 \mu\text{M}$ NMDA (K10+NMDA) y después 8 DIV se midió la transformación de MTT (B y C).

6.2 Comparación en la viabilidad las NGC de ratón silvestre con las de ratón deficiente en Nox 2.

Debido a que en estudios previos se ha sugerido la participación de la NADPH oxidasa en la muerte apoptótica de neuronas privadas de señales tróficas y a que trabajos previos de nuestro grupo han probado la presencia de este complejo enzimático en las NGC de rata, se decidió utilizar ratones deficientes en la subunidad Nox 2 de esta enzima para ver si es que ésta participa en la muerte apoptótica de estas neuronas.

Para lo anterior se hicieron cultivos neuronales tanto de ratones silvestres como de ratones deficientes, los cuales se cultivaron crónicamente en K25 y a los 7-8 DIV se les trató con 0.5 μ M estaurosporina o con un medio K5 y después de 24 h se les midió la viabilidad con la técnica de MTT. La figura 7 muestra que tanto las NGC de ratón silvestre como las de ratón deficiente tienen una supervivencia similar de alrededor de un 30-40% por acción de los tratamientos mencionados. En todos los casos, no existen diferencias significativas entre los animales silvestres y los deficientes en Nox 2. Esto mismo se observó cuando las NGC se cultivaron crónicamente con K5 ó K10. En ninguno de los casos hubo diferencias significativas entre las células de los dos tipos de ratón evaluadas (Fig. 7).

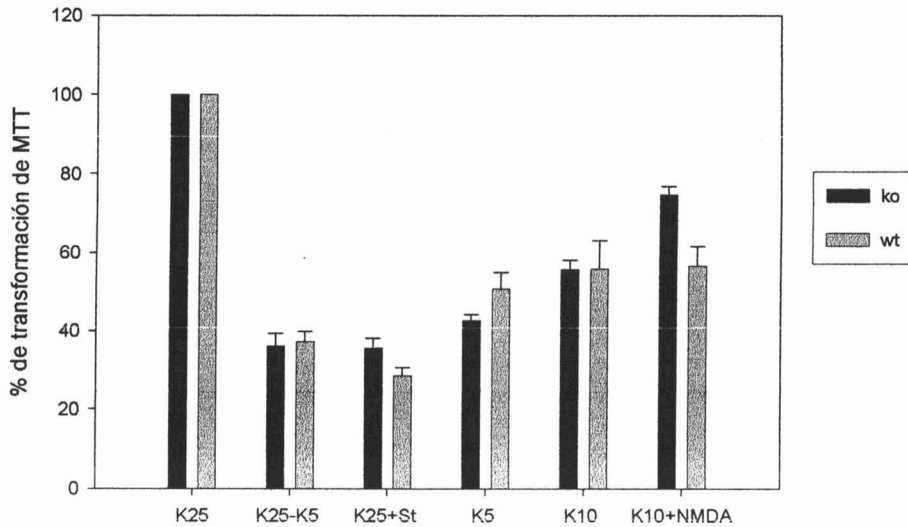


Figura 7: **Comparación de las NGC de ratones deficientes en Nox 2 con las NGC de ratones silvestres:** Ambas células se mantuvieron por 8 DIV en K25 para después darles diferentes estímulos apoptóticos, K25-K5 y K25+St, K5 y K10 fueron crecidas en medio con bajo potasio durante los 8 DIV la viabilidad es medida por transformación de MTT 24 horas después.

6.3 Actividad de caspasas

Como se observó que no existía diferencia significativa entre la viabilidad de las NGC de ratones deficientes y las de ratones silvestres, se decidió ver si ambos tipos de células morían de la misma forma, para lo cual se utilizó un marcador de muerte apoptótica, la activación de la caspasa 3 (principal caspasa ejecutora). Se hizo un curso temporal de esta activación, midiéndose la actividad de caspasa-3 durante las primeras 11h después de aplicados ambos estímulos apoptóticos, K5 y St.

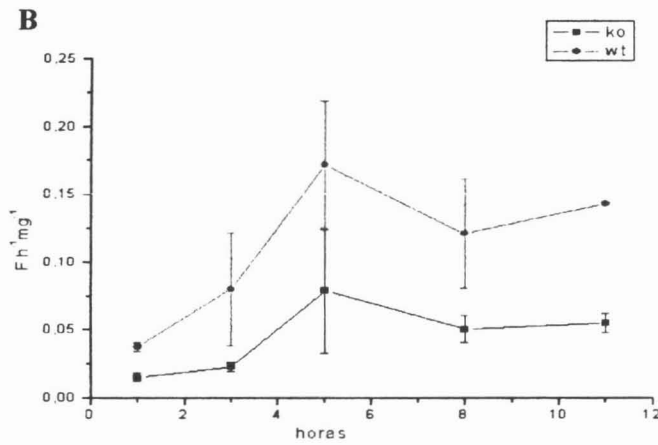
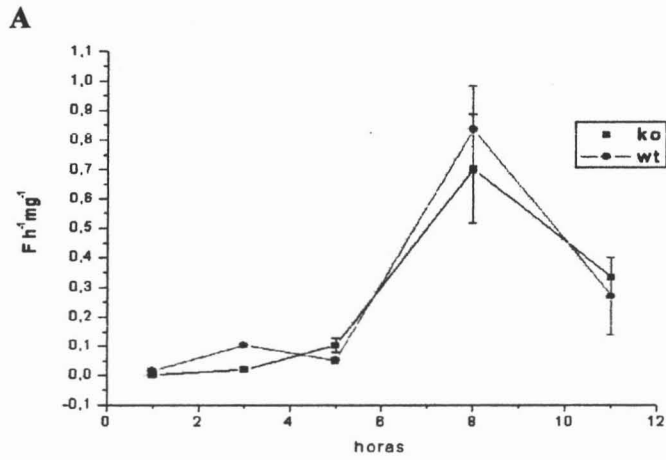


Figura 8: **Curso temporal de caspasa 3.** Se midió la actividad de caspasa 3 en un espectrofluorómetro, como se menciona en Métodos, a partir de la primera hora de que se dio el estímulo, y después a las 3, 5, 8 y hasta las 11 horas. Se hizo lo mismo para ambas NGC (silvestres y deficientes). Los estímulos utilizados fueron privación de potasio (K5) A y aplicación de estaurosporina 0.5 mM (St) B. No hubo diferencias significativas entre ambas NGC con K5.

Como se observa en la fig. 8, la activación de caspasa 3 inducida por K5 y por St en las NGC de ambos tipos de ratones ocurre de manera simultánea, sin embargo para el caso de St la actividad se observa más temprano, empezando a aumentar alrededor de las 3 h, alcanzando su máxima actividad a las 5 h y descendiendo a partir de ese momento; mientras que en el caso de K5 el aumento se da alrededor de las 5h y el pico máximo a las 8h.

Estos resultados indican que, en el caso de K5 no hay diferencias significativas en la activación ni en la temporalidad de caspasa 3 en NGC con y sin Nox 2. Sin embargo, en el caso de St, aunque la temporalidad en la actividad de esta caspasa es similar en ambos tipos de NGC, la magnitud de su activación es significativamente diferente, siendo mayor en células de ratones silvestres comparado con la de ratones deficientes. Esta diferencia entre K5 y St podría deberse a los distintos mecanismos de activación del proceso apoptótico que finalmente se refleja en las distintas cascadas de caspasas activadas (Caballero-Benítez y Morán, 2003). Especulando, se podría pensar que la Nox 2 podría tener un papel más importante en la vía de activación de esta caspasa inducida por St que por K5. Esto se refleja en las diferencias existente en la generación de EOR y en la viabilidad en NGC de ambos animales cuando se estimula con St, cosa que no ocurre con K5 (fig. 7).

6.4 Presencia de anión superóxido.

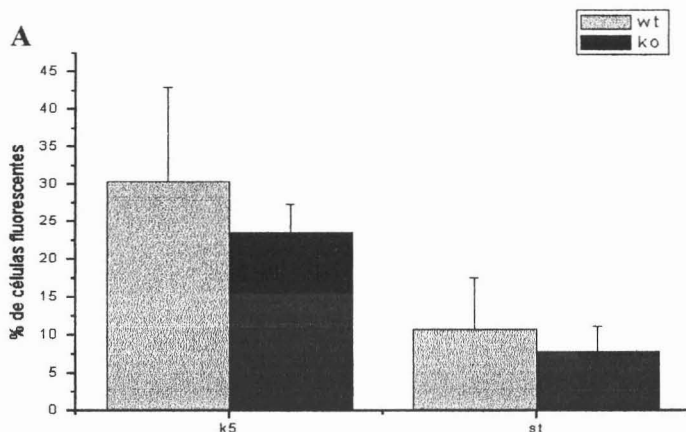
Se ha reportado anteriormente que las NGC al ser transferidas de K25 a K5 sufren un episodio de estrés oxidativo alrededor de las 3-4 horas de aplicado el estímulo apoptótico (Valencia y Morán 2001). También se ha sugerido que, en estas células, el anión superóxido podría ser la principal EOR involucrada en este estrés y que esta EOR podría ser generada por el complejo de la NADPH oxidasa. Por esta razón quisimos evaluar si en las NGC de ratones deficientes de

Nox 2 ocurría una generación de EOR, particularmente de O_2^- , por una privación de despolarización.

Como se muestra en la figura 9, las NGC tanto de ratones deficientes como de ratones silvestres presentan un aumento en la producción de O_2^- al ser transferidas a un medio con bajo potasio (K5). Lo mismo se observó al tratar las NGC con estaurosporina ($0.5 \mu M$).

Sin embargo, en las NGC de ratones silvestres se observa aparentemente una mayor producción de esta EOR alrededor de las 4 horas después de aplicado el estímulo apoptótico (K5 o St), mientras que en las de ratones deficientes la producción máxima se detecta 3 horas después. Hay que mencionar que, aunque no es estadísticamente significativo, en los ratones silvestres se observa una tendencia a una mayor producción de anión superóxido que en los deficientes.

En la figura 9 también se observa que al agregar DPI la producción de anión superóxido disminuye, en ambos tipos de NGC, de manera significativa con respecto al control pero no entre NGC de ratones silvestres y de ratones deficientes (datos graficados en la figura 13).



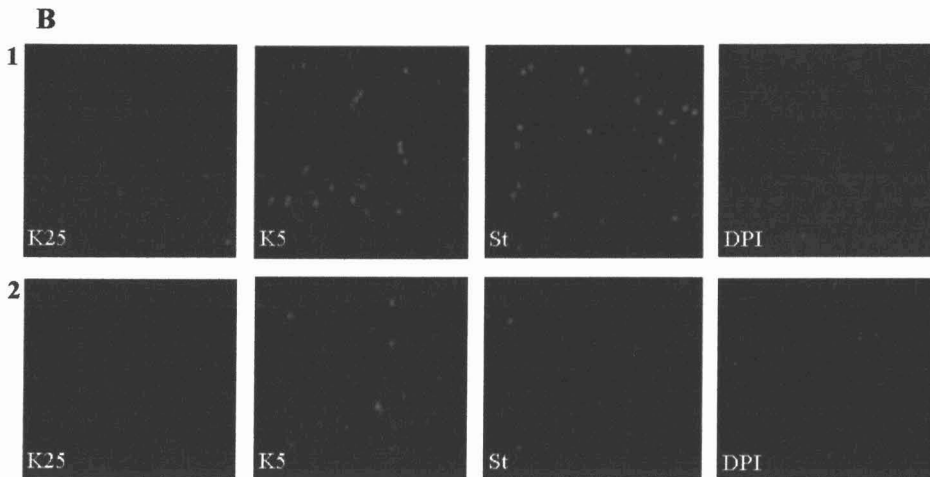


Figura 9: Cuantificación del anión superóxido en la muerte apoptótica de NGC tanto de ratones silvestres como de ratones deficientes en Nox 2 Se cuantificó la presencia de anión superóxido (ver Métodos) en NGC de ambos tipos de ratones. No existen diferencias significativas entre ellos bajo el mismo estímulo apoptótico, aunque en el caso de K5 hay una mayor producción de $O_2^{\cdot-}$ que en St. (A). Se detecta la presencia de $O_2^{\cdot-}$ con un compuesto fluorescente, rojo (B). Se puede apreciar la aparición de éste alrededor de las 4h para el caso de los ratones silvestres (B1) y 3 h en el caso de los deficientes (B2), después de la aplicación de ambos estímulos apoptóticos (k5 y St), el cual es inhibido de igual manera por el DPI en ambos casos.

6.5 Actividad de NADPH oxidasa

Debido a que existe una producción de $O_2^{\cdot-}$ en ambas NGC decidimos estudiar si éste era producido por alguna NADPH oxidasa. Para ello, se midió primeramente la activación de esta enzima después de aplicar el estímulo apoptótico de privación de potasio (K5) en NGC de ratones silvestres y deficientes en Nox 2. Como se observa en la figura 10, en NGC de ambos ratones existe actividad de NADPH inducida por K5, y además, esta actividad correlaciona temporalmente con la producción de $O_2^{\cdot-}$ observada en la figura anterior. La actividad de NADPH oxidasa es muy similar en ambos fondos genéticos, lo cual explicaría porque no se ven diferencias; posiblemente otra NADPH oxidasa este involucrada en el proceso.

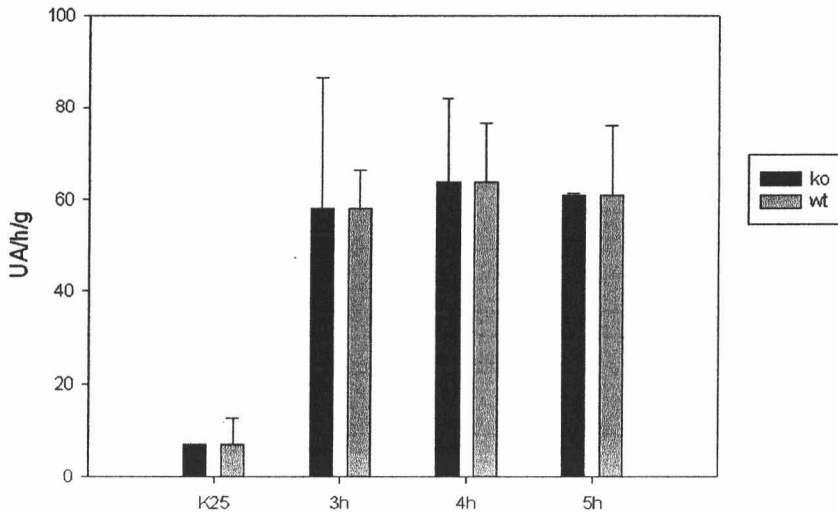


Figura 10: **Actividad de NADPH oxidasa inducida por K5.** Tanto las NGC de ratón silvestre como de ratón deficiente muestran una activación de NADPH oxidasa inducida por K5 que correlaciona con el curso temporal de la producción de anión superóxido.

6.6 Efecto del DPI en la viabilidad de las NGC

Para conocer si la muerte inducida por un estímulo apoptótico, en este caso K5, de NGC de ambos ratones pudiera estar mediada por una NADPH oxidasa se probó el efecto de distintas concentraciones de difenilenoyodonio, DPI, un inhibidor de la actividad de esta enzima tanto en preparaciones neuronales como no neuronales (Tamariello *et al.*, 2000; Noh y Koh, 2000; Kim *et al.*, 2002).

La viabilidad se midió por medio de calceína, 24 horas después de la privación de potasio, K5. En este caso se utilizó calceína debido a que el DPI interfería con la técnica del MTT, sin embargo los resultados, sólo con el estímulo apoptótico, K5, correlacionan en ambas técnicas.

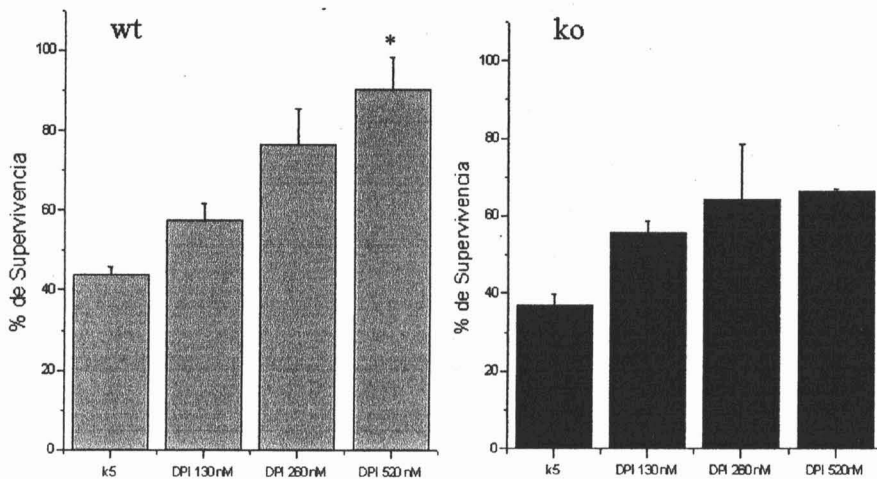


Figura 11: Efecto de DPI en la viabilidad de las NGC de ratón silvestre y deficientes en Nox2. La viabilidad se midió por medio de calcenina como se describe en Métodos. El DPI se utilizó a concentraciones de 130, 260 y 520 nM y estuvo presente al mismo tiempo del cambio de K25 a K5. La viabilidad se midió 24 hs después. Existen diferencias significativas en la concentración de DPI más alta, entre ambas NGC.

En la figura 11 se puede apreciar que el DPI protege de manera dependiente de concentración de la muerte de NGC de manera similar en ambos tipos de ratones. Sin embargo, para la concentración más alta de DPI (520 nM) existe diferencia significativa entre ambas NGC. En las NGC de ratón deficiente la recuperación es menor que en las de ratón silvestre a partir de 260 y 520 nM. Una posibilidad para explicar esto, junto con los resultados previos, es que en los ratones deficientes podría estarse activando otra Nox con una sensibilidad distinta al DPI.

6.7 Efecto de DPI en la actividad de caspasa 3

Para comprobar que este aumento en la viabilidad inducido por DPI en la células a las que se les dio el estímulo apoptótico se debe a una alteración en los mecanismos apoptóticos, medimos el efecto del DPI en la actividad de la caspasa 3 inducida por K5. Bajo estas condiciones encontramos que el tratamiento con diferentes concentraciones de DPI reduce significativamente la actividad de la caspasa 3 de igual manera en neuronas de ratones silvestres y deficientes en Nox2 (figura 12).

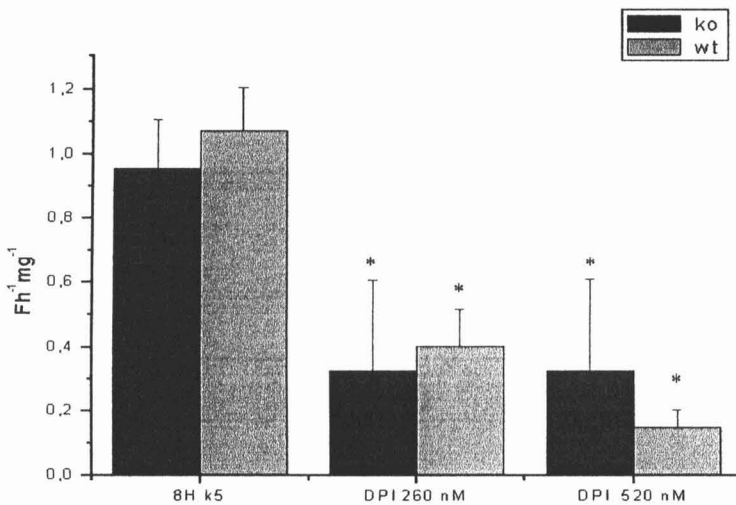


Figura 12: Actividad de caspasa-3 en presencia del DPI. La actividad de caspasa 3 fue medida después de 8 h de haberse dado el estímulo apoptótico, el DPI, a las distintas concentraciones (260 y 520 nM) fue agregado simultáneamente. En ambos casos existen diferencias significativas entre los controles sin bloqueador y los tratamientos, sin embargo no existen diferencias entre ambos tipos de NGC.

6.8 Efecto del DPI en la producción de anión superóxido inducida por K5 en NGC de ratones deficientes en Nox2 .

Finalmente, se evaluó si el DPI protegía a las NGC al reducir la producción de anión superóxido por una inhibición de la actividad de NADPH oxidasa. La figuras 8 y 12 muestran que el DPI aplicado al momento del estímulo apoptótico disminuyó significativamente la producción de esta EOR medida por dihidroetidina en NGC de ratones tanto silvestres como deficientes en Nox 2. Es pertinente mencionar que se observó una tendencia a producir menos EOR en células provenientes de los ratones deficientes que en los silvestres, aunque éstas no son significativamente diferentes (Fig 13).

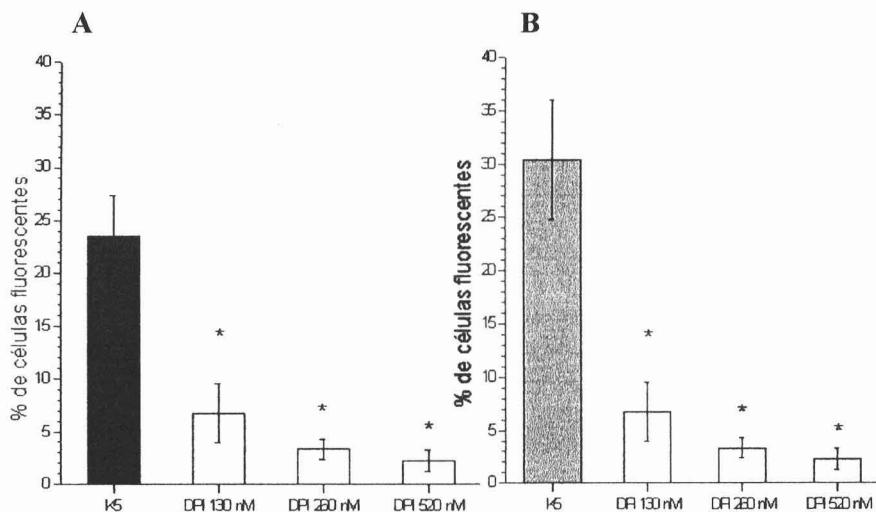


Figura 13: Comparación de la presencia de anión superóxido luego del tratamiento con DPI. El anión superóxido se detecta con la dihidroetidina, como se describe en los Métodos. En A se muestra la presencia de anión superóxido en NGC de ratones deficientes en Nox 2, la cual es inhibida significativamente por las distintas concentraciones de DPI (130, 260 y 520 nM). En B se muestran los datos para NGC de ratones silvestres. No hay diferencias significativas entre las NGC de ambos tipos de ratones.

VII. DISCUSIÓN

El cultivo de neuronas granulares de cerebelo ha resultado ser un modelo muy útil para entender los procesos celulares y moleculares de la muerte apoptótica; sin embargo, como se mencionó antes, el modelo se ha basado en el empleo de neuronas de rata. En este estudio se utilizaron cultivos de NGC de ratón, ya que el genoma de este animal ha sido enteramente secuenciado y es posible realizar manipulación genética, lo que abre la posibilidad de inhibir directamente ciertos genes, reduciéndose el problema de la utilización de drogas parcial o totalmente inespecíficas.

Existe controversia en la utilización de las NGC de ratón como modelo de muerte apoptótica, ya que algunos trabajos plantean que no necesitan de despolarización (K25) para sobrevivir en cultivo (Mogensen *et al.*, 1994; Mogensen y Jorgensen, 2000) como es el caso de las NGC de rata, lo cual plantearía un problema muy importante en la utilización de éste modelo. Sin embargo, también existen trabajos que no sólo afirman que las NGC de ratón necesitan estar despolarizadas para su supervivencia en cultivo, sino que además, comprueban que al quitarles esta despolarización las NGC de ratón, al igual que las de rata, mueren apoptóticamente (Nardi *et al.*, 1997). Otro trabajo indica que la dependencia a la despolarización de las NGC de ratón es dependiente de la cepa de la que se trate y que la cepa C57/BL6 (la utilizada en este trabajo) se comporta igual que la rata (Fujikawa *et al.*, 2000).

Por lo anterior y porque la base de este trabajo es la utilización de cultivos celulares de NGC de ratón fue muy importante contestar a la pregunta sobre si ambos cultivos se comportaban de la misma manera. En este trabajo se demostró que sí, por lo que se puede concluir que las NGC de ratón pueden ser utilizadas como modelo para estudios futuros.

Parte de este estudio consistió primeramente en validar las NGC de ratón como modelo de muerte apoptótica inducida por K5, ya que en estudios previos se había sugerido que estas neuronas no eran dependientes de despolarización para sobrevivir en cultivo (Mogensen *et al.*, 1994; Mogensen y Jorgensen, 2000) . Los resultados obtenidos mostraron que las NGC de ratón tienen un comportamiento muy similar a lo observado en las neuronas de rata. Esto es cierto , no sólo en relación al efecto que tiene el cambio de un medio K25 a K5, sino también al efecto de estaurosporina y a los parámetros apoptótico medidos con ambos estímulos de muerte.

Después de contestar esta pregunta nos enfocamos en contestar la segunda parte de este trabajo, ¿Cuál es el papel de la NADPH-oxidasa, particularmente la Nox 2 en el proceso de muerte apoptótica inducida por dos estímulos de muerte? Para esto se utilizaron NGC de ratones deficientes en Nox 2, los cuales están muy bien caracterizados debido a que son el modelo de estudio de una enfermedad humana hereditaria llamada granulomatosis crónica, donde los pacientes están inmunosuprimidos por falta de actividad de la NADPH-oxidasa de macrófagos (Pollock *et al.*, 1995) .

Se decidió utilizar Nox 2 debido a que estudios previos en el laboratorio habían encontrado que al menos 4 de las 5 subunidades de esta NADPH oxidasa están presentes en las neuronas granulares de cerebelo: gp91-phox (Nox2) , la subunidad catalítica, y p22-phox, p47-phox y p67-phox, subunidades accesorias, además de sugerir que la activación de la NADPH oxidasa podría estar involucrada con el inicio de este proceso de muerte neuronal.

Por otro lado, existen antecedentes que señalan a esta enzima como participante en la muerte apoptótica de otros cultivos neuronales (Noh y Koh, 2000; Kim *et al.*, 2002; Hwang *et al.*, 2002), así como en modelos *in vivo* donde se sabe que al no haber una NADPH oxidasa funcional se reduce el daño por isquemia (Walder, 1997). El antecedente más directo de este trabajo es en

neuronas simpáticas del ganglio cervical superior en cultivo, donde experimentos realizados con neuronas de ratones deficientes en Nox 2 han resultado en el bloqueo de la muerte apoptótica al ser privadas de un estímulo trófico (NGF) (Tammariello *et al.*, 2000).

El resultado más significativo de nuestro estudio mostró que las NGC de animales deficientes en Nox 2 mueren al ser tratadas con ambos estímulos como ocurrió en las neuronas de ratones silvestres. Así, una de las conclusiones derivadas de este estudio es que la Nox 2 no es indispensable para la progresión de la muerte de las NGC ya que cuando ésta no es funcional, como en el caso de los ratones deficientes, las NGC mueren de igual manera que cuando ésta permanece activa (ratones silvestres). Esta idea se apoya por el hecho de que la mutación de Nox 2 no es letal ya que los ratones deficientes no sólo nacen sino que sobreviven hasta la edad adulta e incluso tienen descendencia.

Lo anterior no sólo es cierto para la viabilidad neuronal, sino también para un parámetro de muerte apoptótica, la activación de caspasa 3 observada en estas neuronas, lo cual apoya la sugerencia de que las neuronas deficientes en Nox 2 también mueren apoptóticamente como las células silvestres. Así, la deficiencia de Nox 2 parece no afectar el tipo ni los mecanismos involucrados en la muerte inducida por K5 y estaurosporina en estas neuronas.

La falta de coincidencia de estos resultados con los antecedentes mencionados puede tener distintas explicaciones, las cuales no son necesariamente excluyentes. La primera podría ser que el sistema nervioso periférico se comporte diferente que el sistema nervioso central (SNC) en sus requerimientos para llevar a cabo una muerte apoptótica exitosa. Por ejemplo, en modelos de animales deficientes tanto en caspasa 3 como 9, ocurre un desarrollo anormal del cerebro pero un desarrollo normal en la médula espinal (Oppenheim *et al.*, 2001), sugiriendo que aún dentro del propio SNC existen diferentes requerimientos para las distintas poblaciones neuronales. Así, en

nuestro modelo, aunque existen antecedentes de la participación de la NADPH oxidasa en la muerte apoptótica de neuronas del SNC, en ninguno de estos trabajos se ha utilizado una eliminación genética de la enzima sino que se han utilizado bloqueadores de la misma, lo que nos lleva a la segunda explicación.

El efecto del DPI y de otros bloqueadores de NADPH-oxidasa en la viabilidad, generación de EOR y actividad de caspasa 3 en neuronas normales y deficientes en Nox 2 indican la participación de este complejo en el proceso de muerte. Esto sugeriría la participación de isoformas de Nox distintas a Nox 2 que pudieran ser inhibidas por DPI. De hecho, recientemente se han clonado al menos 6 formas Nox con una alta homología a Nox 2 (Cheng *et al.*, 2001; Lambeth, 2004). Por lo que otra explicación alternativa podría ser que en las neuronas simpáticas sólo exista Nox 2 mientras que en el sistema nervioso central, más específicamente en las NGC, existan otros miembros de la familia de las Nox, lo que no sería difícil de explicar debido a que se sabe que la distribución de estas isoformas es diferente según el tipo celular (Cheng *et al.*, 2001; Bokoch y Knaus, 2003; Lambeth, 2004). Esto se dificulta por el hecho de que el modelo de apoptosis de NGC por K5 simula lo que ocurre en el desarrollo y se sabe que durante el mismo, la mayoría de los tejidos expresan las diferentes isoformas (Cheng *et al.*, 2001).

Lo anterior concuerda con lo observado en este trabajo, ya que si bien, se descarta la participación de Nox 2 en la muerte apoptótica de las NGC, las evidencias apuntan a una posible participación de otras Nox. Entre estas evidencias, se puede mencionar que como se vio en la figura 9 de este trabajo, en las NGC de ratones deficientes de Nox 2 se sigue observando una producción de anión superóxido a tiempos tempranos después de dar el estímulo apoptótico, y no sólo eso sino que esta producción correlaciona con la activación de una NADPH oxidasa (figura 10).

Otro resultado interesante que también apoya la idea de que en la apoptosis de las NGC pudiera estar participando otra Nox diferente de la 2 es que al utilizar el DPI, no sólo se aumenta la supervivencia de las células después de ser tratadas, sino que también disminuye la activación de la caspasa 3. Sin embargo, esta inhibición de la muerte no es completa, ya que aunque la activación de la caspasa 3 se reduce significativamente con el uso del DPI, éste no es completamente efectivo. Estos resultados concuerdan con resultados de trabajos previos donde la utilización de antioxidantes tampoco ofrecen una protección total (Valencia y Morán, 2001), lo que sugiere que en la activación de esta caspasa, y por lo tanto en la muerte apoptótica de estas células, podrían estar involucradas otras vías intracelulares independientes del estrés oxidativo, y posiblemente independientes de la actividad de NADPH oxidasa.

Por otro lado, con base en los resultados de este trabajo es difícil descartar definitivamente la participación de Nox 2 en la muerte apoptótica de las NGC, ya que podría ser que en condiciones normales esta isoforma este involucrada en el proceso de muerte, pero que su deficiencia podría ser compensada por otra de las isoformas. Para probar esto, o conocer si otras isoformas participan parcial o totalmente en este proceso, es necesario saber si existen otras Nox en las NGC, lo cual no ha sido publicado con anterioridad. Sin embargo, en estudios preliminares de nuestro laboratorio hemos detectado la presencia de otros miembros de esta familia, como Nox 1 y Nox 4, a nivel de ARNm.

Así, es necesario llevar a cabo una serie de estudios en este campo para dilucidar la participación de la familia de las NADPH oxidasas en la muerte apoptótica, no sólo de manera fisiológica sino también en las diferentes patologías, como es el caso de la enfermedad de Alzheimer (Shimohama *et al.*, 2000; Zekry *et al.*, 2003) y de la enfermedad de Parkinson (Wu *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2004) donde se han encontrado evidencias de que existe una participación activa de esta enzima.

VII. CONCLUSIONES

- Las NGC de ratón en cultivo se comportan de la misma manera que las NGC de rata por lo que pueden ser utilizadas como modelo de muerte apoptótica *in vitro*.
- Las NGC de ratones silvestres y las de ratones deficientes en Nox 2 responden de la misma manera tanto en la viabilidad como en la producción de anión superóxido y la activación de caspasa-3 ante los distintos estímulos apoptóticos.
- La inhibición de la actividad de la NADPH oxidasa, con DPI, induce una reducción en la generación de anión superóxido, en la actividad de caspasa 3 y por lo tanto, en la muerte neuronal.
- Nox 2 no es indispensable para la muerte apoptótica de las NGC de ratón, lo que sugiere la participación de otros miembros de la familia de las NADPH oxidasas en este proceso.

VI. Referencias

- 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.
- Arnold RS, Shi J, Murad E, Whalem AM, Sun CQ, Polavarapu R, Parthasarathy S, Petros JA, Lambeth JD. 2001. Hydrogen peroxide mediates the cell growth and transformation caused by the mitogenic oxidase Nox 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 5550-5555.
- Babior BM, Lambeth JD, Nauseef W. 2002. The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys*, 397: 342-244.
- Baker MA y Aitken RJ. 2004. The importance of redox regulated pathways in sperm cell biology. *Mol Cell Endocrinol.* 216(1-2): 47-54.
- Balázs R, Jorgensen OS, Hack N. 1988. N-methyl-D-aspartate promotes the survival of cerebellum granule cells in culture. *Neuroscience*, 27: 437-451.
- Banfi B, Molnar G, Maturana A, Steger K, Hegedus B, Demareux N, Krause KH. 2001. A Ca²⁺-activated NADPH oxidase in testis, spleen and lymph nodes. *J. Biol. Chem.* 276: 37594-37601.
- Bokoch GM y Knaus UG. 2003. NADPH oxidases: not for leucocytes anymore!. *Trends Biochem Sci.* 28(9): 502-208.
- 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.
- Brar SS, Corbin Z, Kennedy TP, Hemendinger R, Thornton L, Bommarium B, Arnold RS, Whorton AR, Sturrock AB, Huecksteadt TP, Quinn MT, Krenitsky K, Ardie KG, Lambeth JD, Hoidal JR. 2003. Nox 5 NAD(P)H oxidase regulates growth and apoptosis in DU145 prostate cancer cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol*, 285:C353-C369.

- Burek MJ y Oppenheim RW. 1996. Programed cell death in the developing nervous system. *Brain Pathol.* 6(4):427-46.
- Caballero-Benítez A. y Morán J. 2003. Caspase activation pathways induced by staurosporine and low potassium: Role of caspase-2. *J. Neurosci. Res.* 71 :383-396.
- Cadenas E y Davies KJ. 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med.* 29(3-4):222-30.
- 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.
- Clark RA, Epperson TK, Valente AJ. 2004. Mechanisms of activation of NADPH oxidases. *Jpn. J. Infect. Dis.* 57:S22-S23.
- 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.
- Danial NN y Korsmeyer SJ. 2004. Cell death: critical control points. *Cell.* 116(2):205-19.
- 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.
- Edens WA, Sharling L, Cheng G, Shapira R, Kinkade JM, Lee T, Edens HA, Tang X, Sullards C, Flaherty DB. 2001. Tyrosin cross-linking of extracellular matrix is catalyzed by Duox, a multidomain oxidase/oxidoreductase with homology to the phagocyte oxidase subunit gp91phox. *J. Cell. Biol.* 154:879-891.
- Fontayne A, My-Chan Dang P, Gougerot-Pocidallo M, Benna J. 2002. Phosphorylation of p47phox sites by PKC α , β II, and ζ : effect on binding to p22phox and on NADPH oxidase activation. *Biochem.* 41:7743-7750.
- Fujikawa N, Tominagua-Yoshino K, Okabe M, Ogura A. 2000. Depolarization-dependent survival of cultured mouse cerebellar granule neurons is strain-restrained. *Eur J Neurosci.* 12: 1838-1842.
- Gallo V, Kingsbury A, Balázs R y Jorgensen OS. 1987. The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J. Neurosci.* 7: 2203-2213.

- Geiszt M, Kopp JB, Varnai P, Leto TL. 2000. Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 8010-8014.
- Geiszt M y Leto TL. 2004. The Nox family of NAD(P)H oxidases: Host defense and beyond. *JBC*.
- Gerhardt E, Kügler S, Leist M, Beier C, Berliochi 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.
- Green DG y Beere HM. 2001. Mostly dead. *Nature*. 412: 133-134.
- Groemping Y, Lapouge K, Smerdon SJ, Rittinger K. 2003. Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase. *Cell* 113: 343-355.
- Halliwell B. 1992. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem*. 59: 1609-1623.
- Henderson LM, Banting G, Chapell JB. 1995. The arachidonate-activable, NADPH oxidase-associated H⁺ channel. Evidence that gp91-phox function as an essential part of the channel. *J Biol Chem*. 270(11):5909-16.
- Hengartner MO. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 407(6805):770-6.
- Hwang JJ, Choi SY, Koh JY. 2002. The role of NADPH, 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.
- Jacobson MD, Weil M, Raff MC. 1997. Programmed cell death in animal development. *Cell*. 88: 347-354.
- 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(5):821-31.
- Kowaltowski AJ, Vercesi AE. 1999. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 26(3-4):463-71.
- Krause KH. 2004. Tissue distribution and putative physiological function of NOX family NADPH oxidases. *Jpn. J. Infect. Dis*. 57:S28-S29.

- Kroemer G. 1998. The mitochondrion as an integrator/coordinator of cell death pathways. *Cell Death Differ.* 1998 Jun;5(6):547.
- Lambeth JD, Cheng G, Arnold RS, Edens WE. 2000. Novel homologs of gp91phox. *Trends Biochem Sci*, 29: 459-416.
- Lambeth JD. 2004. Nox enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature*, 4: 181-189.
- Mahadev K, Motoshima H, Wu X, Ruddy JM, Arnold RS, Cheng G, Lambeth JD, Goldstein BJ. 2004. The NAD(P)H oxidase homolog Nox 4 modulates insulin-stimulated generation of H₂O₂ and plays an integral role in insulin signal transduction. *Mol Cell Biol*, 24: 1844-1854.
- Martín-Romero FJ, García-Martín E, Gutierrez-Merino C. 2002. Inhibition of oxidative stress produced by plasma membrane NADH oxidase delays low-potassium-induced apoptosis of cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* 72: 705-715.
- Mogensen HS, Hack N, Balazs R, Jorgensen OS. 1994. The survival of cultured mouse cerebellar granule cells is not dependent on elevated potassium ion concentration. 1994. *Int. J. Devl Neurosci.* 12(5): 450-460.
- Mogensen HS, Jorgensen OS. 2000. AMPA receptor subunit mRNAs and intracellular Ca²⁺ in cultured mouse and rat cerebellar granule cells. *Int J Devl Neurosci.* 18: 61-68.
- Morán J, Patel AJ. 1989. Effect of potassium depolarization on phosphate-activated glutaminase activity in primary cultures of cerebellar and 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 JC, Bikker H, Kempers MJ, van Trotsenburg AS, Baas F, de Vijlder JJ, Vulsma T, Ris-Staplers C. 2002. Inactivating mutations in the gene for thyroid oxidase 2 (THOX2) and congenital hypothyroidism. *N. Engl. J. Med.* 347: 95-102.
- Nardi N, Avidan G, Daily 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.

- Nicholls DG y Budd SL. 2000. Mitochondria and neuronal survival. *Physiol Rev.* 1: 315-360.
- Nijhawan D, Honarpour N, Wang X. 2000. Apoptosis in neural development and disease. *Annu Rev Neurosci.* 23 :73-87.
- Noh K y Koh. 2000. Induction and activation by zinc of NADPH oxidase in cultured cortical neurons and astrocytes. *J Neurosci.* 20(23):RC111.
- Oppenheim R, Prevet D, Tytell M, Homma S. 1990. Naturally occurring and induced neuronal death in the chick embryo in vivo requires protein and RNA synthesis: evidence for the role of cell death genes. *Dev Biol,* 138: 104.
- Oppenheim RW, Flavell RA, Vinsant S, Prevet D, Kuan C, Rakic P. 2001. Programmed cell death of developing mammalian neurons after genetic deletion of caspases. *J Neurosci.* 21(13):4752-4760.
- Paffenholz R, Bergstrom RA, Pasutto F, Wabnitz P, Munroe RJ, Jagla W, Heinzmann U, Marquardt A, Bareiss A, Laufs J. 2004. Vestibular defects in head-tilt mice result from mutations in Nox3, encoding a NADPH oxidase. *Genes Dev.* 18: 486-491.
- Pollock JD, Williams DA, Gifford MA, Li LL, Du X, Fisherman J, Orkin SH, Doerschuck CM, Dinauer MC. 1995. Mouse model of X-linked chronic granulomatous disease, an inherited defect in phagocyte superoxide production. *Nat Genet.* 9:202-209.
- Raff MC, Barres BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD. 1993. Programmed cell death and the control of cell survival: lesson from the nervous system. *Science,* 62: 695-700.
- Sakaguchi N, Inoue M, Ogihara Y. 1998. Reactive oxygen species and intracellular Ca²⁺, common signals for apoptosis induced by gallic acid. *Biochem Pharmacol.* 55: 1973-1981.
- Satoh T, Numakawa T, Abiru Y, Yamagata T, Ishikawa Y, Enokido Y, Hataatanaka 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.
- Sastry PS y Rao KS. 2000. Apoptosis and the nervous system. *J. Neurochem.* 74:1-20.
- Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J. 2001. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem.* 11(4):173-86.

- 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.
- Shiose A, Kuroda J, Tsuruya K, Hirai M, Hirakata H, Naito S, Hattori M, Sakaki Y, Sumimoto H. 2001. A novel superoxide-producing NAD(P)H oxidase in kidney. *J Biol. Chem.* 276: 1417-1423.
- Shimohama S, Tanino H, Kawakami N, Okamura N, Kodama H, Yamaguchi T, Hayakawa T, Numonura A, Chiba S, Perry G, Smith MA, Fujimoto S. 2000. Activation of NADPH oxidase in Alzheimer's disease brains. *Biochem Biophys Res Com.* 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 sulphate: absolute lipid dependence of the solubilized enzyme. *J. Biol. Chem.* 264(16): 9195-9203.
- Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D, Chung AB, Griendling KK, Lambeth JD. 1999. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox 1. *Nature* 401: 79-82.
- Tammariello S, Quinn M, Estus S. 2000. NADPH contributes directly to oxidative stress and apoptosis in nerve growth factor-deprived sympathetic neurons. *J. Neurosci.* 20: 1-5.
- Tan S, Sagara Y, Liu Y, Maher P y Schubert D. 1998. The regulation of reactive oxygen species production during programmed cell death. *Cell Biol J.* 141: 1423-1432.
- Taylor J, Gatchalian CL, Keen G, Rubin LL. 1997. Apoptosis in cerebellar granule neurones: involvement of interleukin-1 β converting enzyme-like proteases. *J. Neurochem.* 68: 1598-1605.
- Thornberry N y Lazebnik Y. 1998. Caspases: enemies within. *Science.* 281: 1312-1316.
- 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.
- Vaux DL y Korsmeyer SJ. 1999. Cell death in development. *Cell.* 96:245-254.

- Walder CE, .1997. Ischemic stroke injury is reduced in mice lacking a functional NADPH oxidase. *Am Heart Ass.* 28(11):2252.
- Wu DC, Teismann P, Tieu K, Vila M, Jakson-Lewis V, Ischiropoulos H, Przedborsky S. 2003. NADPH oxidase mediates oxidative stress in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100: 6145-6150.
- Yang S, Madyastha P, Bingel S, Ries W, Key L. 2001. A new superoxide-generating oxidase in murine osteoclasts. *J Biol. Chem.* 276: 5452-5458.
- Zhang W, Wang T, Qin L, Gao HM, Wilson B, Ali SF, Zhang W, Hong JS, Liu B. 2004. Neuroprotective effect of dextromethrophan in the MPTP Parkinson's disease model: role of NADPH oxidase. *FASEB Journal.*
- Zekry D, Epperson TK, Krause KH. 2003. A role for NOX NADPH oxidases in Alzheimer's disease and other types of dementia?. *Life.* 55(6): 307-313.