

00591

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

**“Correlación entre estrés oxidativo y muerte neuronal en
el desarrollo del ratón”**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS**

P R E S E N T A

María del Rayo Sánchez Carbente

Director de Tesis: Dra. Verónica Narváez Padilla

Cuernavaca, Mor., 2005



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.

RESUMEN

La muerte celular programada (MCP) juega un papel fundamental en la morfogénesis del sistema nervioso central. Durante el desarrollo de la médula espinal, alrededor de la mitad de la población de las motoneuronas sufre MCP en regiones y tiempos bien establecidos. Las especies reactivas de oxígeno (ERO) se han propuesto como mediadoras de la muerte celular programada en distintos modelos *in vitro*, así como en procesos neurodegenerativos. Existen evidencias de que las caspasas participan como ejecutoras de la MCP en el desarrollo del sistema nervioso, sin embargo, poco se sabe de las señales que podrían estar activando la muerte. El objetivo del presente trabajo fue establecer la participación de las ERO en la muerte celular de las motoneuronas durante el desarrollo de la médula espinal.

Los resultados muestran que los incrementos de las ERO, la expresión de distintas enzimas antioxidantes y la muerte de las motoneuronas correlacionan a lo largo del desarrollo de la médula espinal. En cultivos de médula espinal embrionaria, la presencia de un antioxidante con actividad de catalasa y de superóxido dismutasa (EUK-134) reduce los niveles de ERO así como el número de células que mueren, e incrementa el número de motoneuronas que sobreviven. De manera interesante, el número de motoneuronas es mayor en las médulas espinales tratadas con el antioxidante que en las tratadas con distintos inhibidores de las caspasas. Por otro lado, el incremento en la

sobrevivencia de las motoneuronas no correlaciona con la reducción del número de células con degradación de DNA en la región de las motoneuronas. Los resultados sugieren que las ERO son moléculas de señalización que controlan la muerte de las motoneuronas de manera dependiente e independiente de las caspasas.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.
NOMBRE: Ma del Rayo Sánchez
Corrente
FECHA: 13 DICIEMBRE
FIRMA: 

ABSTRACT

Programmed cell death (PCD) is an important mechanism in nervous system morphogenesis. During embryonic development, approximately one-half of the spinal cord motoneurons died in well known regions and times. The involvement of reactive oxygen species (ROS) in neuronal death has been determined in several *in vitro* systems as well as in neurodegenerative disorders. To date it has been established that at least the caspases are executing the cell death, however the upstream signals that are triggering this phenomenon during the nervous system development is unclear. We examined whether ROS participate in the cell death observed during spinal cord development. We found that the general pattern of high ROS levels, gene expression for some antioxidant enzymes, and motoneuron death correlated positively along spinal cord development. ROS were reduced in spinal cords cultured in the presence of a synthetic superoxide dismutase and catalase mimetic, with a concomitant reduction in cell death and an increase in the number of motoneurons. The number of motoneurons was higher in spinal cords treated with the antioxidant than those treated with caspase inhibitors. These results suggest that ROS are signaling molecules controlling caspase-dependent and caspase-independent programmed motoneuron death, and support the hypothesis that this mechanism is abnormally turned on in some neurodegenerative disorders and aging.

INDICE

DEDICATORIAS

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN.....	5
ABSTRACT.....	7
INDICE.....	8
LISTA DE ABREVIATURAS.....	12
I. INTRODUCCIÓN.....	13
1. Muerte celular.....	14
1.1. Muerte celular programada.....	14
1.1.1. ¿Qué es la muerte celular programada?.....	14
1.1.2. Tipos de muerte celular programada.....	15
1.1.2.1. Apoptosis o muerte tipo I.....	16
a) Morfología	
b) Apoptosis dependiente de caspasas	
i) Maquinaria de muerte	
ii) Vías apoptóticas de muerte	
c) Apoptosis independiente de caspasas	
i) Apoptosis dependiente de Aif	
ii) Apoptosis dependiente de EndoG	
1.1.2.2. Autofagia o muerte tipo II.....	27
a) Morfología	
b) Maquinaria de muerte	
1.1.2.3. Degradación vesiculada o muerte tipo III.....	30
1.2. Muerte celular durante el desarrollo embrionario y función.....	32
1.2.1. Modelado de estructuras	
1.2.2. Remoción de estructuras	
1.2.3. Control del número celular	
1.2.4. Eliminación de células anormales	

1.3. Muerte celular programada en el sistema nervioso central.....	35
1.3.1. Durante el desarrollo embrionario	
2. Arquitectura de la médula espinal.....	37
3. Equilibrio redox.....	41
3.1. Especies reactivas de oxígeno.....	41
3.1.1. Anión superóxido	
3.1.2. Peróxido de hidrógeno	
3.1.3. Radical hidroxilo	
3.1.4. Peroxinitrito y óxido nítrico	
3.2. Sistemas antioxidantes.....	45
3.2.1. Enzimas antioxidantes	
3.2.2. Antioxidantes no-proteicos	
3.3. Daño a macromoléculas por las ERO.....	50
3.4. Las ERO como segundos mensajeros.....	52
4. Muerte celular y ERO.....	53
4.1. Evidencias generales.....	53
4.2. Neurodegeneración.....	56
4.3. Evidencias durante el desarrollo embrionario.....	57
II. JUSTIFICACION.....	59
III. HIPOTESIS.....	59
IV. OBJETIVOS.....	60
1. Objetivo general	
2. Objetivos particulares	
V. MATERIALES Y METODOS.....	61
1. Animales.....	61

2. Disección de medulas embrionarias.....	61
3. Explantes de médula espinal embrionaria.....	61
4. Histología.....	62
4.1. Criosecciones de médula espinal embrionaria.....	62
4.2. Secciones en parafina de tejidos embrionarios.....	63
5. Análisis de muerte celular programada.....	65
5.1. Tinción con anaranjado de acridina.....	65
5.2. TUNEL.....	66
• Técnica de TUNEL en criosecciones	
• Técnica de TUNEL en cortes en parafina	
6. Detección de EORs <i>in situ</i>	70
6.1. Tinción con dihidrorodamina 123.....	70
6.2. Tinción con hidroetidio.....	70
7. Inmunofluorescencia.....	70
7.1. Detección de Islet 1/2.....	70
7.2. Detección de bromo-deoxi-uridina.....	72
8. Hibridaciones <i>in situ</i>	74
8.1. En pieza completa.....	74
8.2. Sobre cortes de parafina.....	81
 VI. RESULTADOS.....	 86
1. Muerte celular y estrés oxidativo durante el desarrollo del sistema nervioso central.....	86
1.1 Patrones de muerte celular en el sistema nervioso central anterior.....	86
1.2 Muerte celular y ERO en la médula espinal.....	88
2. Patrones de expresión de enzimas antioxidantes.....	89
2.1. Durante el desarrollo del SNC anterior.....	89
2.2. Durante el desarrollo de la médula espinal.....	90
3. Efecto del EUK-134 en la muerte celular embrionaria.....	91

3.1. Efecto del EUK-134 en el desarrollo embrionario. Inyección del antioxidante en el saco amniótico.....	91
3.2. El antioxidante ERUK-134 induce la supervivencia neuronal. Uso de explantes de médula espinal.....	92
3.2.1. Efecto del EUK-134 en la población de motoneuronas.	
3.2.2. Efecto del EUK-134 en una población interneuronal.	
3.2.3. Mecanismos de muerte celular en las motoneuronas	
4. Muerte celular y ERO en las extremidades anteriores en desarrollo.....	96
4.1 Expresión de enzimas antioxidantes.....	96
4.2. Efecto del EUK-134 en la regresión interdigital.....	97
5. Resultados-Figuras.....	98
VII. DISCUSIÓN.....	108
VIII. CONCLUSIONES.....	125
IX. PERSPECTIVAS.....	127
X. ANEXO.....	129
XI. REFERENCIAS.....	130

ABREVIATURAS

AA	anaranjando de acridina
Aif	siglas en inglés "apoptosis-inducing factor"
ALS	siglas en inglés "amyotrophic lateral sclerosis"
Apaf-1	siglas en inglés "apoptotic protease activating factor"
BCL-2	siglas en inglés "B-cell lymphome 2"
BH	siglas en inglés "Bcl-2 homology"
CARD	siglas en inglés "caspase-activating recruitment domain"
CT-1	cardiotropina-1
DD	siglas en inglés "death domain"
DED	siglas en inglés "death effector domain"
DHR-123	Dihidrorodamina 123
DISC	siglas en inglés "death-inducing signaling complex"
DMEM	siglas en inglés "Dulbecco medium .."
DRG	siglas en inglés "dorsal root-ganglion"
EndoG	endonucleasa G
ERO	especies reactivas de oxígeno
GSH	glutación
GPx	Glutación peroxidasa
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
Het	Hidroetideno
HO·	ión hidroxilo
MAP1-LC3	siglas en inglés "microtubule-associated protein 1 light chain"
MCP	muerte celular programada
MMP	siglas en inglés "mitochondrial membrana permeabilization"
MPP	1-metil-4-fenil-piridinio
MN	motoneuronas
mTOR	siglas en inglés "mammalian target of rapamycin"
NFG	siglas en inglés "neuronal growth factor"
NO	óxido nítrico
NOS	siglas en inglés "nitric oxid sintase"
OH·	radical hidroxilo
O ₂ ⁻	anión superóxido
ONOO-	peroxinitrito
PBS	siglas en inglés "phosphate buffered saline"
PFA	paraformaldehído
PI3K	siglas en inglés "phosphatidyl inositol-3-kinase"
PtdIns3P	siglas en inglés "phosphatityl inositol-3-phosphate"
RER	retículo endoplásmico rugoso
SN	sistema nervioso
SNC	sistema nervioso central
SOD	superoxido dismutasa
TNF	siglas en inglés "tumor necrosis factor"
Trx	Tioredoxina
TUNEL	siglas en inglés "Transferase-dUTP-nucleotide end labelling"

I. INTRODUCCIÓN.

La muerte celular programada (MCP), al igual que la proliferación y la diferenciación, es un fenómeno activo y controlado tanto en el desarrollo embrionario como en la vida adulta de distintos organismos multicelulares. Entre las funciones que se le atribuyen a la MCP están: el modelado de estructuras, la degeneración de tejidos transitorios, la destrucción de células dañadas y la eliminación de células que se han producido en exceso. Dentro de ésta última categoría se encuentra la muerte de las neuronas motoras durante el desarrollo de la médula espinal.

En la actualidad se sabe mucho acerca de los componentes que ejecutan la muerte celular, sin embargo aún no es claro cuáles son las señales que desencadenan este proceso. Las especies reactivas de oxígeno (ERO) se han propuesto como señales intracelulares que disparan el proceso de muerte celular. La mayoría de las evidencias a favor de esta hipótesis han sido realizados en células en cultivo o en modelos de enfermedades neurodegenerativas, sin embargo pocas evidencias apoyan que las ERO participen en la MCP que ocurre durante el desarrollo normal del organismo. En particular, poco se sabe del papel que tienen las ERO en la muerte celular en el desarrollo del sistema nervioso (SN).

1. Muerte celular.

1.1. Muerte celular programada.

La importancia de la muerte celular fue documentada por Glücksmann en 1951 [1]. Este proceso celular es fundamental tanto para la morfogénesis durante el desarrollo embrionario como para la homeostasis celular de los tejidos en los organismos adultos. Cualquier desorden en el equilibrio de la muerte celular lleva a diversos trastornos: mientras que un exceso lleva a enfermedades degenerativas agudas o crónicas, inmunodeficiencia o infertilidad [2], su ausencia provoca cáncer o enfermedades autoinmunes. Diferentes términos han sido utilizados para describir la morfología y la bioquímica de la muerte celular fisiológica, siendo el más apropiado el de muerte celular programada (MCP).

1.1.1. ¿Qué es la muerte celular programada?

Una célula puede morir por daños físicos o estímulos tóxicos. A este tipo de muerte se le llama necrosis. Sin embargo, existe un tipo de muerte celular que se da a través de una serie de eventos regulados genéticamente y a la cual se le denomina MCP. En la actualidad el término "programada" tiene un sentido operacional, ya que se refiere a eventos controlados [3]. Inicialmente y bajo la perspectiva de la biología del desarrollo, la MCP se refiere a la muerte que ocurre en lugares y tiempos predecibles durante el desarrollo, enfatizando que ésta está

planeada en el desarrollo de los organismos [4]. La MCP puede ser autónoma (intrínseca a la célula) –esto quiere decir que la célula induce su muerte- o puede reflejar la actividad de poblaciones celulares adyacentes o lejanas, como en aquellas donde su muerte está controlada por la ausencia de factores de crecimiento o por la presencia de factores que pueden activar el programa de suicidio en las células blanco[5].

Hace algunos años, el término apoptosis y MCP se utilizaban como sinónimos. Si bien es cierto que la apoptosis ocurre de manera fisiológica, -ya que se observa en el desarrollo embrionario y en la etapa adulta de los organismos- ambos términos no son equivalentes. En la actualidad se han descrito otros tipos de MCP diferentes a la apoptosis [6, 7].

1.1.2. Tipos de muerte celular.

Schweichel y Merker en 1973 describieron que tres tipos de muerte celular ocurren durante el desarrollo con base en estudios de microscopía electrónica de tejidos embrionarios de ratones y ratas, tomando en cuenta principalmente el papel de los lisosomas [8].

1.1.2.1. Apoptosis o muerte tipo I.

a) Morfología

Muchas células eucarióticas mueren por apoptosis en una serie de cambios bioquímicos y morfológicos estereotípicos. Kerr en 1972, acuñó el término de apoptosis, el cual en griego denota la caída de las hojas de los árboles o los pétalos de las flores [9]. Ésta se caracteriza morfológicamente por presentar condensación citoplásmica, picnosis nuclear (se forman masas densas de cromatina que hacen ver al núcleo condensado), colapso del citoesqueleto, plegamiento de la membrana celular, y formación de cuerpos apoptóticos rodeados de membrana. Los restos de la célula son fagocitados y digeridos en los lisosomas de macrófagos o células vecinas (Fig 1) [10, 11]. No hay inflamación, debido a que no se vierten restos celulares al espacio extracelular. En la vía canónica de la apoptosis, la activación de proteasas específicas conocidas como caspasas da lugar a las características morfológicas y bioquímicas de este tipo de muerte. Sin embargo, existen muertes apoptóticas que no requieren la activación de caspasas. Entre los cambios bioquímicos de la apoptosis se encuentra la activación de las caspasas, la fragmentación del DNA, el despliegue de marcadores de fagocitosis en la superficie celular tales como la fosfatidilserina y la disipación del potencial de la membrana mitocondrial [12]

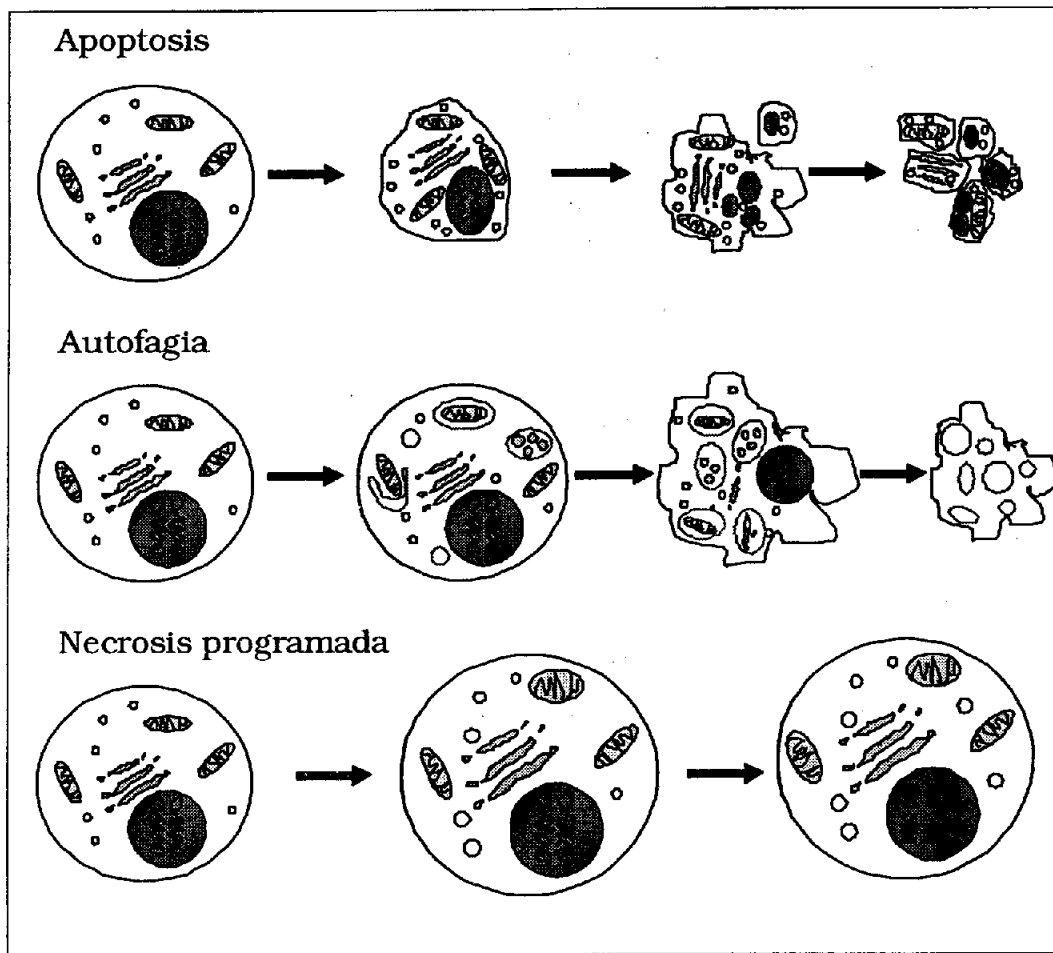


Fig 1. Representación de la morfología de los distintos tipos de muerte celular programada.

b) Muerte apoptótica dependiente de caspasas.

Los cambios morfológicos estereotípicos de la apoptosis son generalmente el resultado de la activación de una maquinaria suicida intrínseca de la célula, la cual se ha conservado a través de la evolución. El componente central de esta maquinaria suicida son las caspasas y los principales reguladores de la apoptosis son miembros de la familia Bcl-2. La muerte por apoptosis puede ser llevada a cabo generalmente por dos rutas: la vía extrínseca, mediada por receptores de muerte -un subgrupo

de receptores de la familia TNF- y la vía intrínseca cuyo escenario principal es la mitocondria y que está regulada por miembros de la familia Bcl-2 [3, 13].

i) Maquinaria de muerte

- **La familia de las caspasas.**

Las caspasas son una familia de proteasas cisteína-dependientes, aspartato-específicas. Utilizan un residuo de cisteína como nucleófilo catalítico cortando sus proteínas blanco después de un residuo de aspártico específico (de ahí su nombre "caspasa" de la contracción cistein-aspasa). La especificidad del sitio blanco para el corte está determinada por un motivo de reconocimiento de 4 aminoácidos, así como por otras características de la estructura tridimensional de la proteína blanco. Las caspasas son sintetizadas como pro-enzimas, constituidas por tres dominios: un pro-dominio N-terminal y los dominios p20 y p10, los cuales están presentes en la enzima madura. La activación de las caspasas se da por el corte proteolítico de la pro-enzima entre el dominio p20 y p10, así como entre el pro-dominio y el dominio p20; todos estos cortes ocurren después de un residuo de aspártico (Fig 1). Las enzimas maduras son heterotetrámeros con dos heterodímeros p20/p10 y dos sitios activos. [5, 13, 14]. Las pro-caspasas se dividen frecuentemente en dos clases: las caspasas iniciadoras y las caspasas ejecutoras [2, 5].

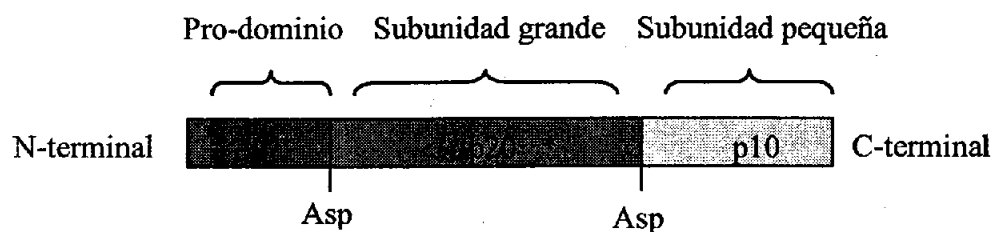


Fig 2. Estructura general de las pro-caspasa.

El grupo de las caspasas iniciadoras se caracteriza por la presencia de un pro-dominio largo el cual contiene una secuencia de amino ácidos que sirve de plataforma para la interacción entre proteínas. En este grupo se encuentran las caspasas-1, -2, -4, -5, -9, -11 y -12 con un dominio NH₃ terminal de reclutamiento (CARD por sus siglas en inglés *caspase-activating recruitment domain*); así como las caspasas-8 y -10 con un dominio NH₃ efector de muerte (DED por sus siglas en inglés *death effector domain*). El segundo grupo llamado caspasas ejecutoras tienen un pro-dominio NH₃ más corto y comprenden a las caspasas-3, -6 y -7. En estos grupos se encuentran incluidas caspasas que actúan en otros procesos distintos a los de la muerte celular (caspasas-1, -4, -5, -11 y -12) [13].

Distintas señales convierten estos precursores en proteasas maduras. Algunas caspasas (iniciadoras) se autoprocetan por un mecanismo de oligomerización inducido por distintos estímulos, mientras que otras caspasas (efectoras) se activan por la acción proteolítica de

caspasas iniciadoras o por la granzima B, formando cascadas proteolíticas de activación [15].

Los sustratos de las caspasas pueden dividirse en dos grupos, por un lado proteínas que están involucradas en la regulación o la ejecución de la muerte, y por el otro un grupo pequeño de precursores de citocinas pro-inflamatorias. Las caspasas dan lugar a la morfología de la célula apoptótica por cortar proteínas intracelulares específicas, incluyendo proteínas del núcleo, lámina nuclear y citoesqueleto [4]. El corte del inhibidor de la DNasa activada por caspasas (ICAD, por sus siglas en inglés) conduce a los cambios en la cromatina; el corte de la laminina resulta en el encogimiento nuclear; el corte de proteínas del citoesqueleto como la fodrina y la gesolina da lugar al encogimiento citoplásmico; y el procesamiento de la cinasa 2 activada por p21 (PAK-2 por sus siglas en inglés) conduce al plegamiento de la membrana. Cabe aclarar que el desensamble de las células no solo se da por la degradación directa de proteínas por las caspasas, sino porque éstas pueden activar o inhibir la actividad de enzimas importantes en la dinámica del citoesqueleto (ver [6, 16]).

- **La familia Bcl-2**

La familia de las proteínas Bcl-2 (por sus siglas en inglés “*B-cell lymphoma 2*”) juega un papel crítico en la apoptosis, ya que estas proteínas sirven como reguladores positivos o negativos en la muerte.

Los mamíferos poseen una familia de proteínas Bcl-2 que incluye miembros pro- y anti-apoptóticos, cuya proporción define el umbral de susceptibilidad a la apoptosis por la vía intrínseca. Esta vía utiliza a la mitocondria para amplificar las señales de muerte [2].

Los miembros de la familia Bcl-2 muestran uno o más dominios de homología a Bcl-2 (BH; por sus siglas en inglés: “*Bcl-2 homology*”) y se dividen en dos grupos de acuerdo a si son promotores o inhibidores de la apoptosis [17]. Los miembros anti-apoptóticos que incluyen a BCL-2, BCL-X_L, MCL-1, BCL-W y A1, generalmente contienen cuatro dominios similares, llamados BH1-4 y están asociados con la membrana externa mitocondrial. Por su parte, los miembros pro-apoptóticos se dividen en dos grupos: los miembros “monodominio” que solo contienen al dominio BH3 (proteínas “BH-3 only”) y comprenden a Bid, Bad, Bim, Noxa y Puma; y los miembros “multidominio” los cuales poseen del dominio BH1 al BH3, tales como Bax, Bak y Bok. Los primeros actúan como “centinelas” en distintos organelos celulares. En condiciones normales, los miembros pro-apoptóticos monodominio están inactivos y al activarse llevan a la activación de los miembros multidominio. Estas proteínas se

asocian con la membrana mitocondrial externa durante la apoptosis, comprometiendo la integridad de la membrana [13].

ii) Vías apoptóticas de muerte

- La vía intrínseca de muerte mediada por la mitocondria.

Esta vía se activa en respuesta a radiación ionizante, drogas quimioterapéuticas, daño mitocondrial y señales durante el desarrollo embrionario. Para la inducción de la muerte celular desde la mitocondria se requiere de la formación del apoptosoma, el cual consta de Apaf-1 (por sus siglas en inglés "*apoptotic protease activating factors*"), citocromo c y la caspasa 9. La caspasa 9 es una caspasa iniciadora capaz de auto procesarse cuando se enlaza a Apaf-1. El modelo de activación de la caspasa 9 es como sigue: cuando el citocromo c se enlaza a Apaf-1, éste puede reclutar a la caspasa-9 en la presencia de ATP/dATP. Entonces la caspasa-9 activa a la caspasa-3 y ésta finalmente procesa diferentes proteínas las cuales llevan al desensamble de la célula (Fig 3) [13, 18].

- La vía extrínseca de muerte mediada por receptores de muerte.

Esta vía de muerte se inicia por la estimulación de ciertos miembros de la familia de los receptores de muerte TNF (por sus siglas en inglés "*tumor necrosis factor*"). Los receptores contienen una secuencia citoplásmica homóloga llamada el "dominio de muerte" (DD, por sus siglas en inglés "*death domain*"). Estos dominios de muerte le

permiten al receptor reclutar a la maquinaria de muerte utilizando proteínas adaptadoras (FADD, TRADD), que contienen también el DD, además del dominio efector de muerte (DED), el cual les sirve para reclutar a la pro-caspasa 8. La procaspasa-8 se oligomeriza en este complejo y se auto-activa. Este complejo de señalización se ha denominado DISC (por sus siglas en inglés "*death-inducing signaling complex*"). Posteriormente la caspasa-8 activa a caspasas ejecutoras como la caspasa-3. Existe una vía alterna en la que la caspasa-8 procesa a Bid -la cual pertenece a la familia Bcl-2 monodominio BH3- lo que induce su traslocación a la mitocondria, promoviendo la activación de la vía de muerte mitocondrial (Fig 3) [13, 18].

c) Muerte apoptótica independiente de caspasas.

Un número creciente de reportes describe que la inhibición de las caspasas no es suficiente para inhibir la apoptosis ya que la célula utiliza vías alternas a las caspasas para desensamblarse.

La mitocondria juega un papel central en la apoptosis ya que muchas señales pro-apoptóticas convergen en ella para inducir la permeabilización de la membrana mitocondrial (MMP por sus siglas en inglés "*mitochondrial membrana permeabilization*"). Esta permeabilización da lugar a la activación de las caspasas y de otros efectores de muerte. Entre las proteínas intermembranales que se liberan están el citocromo c y Smac/Diablo, entre otros activadores de caspasas (Fig 3). Existen otros

factores que son liberados y que actúan como las moléculas efectoras de la muerte independiente de caspasas, entre las que se incluyen AIF, la endonucleasa G (EndoG) y HtrA2 la cual posee actividad de serín-proteasa. Además se ha encontrado que en ciertas condiciones estas pueden también ser liberadas por la influencia de las caspasas [19].

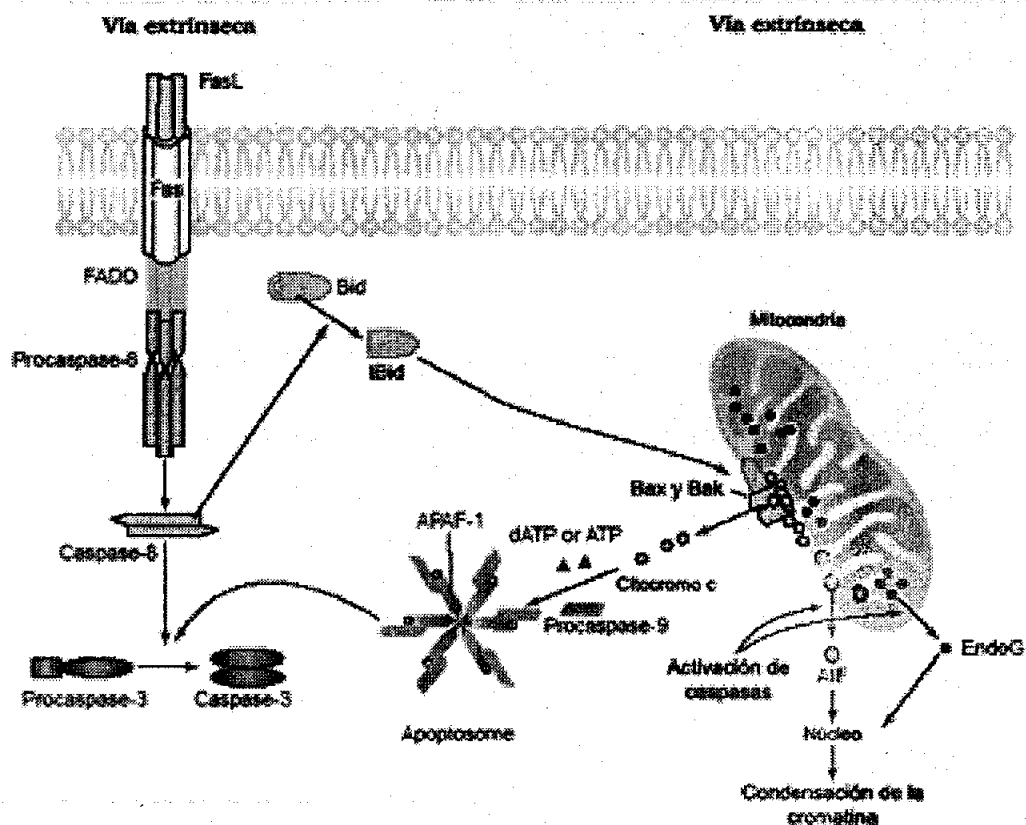


Fig 3. Vía extrínseca e intrínseca de la apoptosis. (Tomada de [19])

i): Muerte celular apoptótica dependiente de AIF

El factor inductor de la apoptosis en los mamíferos (AIF por sus siglas en inglés "*apoptosis-inducing factor*") posee una señal de localización mitocondrial y se enlaza establemente a FAD por lo que es

considerada como una flavoproteína; además presenta actividad de NADPH oxidasa y de monodehidroascorbato reductasa. Sin embargo, se ha establecido que su actividad como oxidoreductasa es dispensable para la actividad pro-apoptótica de AIF [19, 20]. Después de un estímulo pro-apoptótico, AIF es translocado al citoplasma y al núcleo donde induce la condensación de la cromatina y la fragmentación del DNA en segmentos de alto peso molecular (50kpb) [21], aunque no se conocen los mecanismos a través de los cuales induce estos cambios.

La translocación de AIF es principalmente independiente de caspasas. En la apoptosis inducida por la estaurosporina [22] o por la infección por HIV [23], modelos en los que las caspasas se encuentran inhibidas, AIF es el promotor de la apoptosis [21]. La microinyección de AIF en células deficientes en moléculas involucradas en la apoptosis clásica como *Apaf-1*, *Caspasa-9* o *Caspasa-3*, induce la muerte celular independiente de caspasas y con características de apoptosis tales como la exposición de fosfatidilserina en la membrana plasmática, la condensación parcial de la cromatina y el encogimiento celular [22, 24]. Sin embargo, la vía de AIF y las caspasas también pueden converger cuando las caspasas se encuentran activas, de tal manera que las caspasas y AIF pueden cooperar en la cascada de muerte celular y su contribución puede depender tanto del estímulo apoptótico, así como del tipo celular [19, 20].

ii): Muerte apoptótica dependiente de la endonucleasa G (Endo-G).

Endo-G es una endonucleasa mitocondrial con actividad de DNasa no-específica que ha sido conservada a través de la evolución. Esta proteína reside en el espacio intermembranal de la mitocondria. Durante la muerte apoptótica inducida por la presencia de estímulos como Bax, calcio o drogas quimioterapéuticas, Endo-G es liberada de la mitocondria y es traslocada al núcleo. Esta nucleasa es capaz de degradar al DNA en fragmentos oligonucleosomales en ausencia de caspasas y de la nucleasa CAD, la cual es responsable de la degradación del DNA en la vía de las caspasas [25, 26].

Por lo tanto, a diferencia de la CAD, AIF y Endo-G llevan a la degradación del DNA de manera independiente de caspasas. Es interesante mencionar que en el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, Cps-6, el ortólogo de Endo-G lleva a la fragmentación del DNA en ausencia de caspasas en la muerte celular que ocurre durante su desarrollo [27], además de que puede actuar en conjunto con WAH-1, el ortólogo de AIF en este organismo [28]. De esta forma, AIF y Endo-G resultan importantes en la ejecución de la MCP en situaciones en que la actividad de las caspasas está comprometida o limitada [25, 26].

1. 1. 2. 2. Autofagia o muerte tipo II.

a) Morfología

La autofagia, que en griego significa “comerse a si mismo”, se caracteriza principalmente por la presencia de vesículas citoplásmicas de doble o múltiple membrana, denominadas vacuolas autofágicas, las cuales engullen la mayor parte del citoplasma o/y organelos. Durante este proceso, la mitocondria y el retículo endoplásmico se dilatan y el aparato de Golgi se agranda, probablemente por su papel en la formación de los lisosomas primarios, los cuales descargan su contenido hidrolítico en las vacuolas autofágicas. La membrana plasmática no se pliega pero hay presencia de endocitosis, proceso que sirve para reducir el área de la membrana plasmática. Las vesículas autofágicas y su contenido son destruidas por el sistema lisosomal de la misma célula. Los remanentes de la célula autofágica son removidos por heterofagia, pero ésta ocurre tardíamente y no tiene un papel tan relevante como en la apoptosis (Fig 4) [11, 29].

La autofagia es un proceso de varios pasos. Primero, el autofagosoma, -una estructura vesicular que posee una doble membrana muy probablemente originado del retículo endoplásmico- se forma en el citoplasma y engulle proteínas, lípidos y organelos dañados. Posteriormente, el autofagosoma se fusiona con lisosomas primarios, los cuales están constituidos por enzimas hidrolíticas en un compartimiento de una sola membrana. Posterior a la fusión, la membrana externa del

autofagosoma se vuelve parte de la membrana lisosomal. El complejo se acidifica y madura en un autolisosoma. Tanto los autofagosomas como los autolisosomas se denominan vacuolas autofágicas. Finalmente, las hidrolasas lisosomales degradan el contenido citoplásmico del autofagosoma así como su membrana interna (Fig 4) [29, 30].

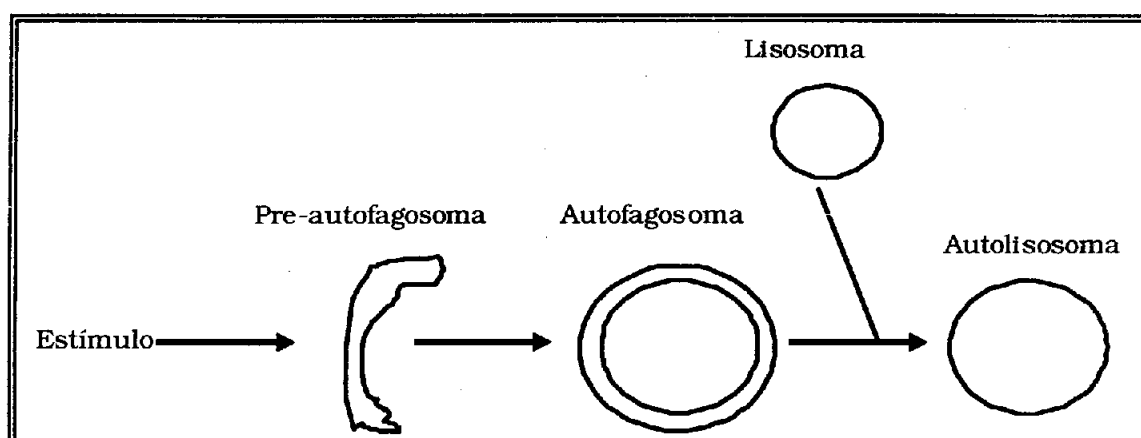


Fig 4. Formación del autolisosoma en la autofagia. (Tomada de [31])

b) Maquinaria de muerte

La formación del autofagosoma se inicia con la formación del complejo mAtg5/mAtg12-mAtg16 (nombres que provienen de la contracción de autofagia), el cual se encuentra en la membrana externa del autofagosoma en formación, disociándose una vez formado el autofagosoma. El siguiente paso es la conjugación de la MAP1-LC3 (por sus siglas en inglés "*microtubule-associated protein 1 light chain 3 or LC3*") al fosfolípido fosfatidiletanolamina, lo que le confiere la propiedad de unirse a las membranas y cuyo papel es la formación de las vesículas autofágicas [31].

Existen diferentes reguladores de la autofagia dentro de los que destaca el regulador positivo fosfatidil-inositol 3-cinasa de clase III o PI3K (por sus siglas en inglés "*phosphatidylinositol 3-kinase*"), cuya ausencia o inhibición llevan al bloqueo de la autofagia [31, 32]. La PI3K y el producto de su reacción, el fosfatidil-inositol-3-fosfato (PtdIns3P), pueden conducir al reclutamiento de diferentes proteínas necesarias para la biogénesis del autofagosoma o bien servir de andamio para abastecer a la vía autofágica con componentes de membrana. La mTOR cinasa (por sus siglas en inglés "*mammalian target of rapamycin*") es un regulador negativo importante en la vía autofágica y es considerada como un "centinela" inicial de la vía, ya que es un detector de la presencia de distintas señales, como aminoácidos y ATP, dos metabolitos que regulan la autofagia. La inhibición de la mTOR cinasa por la rapamicina, induce la autofagia de distintos tipos celulares [29, 31], ya que su inhibición es necesaria para la expansión de la membrana pre-autofagosomal, un paso previo a la formación de las vacuolas autofágicas. Existen además otros reguladores tanto positivos como negativos de la vía autofágica, entre los que se encuentran otras cinasas, GTPasas y el calcio (ver Fig 5) [33].

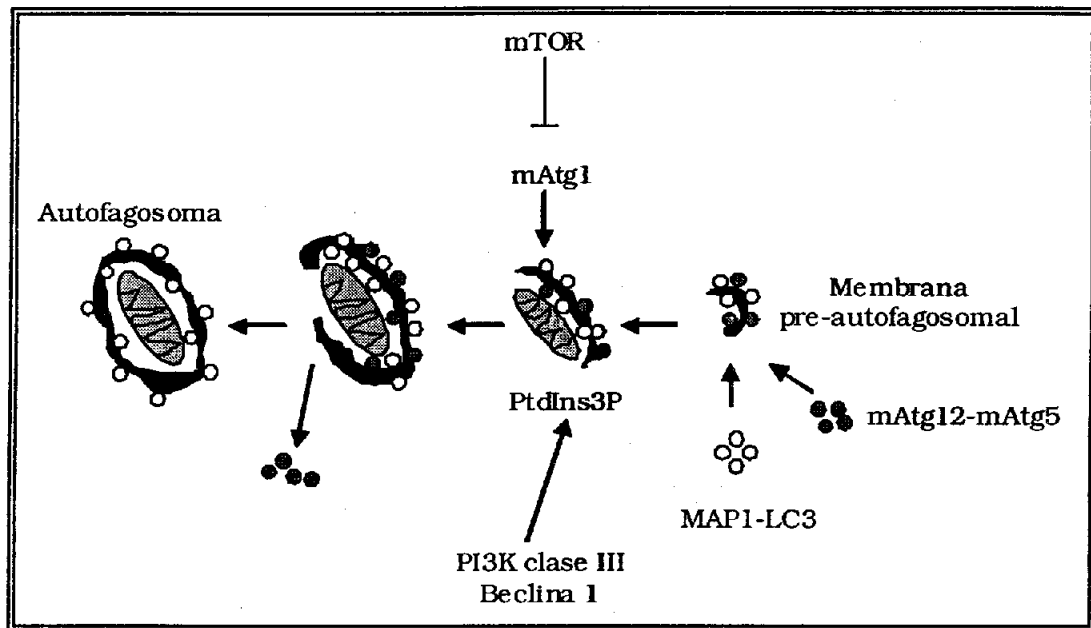


Fig 5. Representación de algunas moléculas involucradas en la formación del autofosoma (tomada de [31])

1.1.2.2. Degradación vesiculada no lisosomal o muerte tipo III.

a): Morfología

Este tipo de muerte puede dividirse en dos categorías.

El tipo IIIA o de degradación vesiculada no-lisosomal, se caracteriza por que no hay actividad lisosomal. Los organelos celulares se hinchan, se forman espacios vacíos en el citoplasma los cuales eventualmente se fusionan unos con otros y posteriormente se conectan con la cavidad extracelular. La célula es destruida debido a la desintegración de sus componentes en piezas cada vez más pequeñas hasta que dejan de observarse en el microscopio electrónico. La membrana celular se fragmenta y el núcleo se desintegra en etapas posteriores, respecto a otros organelos. Al parecer, ni los lisosomas

propios ni los de las células vecinas, participan en el proceso de desensamblaje. De este tipo de muerte celular no se conocen las moléculas que participan en la activación, ejecución o degradación [11].

En la muerte tipo IIIB o de degeneración citoplásmica (necrosis programada), los organelos se dilatan y el citoplasma presenta vacuolas, mientras que el núcleo no se desintegra sino sufre kariolisis (se hincha debido a la acumulación de líquidos). La membrana celular, por su parte, se retrae y se redondea. Las cisternas del RER se dilatan y algunas veces las mitocondrias se hinchan. Finalmente, los organelos dilatados se rompen en numerosas vesículas y la célula se redondea. Este tipo de muerte celular difiere del tipo 1 en que no hay condensación del núcleo ni fragmentación detectable de la célula en elementos rodeados de membrana que son fagocitados. Es similar al tipo 2 y tipo 3A en que hay dilatación del RER y/o la mitocondria, pero le faltan las vacuolas autofágicas características del tipo 2 y la fragmentación abundante del tipo 3A. Finalmente, las células que presentan el tipo 3B son fagocitadas, a diferencia de las del tipo 3A. Este tipo de muerte celular comparte muchas similitudes a la necrosis patológica, un tipo de muerte que se presenta en condiciones patológicas y cuyas características son el hinchamiento de organelos intracelulares, previo al hinchamiento y a la pérdida de la integridad de la membrana nuclear y citoplásmica [6, 10, 11]. Este tipo de muerte resulta del deterioro en el transporte de la membrana, en la que finalmente hay liberación del contenido celular en

el espacio extracelular, lo que lleva a un proceso inflamatorio [7]. Sin embargo en la muerte celular tipo 3B, o necrosis programada, no hay inflamación y los cambios celulares están regulados genéticamente.

b) Maquinaria de muerte

En la actualidad poco se sabe de los mecanismos bioquímicos implicados en la ejecución de la necrosis programada. Se ha identificado que este tipo de muerte puede ser inhibida por la presencia de antioxidantes o al eliminar la actividad de la cinasa RIP [34, 35]. Las proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 y Bcl-X_L retardan la necrosis programada inducida por estímulos como la rotenona o la antinomicina A y por la depleción de glutatión [36, 37].

1.2. Muerte celular durante el desarrollo embrionario y su función.

De acuerdo a Jacobson [4], la función de la MCP durante el desarrollo puede clasificarse en 4 tipos:

a) Modelado de estructuras.

La MCP participa en el modelado de estructuras como en la formación de huecos y tubos (cavidad preamniótica y tubo neural, respectivamente), en la fusión de hojas epiteliales (paladar) y en la formación de los dígitos (Fig 6A) [1].

b) Remoción de estructuras

Dentro de esta categoría se incluyen aquellas estructuras vestigiales que fueron utilizadas por especies ancestrales pero no en las descendientes; estructuras que fueron requeridas en ciertas etapas del desarrollo o bien estructuras que se requieren en un sexo pero no en el otro. Dentro de esta última categoría se encuentran los conductos Mülllerianos que forman el útero y el oviducto en las hembras pero que no son requeridas en los machos, por lo que son removidas por MCP (Fig 6B) [4].

c) Control del número celular.

En muchos órganos se producen células en exceso cuyo número se ajusta posteriormente a través de MCP. Un ejemplo de esta categoría es la muerte celular de neuronas y oligodendrocitos, que ocurre dentro del desarrollo del sistema nervioso central de los vertebrados, cuyo objetivo es el aparear el número de neuronas con el número de células blanco (Fig 6C) [4].

d) Eliminación de células anormales.

La MCP también funciona como un supervisor de control de calidad, eliminando células indeseables para el organismo como las células cancerosas (Fig 6D) [4].

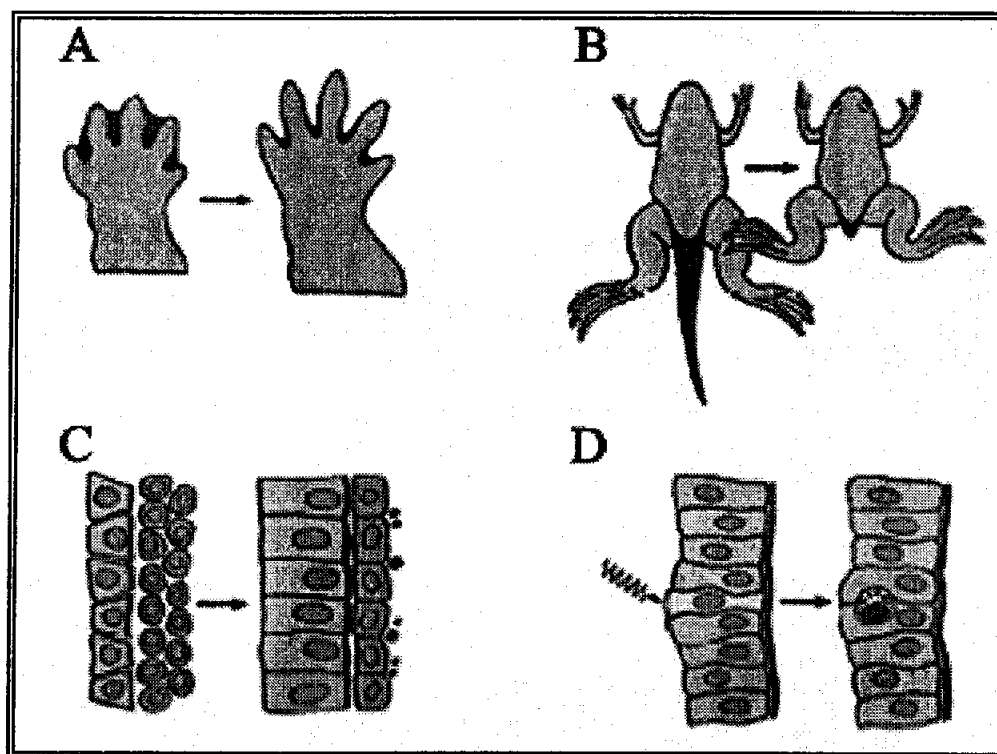


Fig 6. Ejemplos de las diversas funciones atribuidas a la MCP durante el desarrollo. A) Modelado de estructuras, B) Remoción de estructuras, C) Apareamiento del número celular y D) Eliminación de células dañadas (Tomada de Jacobson 1997).

En la actualidad es claro que la MCP en los animales en desarrollo no es un fenómeno degenerativo sino que es activo y genéticamente controlado. Por lo tanto, durante el desarrollo la MCP es tan fundamental como la proliferación y la diferenciación. Así, mutantes en la maquinaria de muerte han mostrado que su ausencia puede ser letal para el organismo desde etapas muy tempranas del desarrollo. Los ratones deficientes en la caspasa-3 y -9, mueren en el período perinatal con sobre-crecimiento del sistema nervioso [38, 39], mientras que el ratón deficiente en Apaf-1 presenta anomalías cráneo-faciales, sobre-

crecimiento cerebral e interdígitos en las extremidades posteriores [40, 41].

1. 3. Muerte celular programada en el sistema nervioso.

El control estricto de la muerte neuronal es un prerrequisito para el desarrollo normal del sistema nervioso central. Durante la neurogénesis se producen más células de las que se requieren para la formación de las estructuras nerviosas de un organismo adulto [42], siendo eliminadas un número significativo de neuronas (entre un 20 a un 80% dependiendo de la región) [43, 44]. Por otro lado, la muerte neuronal descontrolada lleva a la pérdida patológica de poblaciones neuronales específicas en diversas enfermedades neurodegenerativas tales como en la enfermedad de Alzheimer, de Parkinson o de Huntington [45].

1.3.1. MCP en el sistema nervioso durante el desarrollo embrionario.

En el desarrollo del sistema nervioso existen dos etapas de MCP:

- a) La muerte celular "proliferativa" que ocurre en estadios tempranos del desarrollo e involucra células que están dividiéndose activamente. Esta se presenta durante el cerrado del tubo neural, en el desarrollo de la región mesencefálica y en el proceso de selección negativa de ciertas células progenitoras en las regiones ventriculares [46, 47]. Este tipo temprano de

muerte celular se caracterizó recientemente, de tal manera que aún se desconocen los mecanismos de regulación.

- b) La muerte celular "relacionada al blanco", la cual ocurre en células postmitóticas durante estadios más avanzados del desarrollo del SN. Este tipo de muerte ocurre en todos los grupos taxonómicos e involucra distintos tipos de neuronas (motoras, sensoriales, interneuronas, autonómicas, etc) tanto en el sistema nervioso central (cerebro y médula espinal) como en el periférico. En algunos casos, la sobrevivencia de estas neuronas se encuentra determinada por la disponibilidad de uno o más factores neurotróficos [44]. Dentro de las poblaciones que se ven afectadas por este fenómeno se encuentran las motoneuronas y los ganglios de la médula espinal, el núcleo troclear, el núcleo del istmo óptico, el cerebelo y la sustancia nigra, entre otras [48, 49]. Al parecer este tipo de muerte celular tiene la función de ajustar el número de neuronas a los blancos correspondientes. El mejor ejemplo de este tipo de muerte es la muerte de las motoneuronas de la médula espinal.

La MCP de las motoneuronas durante el desarrollo de la médula espinal en el pollo es uno de los sistemas mejor caracterizados [44, 50]. En muchos reportes se ha documentado que las motoneuronas sufren muerte celular en distintos niveles rostrocaudales, en tiempos y con

frecuencias particulares a la región (ver [51]). Recientemente se caracterizó de manera sistemática y comparativa los patrones de MCP en la médula espinal embrionaria entre el pollo, el ratón y la rata. De manera general, en todas las especies la MCP lleva un patrón antero-posterior siendo la médula espinal cervical la primera que presenta MCP, mientras que la médula sacra es la última. Este patrón de muerte se da principalmente en la población de las motoneuronas [51].

La muerte de las motoneuronas se encuentra regulada por la disponibilidad de células musculares con las que pueden establecer conexiones (blanco). Inicialmente hay una sobreproducción de motoneuronas que es ajustada al número de blancos a través de MCP [50, 52]. Además del blanco, las motoneuronas para sobrevivir requieren el contacto con neuronas aferentes o con células gliales [44]. La médula espinal es la estructura del SN donde el patrón de muerte celular es más claro, especialmente en la región de las motoneuronas. Es por esto que la médula representa un buen modelo *in vivo* para estudiar la MCP y los mecanismos que la desencadenan.

2. Arquitectura de la medula espinal.

La médula espinal es parte del sistema nervioso central y se origina de la parte posterior del tubo neural. En el eje antero-posterior, la médula espinal se divide en cinco regiones: cervical, braquial, torácica, lumbar y sacra. Cada región se divide en segmentos por los que sale un

par de nervios espinales, los que reciben la información que percibe el organismo. Cada una de estas regiones se caracteriza por inervar diferentes regiones del cuerpo: la médula espinal cervical controla la región de la cara y del cuello, mientras que la región braquial inerva y controla a la región de las extremidades anteriores. La región torácica inerva al tronco y al abdomen; la región lumbar controla las extremidades posteriores y finalmente la región sacra controla a los órganos sexuales, el sistema digestivo y el sistema urinario. A lo largo del eje rostro-caudal existen algunas diferencias en los tipos neuronales, de manera particular en las distintas subclases de neuronas motoras que forman los diferentes niveles de la médula espinal [53]. Por ejemplo, sólo las regiones braquial y lumbar contienen neuronas motoras dedicadas a la innervación de las extremidades, pero no así las otras regiones.

En el eje ventro-dorsal, la médula puede ser dividida en el asta ventral (alar) y el asta dorsal (basal), en donde cohabitan diferentes poblaciones neuronales. La porción dorsal contiene a las neuronas que procesan y relevan la información sensorial hacia centros superiores; ésta información la reciben desde los cuerpos de las neuronas sensoriales, cuyos somas residen en los ganglios de la raíz dorsal (DRG, por sus siglas en inglés "*dorsal root ganglion*"). Por su parte la región ventral contiene a las neuronas que dirigen y modulan el control motor; algunas neuronas de esta región proyectan sus axones a través de las raíces ventrales hacia los músculos para controlar el movimiento. Por lo

tanto, la organización anatómica de la médula espinal madura deriva de un patrón dorso-ventral de tipos celulares que es especificado en estadios tempranos del desarrollo del tubo neural [54, 55].

En la actualidad se utiliza la expresión de ciertos factores de transcripción de la familia de homeodominio como marcadores de regiones y/o poblaciones neuronales específicos de la médula espinal. Estos factores de transcripción son reguladores de la expresión de genes que dictan la identidad y la función específica de los diversas poblaciones celulares (neuronales y gliales).

Como se ha mencionado, la médula en su región ventral controla la respuesta motora del organismo. En esta región se encuentran las interneuronas ventrales (V0, V1, V2 y V3) y las motoneuronas. De acuerdo a los perfiles de expresión de distintos miembros de la familia de factores de transcripción de homeodominio, las interneuronas V0 son marcadas por *Evx1/2*, las V1 por *Engrailed-1*, las V2 por *Lhx3/4* y *Chx10*, y finalmente las V3 por *Sim1* (ver Fig 7) [53, 56]; en tanto que las neuronas motoras expresan *HB9* y *Islet-1/2* [56].

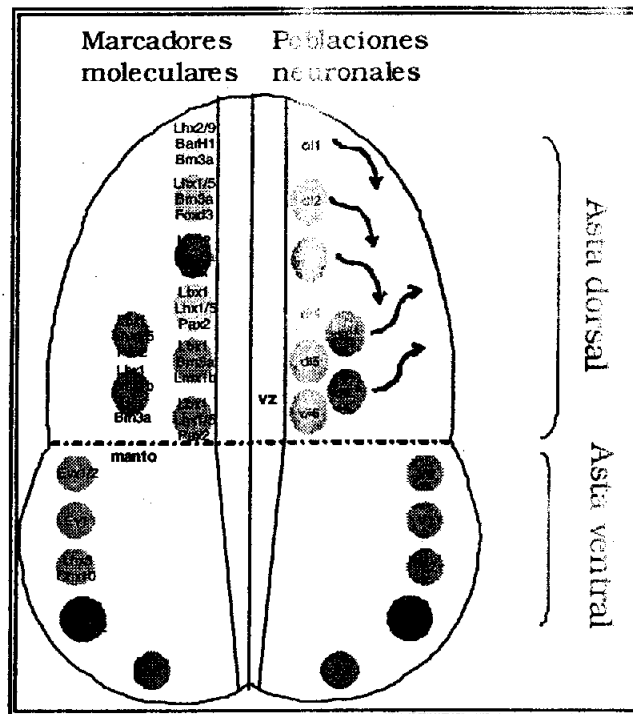


Fig 7. Representación de las poblaciones neuronales en la médula espinal. En el lado derecho de la figura se encuentran representadas las poblaciones neuronales (círculos). Del lado izquierdo, se encuentran los marcadores moleculares con el mismo código de colores. En la médula espinal se encuentran las interneuronas V0, V1, V2 y V3, así como las motoneuronas (MN). En la región dorsal están representadas todas las poblaciones interneuronales.

La médula espinal dorsal tiene un rol crítico en la organización de las respuestas a las entradas sensoriales del ambiente interno y externo del organismo, ya que ésta contiene a las neuronas que integran y relevan la información sensorial que llega desde las neuronas sensoriales de la periferia hacia los centros superiores del sistema nervioso [57]. En esta región dorsal existen al menos ocho diferentes subtipos de interneuronas, definidas tanto por la expresión de factores de transcripción de homeodominio, como por el patrón de migración y su día de nacimiento [58, 59]. A diferencia de la región ventral de la médula,

donde cada población neuronal puede ser distinguida por un marcador molecular, en la región ventral hay una sobreposición de los marcadores, de tal manera que una combinación de marcadores (factores transcripcionales de la familia homeodominio) distingue a las diferentes clases de interneuronas: dl1, dl2, dl3, dl4, dl5, dl6, dILA y dIL^B (ver Fig 7). En particular las interneuronas dl3 expresan Islet 1/2, el mismo marcador molecular que las motoneuronas en la región ventral [59].

3. Equilibrio redox.

El oxígeno es esencial para la vida de los organismos, con la excepción de los organismos unicelulares anaerobios. El oxígeno molecular es el aceptor final de electrones en la cadena transportadora de electrones mitocondrial y en otras vías metabólicas. El producto secundario del transporte de electrones son las especies reactivas de oxígeno (ERO).

3. 1. Especies reactivas de oxígeno (ERO)

Las ERO, son un término colectivo que incluye a átomos de oxígeno parcialmente reducidos que pueden o no ser radicales libres. Un radical libre es cualquier especie atómica o molecular con existencia independiente que contenga uno o más electrones desapareados en su orbital externo [60, 61]. Las ERO agrupan a los radicales oxígeno como el anión superóxido, el oxígeno en singulete y el radical hidroxilo, además

de los derivados del oxígeno que no son radicales como el peróxido de hidrógeno. Miembros adicionales de esta familia son derivados de la interacción del anión superóxido con radicales basados en nitrógeno o carbono, entre los que se encuentra el óxido nítrico, el peroxinitrito (ver tabla 1) y peróxidos orgánicos.

En las células de los organismos aeróbicos, las ERO se forman principalmente en la mitocondria. Alrededor de un 5% del oxígeno no es completamente reducido a agua por la citocromo oxidasa, de tal forma que la reducción parcial del oxígeno con la adición de menos de 4 electrones es la fuente principal de ERO.

Tabla 1. Especies reactivas de oxígeno

RADICALES	NO-RADICALES
Superoxido, $O_2^{\bullet -}$	Peróxido de hidrógeno, H_2O_2
Hidroxilo, OH^{\bullet}	Ácido hipocloroso, $HOCl$
Peroxilo, RO_2^{\bullet}	Ozono, O_3
Alkoxilo, RO^{\bullet}	Oxígeno singulete, $^1\Delta g$
Hidroperoxilo, HO_2^{\bullet}	Peroxinitrito, $ONOO^-$

3. 1. 1. Anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

El anión superóxido se forma por la adición de un electrón al oxígeno molecular. Esto ocurre al captar un electrón de la cadena respiratoria, lo cual se da a nivel de la semiubiquinona y también del complejo I (NADH coenzima Q reductasa). Además de la mitocondria, las cadenas transportadoras en el retículo endoplásmico y de la membrana nuclear también pueden generar $O_2^{\cdot-}$. A nivel enzimático, el superóxido es el producto primario de las reacciones catalizadas por la NADPH oxidasa, la xantina oxidasa y la indoleamina dioxigenasa, y algunas peroxidases inespecíficas. Otra fuente de la formación del $O_2^{\cdot-}$ es la oxidación no enzimática de las catecolaminas (dopamina y epinefrina) en la presencia de iones hierro, y durante la oxidación de flavinas semireducidas [62]. Su tiempo de vida es de aproximadamente de 10^{-6} s a $37^\circ C$.

3. 1. 2. Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

Este es generado por dos mecanismos generales: por la dismutación química o enzimática del anión superóxido y por la acción de ciertas oxidases vía la reducción del oxígeno por dos electrones. El primer mecanismo es llevado a cabo por las superóxido dismutasas y el segundo por las flavoproteína oxidases, las L-aminoácido oxidases, las aldehído deshidrogenasas, las monoamino oxidases, las ciclo-oxigenasa y lipo-oxigenasas, entre otras. En contraste con el anión superóxido, el

H₂O₂ puede penetrar a través de las membranas y reaccionar con componentes celulares a mayor distancia de su lugar de síntesis. El H₂O₂ es un compuesto muy estable y su reactividad no es muy alta, sin embargo, en la presencia de metales de transición puede dar lugar al radical hidroxilo [63].

3. 1. 3. Radical hidroxilo (OH·)

Este se genera por la reducción del H₂O₂ con un electrón donado por un metal de transición como el fierro y el cobre, entonces se rompe generando al OH· y al ión hidroxilo (HO⁻), este último es inocuo para la célula pues se protona generando agua (reacción de Fenton). El OH· tiene una vida muy corta ($t_{1/2}=10^{-9}$ s, 37°C) y puede oxidar casi todos los compuestos orgánicos cercanos a su lugar de generación [63].

3. 1. 4. Peroxinitrito y óxido nítrico (ONOO⁻ y NO·)

El radical óxido nítrico (NO·) es producido por la óxido nítrico sintasa (NOS, por sus siglas en inglés "*nítric óxido sintase*") a partir del grupo guanidino de la L-arginina. En presencia de 2 O₂⁻ y de 2 NADPH, la enzima transforma la arginina en citrulina y NO·. El óxido nítrico puede reaccionar rápidamente con el O₂⁻ generando peroxinitrito un compuesto más oxidante que el NO· [64]. Ambos compuestos no son propiamente ERO, pero si compuestos oxidantes.

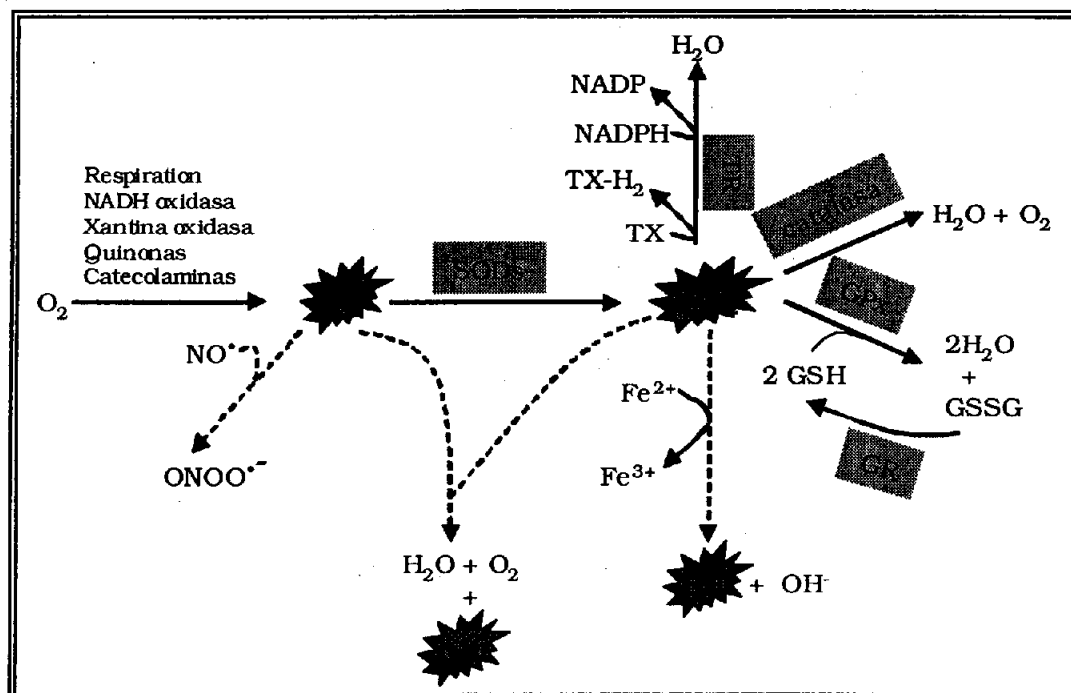


Fig 8. Formación de algunas ERO y eliminación por sistemas antioxidantes.

3. 2. Sistemas antioxidantes

Las concentraciones de ERO pueden regularse tanto por los mecanismos que las generan como por aquellos que las eliminan. La célula ha desarrollado múltiples sistemas tanto protéicos como no-protéicos para eliminar a las especies reactivas de oxígeno, los cuales se conocen como antioxidantes. Estos sistemas se agrupan en tres grupos: enzimas antioxidantes, antioxidantes que rompen reacciones en cadena (mecanismos antioxidantes no-enzimáticos) y proteínas que enlazan metales de transición [65]. Cuando los mecanismos antioxidantes no pueden contender con la presencia elevada de oxidantes se dice que la célula está en **estrés oxidativo**. Dicho estrés se genera cuando la

producción de ERO es mayor que su eliminación o bien por que no hay suficientes antioxidantes en la célula.

3.2.1. Enzimas antioxidantes.

Las enzimas antioxidantes catalizan la ruptura de las ERO. Dentro de esta categoría se incluyen enzimas como las superóxido dismutasas (Sods), la catalasa y las peroxidasas:

Las **superóxido dismutasas** son metaloproteínas que catalizan la dismutación del O_2^- a H_2O_2 . La tasa de dismutación enzimática es $\sim 10^4$ mayor que la dismutación química. En los mamíferos se han identificado tres distintos genes de Sod. La CuZn-Sod o Sod1 y la Ec-Sod o Sod3, contienen cobre (Cu) y zinc (Zn) en su centro catalítico. La **Sod1** es un dímero con un peso de 32 kDa que se localiza en el citoplasma, en el núcleo y en los lisosomas [66]. Los niveles más altos de Sod1 se encuentran en el hígado, la glándula adrenal, el riñón y el vaso. La **Sod3** es un homotetrámero de un peso molecular de 135 kDa con alta afinidad a la heparina y se encuentra principalmente en el espacio extracelular. Su patrón de expresión se restringe a ciertos tipos celulares y tejidos, donde su actividad puede exceder a la de la Sod1 y Sod2. Su expresión es abundante en el corazón, la placenta, el páncreas y el hígado, seguido del riñón, músculo esquelético e hígado [67]. Por último, la MnSod o Sod2 contiene un manganeso (Mn) como cofactor y ha sido localizada en la mitocondria de las células aeróbicas. Esta existe como un tetrámero

con un peso molecular por cada subunidad de 23 kDa [66]. El corazón, el bazo y el testículo son los tejidos con la mayor expresión de esta enzima [68].

La **catalasa** es un tetrámero de 240 kDa, compuesto con subunidades idénticas de 60 kDa. Esta enzima reacciona con el H_2O_2 para formar H_2O y oxígeno molecular. El nivel de actividad de la catalasa varía no solo entre tejidos, sino también dentro de la célula. El hígado, el riñón y los eritrocitos poseen altos niveles de catalasa. En los hepatocitos, los peroxisomas tienen una alta actividad de catalasa aunque también se encuentra en los microsomas y en el citoplasma. La catalasa es la encargada de la degradación del H_2O_2 en altas concentraciones, mientras que las glutatión peroxidasas degradan al H_2O_2 presente en bajas concentraciones [69, 70].

Las **glutatión peroxidasas** (GPx) catalizan la reducción del H_2O_2 , de hidroperóxidos de fosfolípidos y otros hidroxiperóxidos orgánicos, generalmente a expensas de la oxidación del glutatión. En el caso de las peroxidasas que degradan hidroperóxidos de fosfolípidos, estas pueden utilizar tiorredoxina o tioles proteicos como donadores de electrones. Por lo que estas enzimas son importantes para proteger a las membranas celulares. La actividad de las GPx requiere de la disponibilidad del glutatión reducido, lo cual depende de la actividad de la γ -glutamil cisteína sintetasa, la enzima limitante para su síntesis, y de la glutatión reductasa (ver [70, 71]). Los mamíferos cuentan con varias GPx: la

citoplasmática (Gpx1), la gastrointestinal (Gpx2), la plasmática (Gpx3) y la de hidropéroxidos de fosfolípidos (Gpx4). Su expresión es ubicua, sin embargo los niveles de cada gen varían de tejido a tejido [72].

Las **peroxiredoxinas** son una familia de peroxidasa, es decir degradan el H_2O_2 y otros peróxidos. En los eucariontes existen diferentes genes, los cuales se distinguen por sus patrones de expresión durante el desarrollo y su localización en distintos organelos. En general, estas enzimas son activas a bajas concentraciones de peróxidos. La mayoría de las peroxiredoxinas dependen de la tiorredoxina como donador de electrones, aunque algunas pueden tomar electrones de otros tioles o de proteínas específicas similares a la tiorredoxina. Algunas de las peroxiredoxinas protegen contra daño oxidativo y otras participan en vías de señalización al controlar la concentración de H_2O_2 [73].

Las **tiorredoxinas** (Trx) son una familia de proteínas pequeñas (aprox. 12 kDa) que sufren una reducción dependiente de NADPH por la tiorredoxina reductasa y posteriormente reducen los grupos oxidados de cisteína en las proteínas. Debido a su grupo ditiol-redox activo, estas proteínas actúan como donadores de protones y determinan los estados de oxidación de los tioles de las proteínas [69, 70]. Las Trx contienen dos residuos de cisteína que sufren reacciones de oxidación-reducción de manera reversible. Junto con el glutatión, las Trx constituyen el sistema principal de reducción de tioles. La reducción de la Trx oxidada es llevada a cabo por la tiorredoxina reductasa, una enzima dependiente de

NADPH. La Trx por si misma tiene actividad atrapadora de radicales y puede reducir además a las peroxirredoxinas [74].

3.2.2. Antioxidantes no-enzimaticos.

Entre estos se encuentran el glutatión, el α -tocoferol (vitamina E) el ácido ascórbico y el β -caroteno. Con excepción del glutatión, los otros miembros del grupo, son considerados como antioxidantes que rompen cadenas, ya que interrumpen la propagación de las reacciones de los radicales [70].

El **glutatión** (GSH; L- γ -glutamil-cisteína-glicina) es un tripéptido muy importante en la defensa antioxidante que tiene varias funciones: como un sustrato para enzimas antioxidantes, como un atrapador independiente del oxígeno en singulete y del radical hidroxilo, como reactivador de enzimas inhibidas bajo condiciones oxidantes y como regenerador del tocoferol en su estado oxidado hacia su estado reducido. El glutatión se encuentra en altas concentraciones (1-12 mM) en todas las células de los mamíferos, principalmente en el citoplasma. Adicionalmente, es un factor esencial para la actividad de las glutatión peroxidasas [75].

La **vitamina E** pertenece a una familia de compuestos liposolubles con diferentes propiedades antioxidantes de los cuales el α -tocoferol es el más abundante en los mamíferos. Debido a su naturaleza lipofílica, el α -tocoferol es el principal terminador de cadenas de radicales libres en la

membrana plasmática. El resultado es la formación del radical tocoferoxilo el cual es más estable que los hidroperóxidos. Este radical puede ser regenerado a α -tocoferol, al reaccionar con otros antioxidantes como el ascorbato o el glutatión [69, 70].

La **vitamina C** o ácido ascórbico, en contraste a la vitamina E, es un antioxidante hidrofílico. Como un agente antioxidante, la vitamina C reduce directamente al O_2^- , al $\cdot OH$, a los radicales peroxilo, al oxígeno en singulete, a varios hidroperóxidos de lípido y al peroxinitrito. Además puede restaurar las propiedades antioxidantes del α -tocoferol, del glutatión, el ureato y el β -caroteno desde su especie radical respectiva [69].

Los **carotenoides** son un grupo de antioxidantes liposolubles con una estructura relacionada a la vitamina A. Estos evitan la peroxidación lipídica ya que funcionan como atrapadores de radicales libres. Los **flavonoides** son una gran familia de compuestos polifenólicos de bajo peso molecular, son antioxidantes terminadores de cadenas de oxidación que actúan atrapando radicales libres [70].

3. 3. Daño a macromoléculas por las ERO.

Las ERO en altas concentraciones resultan tóxicas a las células (estrés oxidativo) debido a que muchos componentes de ésta son susceptibles al ataque de las ERO, principalmente del radical hidroxilo. La **oxidación de las proteínas** produce diversas modificaciones en los

aminoácidos: la oxidación de grupos sulfhidrilos altera la actividad enzimática por conducir a cambios conformacionales, al entrecruzamiento, al corte de enlaces peptídicos, así como a la modificación de los carbohidratos en las glicoproteínas, a la pérdida de metales en las metaloproteínas, a antigenicidad alterada y a un incremento en la susceptibilidad proteolítica [76]. La **oxidación del DNA** causa la ruptura de las cadenas y lleva a la modificación oxidativa de sus bases, lo que conduce a la producción de mutaciones, cuyo resultado es una alteración en la expresión genética. En cuanto a la **oxidación de los lípidos**, los ácidos grasos tales como el ácido araquidónico parecen ser particularmente susceptibles al ataque de las ERO. La sustracción de un átomo de hidrógeno por un radical lleva a la formación de radicales de lípidos los cuales reaccionan con el oxígeno formando radicales peroxilo (hidroperóxidos de lípido). Esto puede llevar a que se sustraiga a un átomo de hidrógeno de la cadena lateral de un ácido graso adyacente, dando lugar a una reacción en cadena que convierte a muchos lípidos de membrana en hidroperóxidos de lípido. Como consecuencia, la membrana plasmática disminuye su fluidez y modifica su permeabilidad, alterando la regulación del intercambio iónico, lo que lleva a la activación de fosfolipasas y a la ruptura eventual de la membrana [76, 77].

3. 4. Como segundos mensajeros.

Las ERO en bajas concentraciones modulan distintas vías de señalización que inducen la proliferación, la diferenciación o la muerte de las células [66, 78]. Por ejemplo, la presencia de la citosina cardiotropina-1 (CT-1) estimula la proliferación de los cardiomicitos derivados de células tallo embrionarias a través de la generación ERO [79]. Distintas líneas celulares tumorales, con una tasa alta de proliferación, presentan desequilibrios en sus sistemas antioxidantes así como incrementos en ciertas ERO [80]. La presencia de ERO tales como H_2O_2 y/o $O_2\cdot^-$ estimula la proliferación de células musculares, fibroblastos y células endoteliales [81-83]. Adicionalmente, la presencia de antioxidantes inhibe la proliferación de varios tipos celulares entre los que se incluyen las células musculares embrionarias y algunas células tumorales de colon e hígado [84, 85].

Cambios en la concentración de las ERO, ya sea por la presencia de ERO o de generadores de ERO (radiación ionizante o ciertos compuestos químicos), inducen la diferenciación neuronal a partir de células PC12, la diferenciación monocítica a partir de células HL-60, así como cardiomiogénesis desde células tallo embrionarias [86-89].

4. Muerte celular y ERO

4.1. Evidencias generales.

En la actualidad, existe un número creciente de evidencias que involucran a las ERO como moléculas centrales en las vías de transducción de señales que llevan a la muerte celular. Estas evidencias se agrupan en tres categorías:

a): La presencia de peróxido de hidrógeno, la generación de ERO o la depleción de antioxidantes endógenos puede inducir la MCP.

La exposición a dosis bajas de H_2O_2 induce muerte celular en varios tipos celulares tales como células epiteliales, musculares, linfoides (monocitos, linfocitos, etc.) y neuronales, así como en células gliales [90-96]. Por ejemplo, la exposición de las células PC12 a H_2O_2 lleva a un incremento de las ERO y posteriormente a la activación de las caspasas, la exposición de la fosfatidilserina, al plegamiento de la membrana y a la fragmentación del DNA, lo cual puede evitarse en presencia de inhibidores generales de las caspasas; todos estas características son propias de la muerte tipo I o apoptosis [95]. Es interesante hacer notar que la concentración de H_2O_2 puede determinar el tipo de muerte celular [93, 95, 97]. Actualmente muchos grupos de investigación han centrado sus esfuerzos en dilucidar las cascadas de señalización que son encendidas por la presencia de ERO.

La generación de ERO como consecuencia de la exposición celular a radiación ionizante, radiación ultravioleta o a ciertos compuestos

químicos tales como doxorubicina, etoposido, cisplatina y antimicina A induce la muerte de distintos tipos celulares (ver [94, 98]. Por otro lado, la ausencia de cisteína, un precursor del glutatión, en el medio de cultivo de líneas neuronales y en neuronas corticales lleva a la disminución del glutatión y a la inducción de estrés oxidativo, lo que resulta en la muerte de estas células [99, 100]. Además, la disminución de la expresión de enzimas antioxidantes tales como la Cu/Zn superóxido dismutasa (SOD1), tanto en cultivos de neuronas simpáticas como en cultivos organotípicos de médula espinal, lleva a la degeneración de las neuronas [101, 102].

b): La MCP puede ser inhibida por antioxidantes endógenos o exógenos.

Algunos antioxidantes como la tioredoxina y la N-acetilcisteína son capaces de disminuir las concentraciones de ERO, inhibir la activación de las caspasas así como otros pasos subsecuentes de la muerte celular [103, 104]. En cultivos de neuronas simpáticas, la sobre-expresión de la SOD1 protege a las células de la muerte inducida por la ausencia de NGF (por sus siglas en inglés "*neuronal growth factor*") [104], al evitar la generación de superóxido [105]. Asimismo, las neuronas de animales transgénicos que sobre-expresan algunas enzimas antioxidantes (Sod1, Sod2, Sod3 o Gpx4), son capaces de resistir a distintos estímulos apoptóticos, tales como isquemia [106-109]. De manera interesante, factores de crecimiento tales como NGF y citocinas favorecen la

inducción de mecanismos antioxidantes, incrementando la resistencia de las células a la muerte inducida por estrés oxidativo [110, 111].

En la actualidad se tiene claro que las ERO participan como moléculas señalizadoras de muerte celular más que como parte del desmantelamiento de la célula.

c): La MCP se asocia con incrementos en los niveles de ERO intracelulares.

Se ha mostrado que distintas señales que promueven la muerte celular como la activación de Fas o del receptor a TNF, la ausencia de factores de crecimiento o suero, así como la presencia de estímulos químicos o físicos inducen un incremento en las ERO previo a que las células presenten rasgos morfológicos y marcadores de muerte celular [93, 112, 113]. La muerte celular inducida por estos estímulos puede ser inhibida por antioxidantes como la tioredoxina y la N-acetilcisteína [114, 115]. En particular, la ausencia de factores de crecimiento en el medio de cultivo de distintos tipos neuronales lleva a la acumulación de ERO, previo a la activación de las caspasas o de cambios en el potencial de membrana de la mitocondria [97, 104, 116, 117].

Estudios más recientes han comenzado a elucidar las vías a través de las cuáles los diferentes estímulos llevan al incremento de las ERO y como éstas encienden vías de señalización que finalmente conducen a la activación de la maquinaria de muerte. La forma en que las ERO inducen

y/o regulan la muerte celular incluye la activación o inhibición de distintas cinasas y fosfatasas, así como ciertos factores de transcripción que son importantes para la sobrevivencia de la célula [61, 64]. En particular se ha estudiado en más detalle como las ERO regulan la muerte tipo I o apoptosis.

4.2. Neurodegeneración.

Además de las evidencias arriba mencionadas, las ERO, al igual que el incremento en los niveles de calcio o la depleción energética, llevan a la neurodegeneración asociada a desordenes agudos como la isquemia o el trauma cerebral así como a desordenes progresivos como la enfermedad de Parkinson, de Huntington, de Alzheimer y la esclerosis amiotrófica lateral (ALS por sus siglas en inglés "*amyotrophic lateral sclerosis*"). Se ha reportado que hay presencia de marcadores de peroxidación de lípidos en las neuronas del hipocampo y la corteza de pacientes con Alzheimer, en la sustancia nigra de pacientes con Parkinson y en el fluido cerebro-espinal de pacientes con ALS [118].

El incremento de las ERO contribuye a la neurodegeneración dopaminérgica en la enfermedad de Parkinson. La patogénesis de esta enfermedad se debe en parte al deterioro de la función mitocondrial y particularmente de la actividad del complejo I. Además, un síndrome similar a la enfermedad de Parkinson es inducido por un inhibidor del complejo I mitocondrial, el ión 1-metil-4-fenil-piridinio (MPP+), el cuál

inhibe al induce, al incrementar el nivel de las ERO lo que resulta en la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra (ver [119]).

La ALS es una enfermedad neurológica progresiva que se caracteriza por la degeneración de las neuronas motoras de la médula espinal y de la corteza cerebral. Esta pérdida neuronal conduce a la debilidad muscular y finalmente a la parálisis (ver [120]). De manera relevante un porcentaje de los pacientes con ALS presentan mutaciones en la SOD1 lo que lleva a un incremento de las ERO. Se ha mostrado que las motoneuronas de animales transgénicos con mutaciones en la Sod1 ligadas a la ALS, son más susceptibles a la muerte inducida por Fas la cual está asociada a la formación de peroxinitrito [121].

4.3. Evidencias durante el desarrollo embrionario.

Todo lo anterior, apoya la idea de que las ERO son mediadoras de muerte celular, sin embargo estos estudios se han realizado en sistemas de cultivo o en modelos de neurodegeneración. Poca investigación se ha realizado para demostrar el papel de las ERO en la MCP que se da durante el desarrollo, donde la muerte juega un papel esencial en la morfogénesis y la organogénesis.

Se ha observado que el peróxido de hidrógeno es importante para la degeneración de la cola del renacuajo, ya que al disminuir la actividad de la catalasa, enzima que remueve al peróxido de hidrógeno, la muerte

celular se acelera en la cola [122, 123]. Por otro lado, en el embrión de ratón los niveles elevados de ERO coinciden con regiones de muerte celular como los interdigitos, la vesícula ótica, el paladar y el esternón. Además la presencia de antioxidantes previene la muerte de las células interdigitales [124].

En la actualidad mucho se conoce acerca de las moléculas que participan en las vías de ejecución de la MCP, principalmente de la apoptosis, sin embargo poco se sabe acerca de las señales que pueden iniciar este proceso. Dado que en el sistema nervioso hay MCP abundante, resulta relevante conocer que señales modulan este fenómeno, no solo por la relevancia fisiológica de la muerte celular, sino por que la neurodegeneración en distintas patologías podría estar recapitulando un fenómeno que ocurrió durante el desarrollo.

II. JUSTIFICACION

Dada la abundancia de MCP que se observa durante la morfogénesis del sistema nervioso en regiones y tiempos bien establecidos, es interesante conocer si las ERO son mediadoras de este fenómeno tan importante en el desarrollo de este sistema. En particular, las neuronas motoras no sólo representan un buen modelo de estudio para dilucidar cuales son las moléculas que desencadenan su muerte, dado que el patrón de muerte está bien establecido, sino además porque hay evidencias que vinculan a las ERO en la muerte motoneuronal que se da en la esclerosis amiotrófica lateral. La neurodegeneración de las motoneuronas en esta condición patológica, bien podría ser el reflejo de un proceso que ocurrió durante el desarrollo de la población de motoneuronas.

III. HIPOTESIS

El estrés oxidativo activa parte de la MCP en el desarrollo del sistema nervioso. La predicción es que las células neuronales que mueren en el sistema nervioso, sufren de estrés oxidativo previo a la muerte, mientras que las neuronas que sobreviven evitan este incremento en las ERO.

IV. OBJETIVOS

1. Objetivo general.

Establecer la participación del estrés oxidativo en la inducción de la muerte neuronal durante el desarrollo de la médula espinal.

2. Objetivos particulares.

1. Establecer los patrones de estrés oxidativo y muerte celular durante el desarrollo de la médula espinal.
2. Determinar los patrones de distintas enzimas antioxidantes en el desarrollo de la médula espinal.
3. Estudiar el efecto del antioxidante EUK-134 en la muerte de las motoneuronas de la médula espinal.

V. MATERIALES Y METODOS

1. ANIMALES

En la presente investigación se utilizaron embriones de ratón de la cepa CD-1. La edad embrionaria se determinó de acuerdo al día de cruce en donde se observa el tapón de coito en las hembras, este día es considerado el día 0.5 *post coito* (*dpc*; denominado de aquí en adelante como E0.5). Se utilizaron embriones entre los días E11.5-15.5 *dpc*.

2. DISECCIÓN DE MÉDULAS ESPINALES EMBRIONARIAS.

Las ratonas preñadas fueron sacrificadas por dislocación cervical a los *dpc* requeridos. Los embriones se separaron de las membranas extraembrionarias y se colocaron en PBS (por sus siglas en inglés: phosphate buffered saline). Las médulas embrionarias fueron removidas de los embriones tanto completas o solo la región torácica. En algunos experimentos se requirió de remover las meninges que recubren a la médula espinal.

3. EXPLANTES DE MÉDULA ESPINAL EMBRIONARIA

Materiales y reactivos.

a) PBS (para 1 litro): Ajustar a pH=7.4

NaCl	8 gr
KCl	0.2 gr
KH ₂ PO ₄	0.2 gr
Na ₂ HPO ₄	0.815 gr

b) DMEM 10X

c) DMEM 1X

d) Matriz de Colágena

Para 1000 μ l

- 900 μ l de colágena tipo (Cohesión)
- 100 μ l DMEM 10X
- 10 μ l NaHCO₃

- f) Parafilm
- g) Tissue tek o Crio-M-Bed
- d) Material de disección
- e) Laminillas limpias y recubiertas de 400 mg/ml de poli-D-lisina

Procedimiento

- Obtener médulas embrionarias y colocarlas en PBS a 4°C
- Fijar por 3 hr en PFA 4% a 4°C
- Lavar con PBS 1X por 15 mn cada vez a 4°C
- Pasar a sacarosa al 30% en PBS y dejar el tejido toda la noche, hasta que haya bajado al fondo del tubo, esto indica que ha llegado a la misma densidad de la sacarosa.
- Sobre parafilm poner una gota de resina para congelar (Tissue Tek o CryoMbed) colocar el tejido y orientarlo de tal manera que el tubo quede horizontal. Tomar solo una parte de la médula con el fin de que no se doble en la resina.
- En el etanol con hielo seco se congelan los tejidos, esto con el fin de congelar la muestra lo más rápida y homogéneamente posible.
- Cortar en un criostato procurando mantener la temperatura debajo de -20°C. Sacar rebanadas de 10 μ m y secar por espacio de 45 mn. Si el tejido no se utiliza en el momento, se almacenan las laminillas a -20°C, en el momento de usarse se dejan secar por 30-45 mn a T. A.

4.2. Secciones en parafina de tejidos embrionarios.

Materiales y soluciones

- a) Tejido de interés (Embriones completos de E12.5; cerebros embrionarios de E13.5-E15.5 o médulas espinales de E12.5).
- b) PFA 4%
- c) PBS 1X
- d) Salina 0.15 M

desmoldar el bloque de parafina. Para facilitar cortar el bloque este se enfria a 4°C.

-Obtención de cortes.

- Obtener los cortes en parafina con un grosor de 10 µm. Evitar que el agua pase los 50°C, ya que esto funde la parafina. Mantener entre los 46-50°C para que los cortes se extiendan de manera adecuada. Colectar los cortes en laminillas recubiertas con poli-L-lisina (5 mg/ml). Secar los cortes en una parrilla a 37°C.
- Si no se van a utilizar los cortes, guardar las laminillas en una caja a 4°C.

5. ANÁLISIS DE MUERTE CELULAR PROGRAMADA

5.1. Tinción con anaranjado de acridina

Materiales y soluciones

- a) Embriones o fetos de los estadios de interés
- b) Material de disección
- c) PBS 1X
- d) Hielo
- e) Cajas de 35 mm para hacer las cámaras (se hacen unos pozos, hechos con silicón, lo mas delgados posibles, para evitar que las médulas se enrollen)
- f) Anaranjado de acridina (AA) a 5 mg/ml (el stock esta hecho en agua o PBS)
- g) Dihidrorodamina 123 (DHR-123; Molecular probes) 5 mg/ml (el stock está hecho en DMSO)
- h) Agarosa de bajo punto de fusión al 1% en PBS

Procedimiento

-Disectar las médulas espinales del estadio embrionario adecuado (E11.5 - 15.5). Hacer un corte de las meninges a todo lo largo de la medula por

su región dorsal. Remover las meninges de la medula espinal, ya que estas atrapan mucho colorante.

-Extender las médulas lo más derechas posibles en pozos con la menor cantidad de PBS posible (sobre las cajas de 35 mm), para evitar que las medulas se enrollen. Las médulas se colocan con la parte ventral hacia arriba.

-Preparar las soluciones de AA en una concentración de 5 μ gr/ml (stock 5 mg/ml en PBS) y para la DHR-123 en una concentración de 10 μ gr/ml (stock 5 mg/ml en DMSO) diluidos en PBS. Teñir por 30 min a T. A.

-Lavar con PBS.

-Preparar agarosa de bajo punto de fusión al 1% en PBS, cuando se enfríe un poco, rellenar los pozos en los que están las médulas, tratar de mantener las médulas lo más rectas posibles y colocar la caja sobre hielo para que cuaje.

-Analizar en un microscopio estereoscópico de fluorescencia o en microscopia confocal.

5.2. TUNEL

• Técnica de TUNEL en criosecciones

Materiales y soluciones

a) Cortes hechos en el criostato

b) PFA 4%

c) PBS

d) Tritón-X-100

e) Citrato de sodio 10%

f) Kit de TUNEL (Roche Diagnostics, no. catálogo 1 684 795)

g) Cámara húmeda

h) Glicerol al 80%

i) Parafilm

Procedimiento

- Obtener cortes en el criostato
- Fijar con PFA 4%/PBS por 3 min a temperatura ambiente (T. A.)
- PBS 5 min (Si se ha hecho inmunofluorescencia sobre los cortes, entonces se inicia aquí).
- PBS 5 min
- PBS 5 min
- Incubar con solución de permeabilización (0.1% triton en 0.1% de citrato de Na⁺) por 8 min a T.A. o 2 min en hielo.
- PBS 5 min
- PBS 5 min
- Secar alrededor de la muestra
- Poner 25-50 µl de la reacción de TUNEL y se deja por 60 min a 37°C. Es mejor ponerle parafilm sobre la reacción para evitar que se evapore. Se utiliza una cámara húmeda.
- PBS 5 min.
- PBS 5 min
- PBS 5 min.
- Montar en glicerol al 80% y analizar en fluorescencia:
Excitación 450-500 nm
Detección 515-565 nm

• **Técnica de TUNEL en cortes en parafina.**

Materiales y soluciones

- a) Xilol
- b) Etanoles graduados (absoluto, 90%, 80%, 70%, 50% y 30% en agua)
- c) Tris-HCl 1 M pH=7.5
- d) Proteinasa K (stock 20 mg/ml)
- e) Tritón-X-100
- f) Citrato de sodio 10%

- g) Kit de TUNEL (Roche Diagnostics, no. catálogo 1 684 795)
- h) DNasa I (stock 10U/ml)
- i) MgCl₂ 1M
- j) albúmina de suero bovino (BSA) 10 mg/ml
- k) Glicerol al 80%
- l) Obtención de cortes en parafina del tejido de interés (ver sección de hibridaciones *in situ* en cortes)

Procedimiento

A) Desparafinar y rehidratar.

- | | |
|--------------------------------|--------------|
| 1. Xilol | 10 min 60°C |
| 2. Xilol | 10 min T. A. |
| 3. Xilol | 10 min T. A. |
| 4. EtOH 100% | 5 min |
| 5. EtOH 100% | 3 min |
| 6. EtOH 90% | 3 min |
| 7. EtOH 80% | 3 min |
| 8. EtOH 70% | 3 min |
| 9. EtOH 50% | 3 min |
| 10. H ₂ O destilada | |

B) Permeabilizar el tejido.

11. Incubar en una solución de Tris-HCl 10 mM pH=7.5 con Proteinasa K a 20 µg/ml por 15-20 min a T. A.

*El tiempo de proteinasa, puede variar de tejido en tejido. Esta permeabilización fue para cortes de cerebro de E13.5

- | | |
|---|----------------|
| 12. PBS 1X | 5 min |
| 13. PBS 1X | 5 min |
| 14. Solución de permeabilización | 2 min en hielo |
| (Tritón-X-100 0.1% y citrato de Na ⁺ 0.1% en H ₂ O) | |
| 15. PBS 1X | 5 min |

*Si se requiere de un control positivo, aquí se puede añadir DNasa a una laminilla. Se incuban las muestras en una solución de Tris-HCl 50 mM pH=7.5, MgCl₂ 1 mM, albúmina de suero bovino (BSA) 1 mg/ml y 1U/ml ó 0.5 mg/ml de DNasa.

C) Marcaje y análisis.

16. PBS 1X 5 min

17. Secar alrededor de la muestra.

18. Añadir 50 µl de la mezcla de TUNEL-FITC (de acuerdo a las especificaciones del kit en este caso Roche), tratando de cubrir todos los tejidos. Colocar un parafilm para evitar la desecación de la muestra. Incubar por 60 min en cámara húmeda a 37°C.

19. PBS 1X 5 min

20. PBS 1X 5 min

21. PBS 1X 5 min

22. Glicerol 80% en PBS

23. Analizar en un microscopio de fluorescencia en la longitud de onda adecuada al fluoroforo.

Opcional:

24. En el punto 21, se seca alrededor de la muestra y se coloca 50 µl del anticuerpo anti-fluoresceina acoplado a la fosfatasa alcalina, para ver las muestras en color y no en fluorescencia. Se incuba por 30 min a 37°C en una cámara húmeda.

*Si hay fondo inespecífico, puede ser que el tejido tenga actividad de fosfatasa endógena, por lo que hay que inactivarla dejando a los tejidos en PBS por 15 min a 70°C previo a poner el anticuerpo. La fosfatasa endógena es sensible al calor, mientras que la acoplada al anticuerpo es resistente al calor.

25. PBS 1X 5 min

26. PBS 1X 5 min

27. PBS 1X 5 min

28. Añadir el sustrato para la fosfatasa de acuerdo a las instrucciones del kit de Roche. En general para revelar la actividad de fosfatasa, se colocan los sustratos (NTMT y BCIP o Rojo Rápido) en un buffer de Tris-HCl 0.1 M pH=8.2. La señal se observa en aproximadamente 25 min.

29. Se montan las muestras en Glicerol al 80% y se observan en un microscopio de luz.

6. DETECCION DE ERO *IN SITU*

6.1. Tinción con dihidrorodamina 123

Se utiliza la misma estrategia de tinción que con el AA, pero en este caso se tiñe con DHR-123 a una concentración final de 10 µgr/ml (stock 5 mg/ml en DMSO; Molecular Probes) diluidos en PBS.

6.2. Tinción con hidroetidio

-Se tiñen médulas espinales embrionarias por 30 min en una solución de hidroetidio (Het) 100µgr/ml en PBS o DMEM X (stock 2 mg/ml disuelto en DMSO; Molecular Probes).

-Posterior a la tinción, las médulas se fijan con PFA 4%, se lavan con PBS y se colocan en una solución de sacarosa 30% en PBS toda la noche.

-Se hacen cortes al criostato y se analizan en un microscopio de fluorescencia.

7. INMUNOFUORESCENCIA

7.1. Detección de Islet 1/2

Materiales y soluciones

PBS 1X (Innogenex)

NaCl 137 mM

KCl 2.7 mM

NaPO₄ 10 mM

b) Tritón-X-100

c) Parafilm

d) Suero de oveja

e) Anti-inmunoglobulinas G (IgG) de ratón hechas en cabra (DAKO, No. Catálogo Z0420)

f) Anticuerpo primario hecho en ratón contra Islet1/2, sobrenadante (Hybridoma Bank, Iowa; 4D5 y 2D6)

g) PFA 4% hecho el mismo día

h) Anticuerpo secundario acoplado a Alexa-Fluor 594nm hecho en ratón

i) Glicerol al 80%

*Inmunofluorescencia sobre cortes al criostato de médula espinal con anticuerpos monoclonales hechos en ratón (Sobrenadante: Ab primario contra Islet (Tiempo aproximado del protocolo 9 hr)

Procedimiento

-Obtener cortes al criostato (para esta inmunofluorescencia no funcionan cortes de médula en parafina)

-Fijar los cortes con PFA 4%/PBS por 2 min a T. A.

-PBS 5 min (usar PBS Innogenex)

-PBS 5 min

-PBS 5 min

-Permeabilizar con PBS + triton 1% (PBT 1%) por 5 min T. A.

-Permeabilizar nuevamente 5 min T. A.

-PBS 5 min

-PBS 5 min

-Bloquear con anti-IgG de ratón 1:50 en PBT 1% por 1 hr a T. A.

-PBS 5 min

-PBS 5 min

-Bloquear con 10% de suero de oveja en PBS + 0.2% triton (PBT 0.2%) por 3 hr a T. A.

-Poner anticuerpo primario este se usa 1:1 el 4D5:2D6. Poner 25 μ l por muestra y colocar un parafilm (esto con el objetivo de que el anticuerpo se distribuya homogéneamente) se incuba por 1 hr y 30 min a T. A.

-PBT 1% 10 min

-PBT 1% 10 min

-PBT 1% 10 min

-Poner anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a Alexa-Fluor 594 nm (rojo) en una dilución de 1:500 con 10% de suero de oveja en PBT 1% por 35 min a T. A. Poner 50 μ l de este anticuerpo.

-PBT 1% 10 min

-PBT 1% 10 min

-PBT 1% 10 min

-Cubrir con la solución de montaje.

7.2. Detección de bromodeoxiuridina

Materiales y soluciones

a) Bromodeoxiuridina (BrdU, stock del kit de Roche)

b) PFA 4%

c) PBS (Innogenex)

d) Sacarosa al 30% en PBS

e) HCl 2N

f) Ácido Bórico 0.1 M ph=8.5

g) Anti-IgGs

h) Anticuerpo primario anti-BrdU (del kit de Roche Diagnostics No. de catálogo I 299 964)

i) Buffer de incubación (del kit de Roche)

j) Anticuerpo secundario acoplado a Alexa-Fluor 594 nm hecho en ratón.

k) Suero de oveja

Procedimiento

- Incubar las médulas embrionarias durante el cultivo con BrdU en una concentración de 50 μ gr/ml (de acuerdo a REF)
- Fijar por 2 hr con PFA 4%/PBS
- Lavar con PBS 10 min
- Lavar con PBS 10 min
- Lavar toda la noche (O/N) a 4°C con PBS.
- Crioproteger con sacarosa al 30% en PBS a 4°C toda la noche.
- Una vez que el tejido tiene la densidad de la sacarosa, cortar secciones de 10 μ m.
- Secar los cortes por 45 min y fijar con PFA 4%/PBS 2 min a T. A.
- PBS 5 min (apartir de este momento con agitación suave)
- PBS 5 min
- PBS 5 min
- Permeabilizar con ácido clorhídrico (HCl) 2 N por 20 min T. A. (2. 89 ml de HCl concentrado en 50 ml de agua destilada)
- PBS 5 min
- PBS 5 min
- PBS 5 min
- Permeabilizar con PBS + 0.2% de tritón X-100 (PBT 0.2%) por 20 min a T. A.
- Incubar con 0.1 M de ácido bórico pH=8.5 por 20 min a T. A (con el fin de equilibrar el pH).
- PBS 5 min
- PBS 5 min
- PBS 5 min
- Bloquear las IgG de ratón, usando una concentración de 1/50 de anti-IgG por 1 hr T. A.
- PBS 5 min
- Bloquear con 10% de suero de oveja en PBT 0.2% por 10 min a T. A.

-Colocar el anticuerpo primario anti-BrdU con una dilución de 1:9 diluido en el buffer de incubación del kit, por 2 hr a 37°C. Cubrir con parafilm

-PBT 10 min

-PBT 10 min

-PBT 10 min

-Incubar con el anticuerpo secundario anti-ratón Alexa-Fluor 594 nm (rojo) en una dilución 1/500 en 10 % S. O. en PBT 0.2% por 35 min a T. A.

-PBT 10 min

-Teñir los núcleos con Hoescht-33258 en una concentración de 0.04 mg/ml en PBS por 10 min a TA.

-PBT 10 min

-PBT 10 min

-Montar en 80% de glicerol en PBS.

-Observar en el microscopio de fluorescencia.

8. HIBRIDACIONES *IN SITU*

8.1. En pieza completa

- **Preparación de las sondas de RNA marcadas con UTP-DIG.**

1. Mezclar a T. A.

Agua destilada	x μ l
Buffer de transcripción 10X (Roche)	4 μ l
0.1 M DTT	2 μ l
Mezcla de nucleótidos 10X (Roche)	2 μ l
10 mM ATP	
10 mM CTP	
10 mM GTP	
6.5 mM UTP	
3.5 mM DIG-11-UTP	

Plásmido linearizado (1 μ gr)	x μ l
Inhibidor de RNasas (100 U/ml)	0.5 μ l
RNA polimerasas (SP6, T7 o T3; 20U/ μ l)	<u>2 μl</u>
Volumen total	20 μ l

2. Mezclar y centrifugar brevemente
3. Incubar por 2 h a 37°C (después de este paso se puede checar en un gel para ver si se transcribio)
4. Añadir 2.5 μ l (0.1 volúmen) de 4 M de cloruro de litio y 75 μ l (2.5 vol) de etanol (enfriado previamente a -20°C). Mezclar bien.
5. Dejar que se precipite la sonda por al menos 30 min a -60°C o 2h a -20°C.
6. Centrifugar a 13,000 X g por 15 min a -4°C.
7. Decantar el etanol y lavar el pellet cuidadosamente con 50 μ l de etanol al 70% (previamente enfriado a -20°C)
8. Centrifugar nuevamente por 5 min, decantar y secar brevemente.
9. Disolver en 100 μ l (0.1 μ gr/ μ l) de agua estéril libre de RNasas o buffer TE
10. Añadir 1 μ l de inhibidor de RNasas y usar inmediatamente o almacenar en alícuotas a -70°C.
11. Remover 5 μ l y correrlo en un gel para DNA hecho en TBE 0.5X al 1 % de agarosa. Se usa un marcador de peso molecular para DNA. Correr el gel a 100 V por 30- 60 mn

• **Preparación de las médulas espinales embrionarias.**

Precaución: La hibridación debe realizarse en condiciones libres de RNasas. Preparar el material de vidrio horneándolo 180°C por 4 h, cubriendo las bocas de los frascos con aluminio. Las tapas se autoclavearan. Preparar todas las soluciones y buffers con agua tratada con DEPC (1:1000).

1. Preparar paraformaldehído al 4% (PFA) como sigue:
 - Tratar agua con DEPC 1 μ l por 1 ml de agua. Agitar el agua toda la noche con una mosca. Autoclavear según el procedimiento rutinario.
 - Para 100 ml de H₂O/DEPC pesar 4 gr de PFA. Calentar 86 ml de agua (no debe hervir) y ponerla sobre una parrilla caliente, añadir el PFA. Dejar que se agite hasta que casi se disuelve. La solución no debe de pasar los 70°C. Añadir 10 μ l de 10 M NaOH y mezclar. La solución debe quedar transparente. Enfriar la solución, añadir 10 ml de PBS/DEPC 10X y llevar al volumen final de 100 ml. Almacenar en alícuotas de 10 ml a -20°C.
 - Cuando se van a obtener los tejidos, se descongela una alícuota y se mantiene en hielo. NO recongelar el PFA usado.

2. Sacrificar a la ratona gestante y remover el útero. Colocar a los embriones en una caja de Petri con PBS-ES frio. Remover las membranas extraembrionarias y dejar que sangre el embrión. Una vez que sangro pasarlo a cajas de 35 mm con PBS-ES frio y disectar la médula espinal. Cortar por la parte dorsal de la médula las meninges, sin removerlas. En una caja de 35 mm con PFA 4% frio colocar la médula y en este momento remover las meninges. Este procedimiento permite que la médula quede plana. Con unas pinzas curvas, pasar muy suavemente estas por enzima de la médula para que se aplane completamente. Dejar que se fije en esta posición y posteriormente pasarla a un tubo con PFA 4%. Dejar fijando toda la noche a 4 °C.

3. Dejar fijando toda la noche a 4 °C.

4. Lavar y deshidratar las médulas espinales como sigue (PBT es PBS/0.1% Tween)

PBT	5 min	4°C
PBT	5 min	4°C
25% MeOH/PBT	5 min	
50% MeOH/PBT	5 min	
75% MeOH/PBT	5 min	
100% MeOH/PBT	5 min	
100% MeOH/PBT	almacenar a -20°	

5. **1er. día** de hibridación. Colocar los tejidos en pozos de una caja de 12, hasta la parte de la prehibridación. Tomar los tejidos y separar para usar con distintas sondas. Un pozo por sonda de RNA. No colocar tejidos de distintas etapas, en este caso médulas embrionarias de E12 con E13, ya que requieren diferentes tiempos de permeabilización con Proteinasa K.

- Rehidratar: 75% MeOH/PBT 5 min
 - 50% MeOH/PBT 5 min
 - 25% MeOH/PBT 5 min
 - PBT 5 min
 - PBT 5 min
 - Aclarar: 6%(v/v) H₂O₂ en PBT 1h T. A. con agitación suave (usar H₂O₂, recién abierto) = 1 ml de H₂O₂ al 30% en 5 ml de PBT totales
 - PBT 5 min
 - PBT 5 min
 - PBT 5 min
 - Permeabilizar: 10µg/ml de proteinasa K en PBT 10-15min
- (*el tiempo de proteinasa K depende del estadio embrionario de la médula espinal, para médulas de E12-E15)

- Parar la reacción con: 2 mg/ml glicina en PBT (sol. Fresca)
5 min
- PBT 5 min
- PBT 5 min
- Fijar (0.2% glutaraldehído/4%PFA en PBT) 20min
(añadir 8µl de 25% glutaraldehído y 5µl 20% Tween por ml de PFA)
- PBT 5 min
- PBT 5 min
- Prehibridar: (usar tubos de rosca, siliconizados) 1hr 70°C

Mezcla final	Stock	Volumen a añadir-10 ml
Formamida 50%	100%	5 ml
SSC 5X pH=5	20X	2.5 ml
50 µg/ml tRNA levadura	10 mg/ml	50 µl
SDS 1%	10%	1 ml
Heparina 50 µg/ml	10 mg/ml	50 µl
H ₂ O _{DEPC}		1.4 ml

- Hibridar: Sol. Prehibridación + 10µl sonda (±100 ng) toda la noche a 70°C

6. **2º. día** de hibridación.

- Solución 1 30 min 70°C
(50% de formamida, 5X SSC pH 4.5, 1% SDS, H₂O/DEPC) [A partir de este punto se quita la solución, poniendo en la punta del tubo un pedazo de papel muy limpio, con el fin de evitar que al usar las pipetas las medulas se dañen]
- Solución 1 30 min 70°C
- 1:1 de solución 1 y 2 10 min 70°C
- Solución 2 5 min T.A.

(0.5 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1% Tween 20, H₂O/DEPC)

- Solución 2 5 min T.A.
- Solución 2 5 min T.A.
- Solución 2 5 min T.A.
- Solución 3 5 min T.A.

(50% formamida, 2X SSC pH 4.5, H₂O/DEPC)

- Solución 3 30 min 65°C

(empezar con el paso de preabsorción del anticuerpo anti-DIG)

- Solución 3 30 min 65°C

- TBST 1X 5 min T.A.

(TBST 10X para 100 ml: 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 25 ml de 1M Tris-HCl pH=7.5, 10 ml Tween-20. Autoclavear. Diluir a 1X y añadirle levamisol a una concentración de 2 mM (0.48 mg/ml) en el día de uso.

- TBST 1X 5 min T.A.
- TBST 1X 5 min T.A.
- Prebloquear las medulas espinales, encubándolas con 10% de suero de oveja [SO] en TBST por 3h. (Se inactiva el suero por incubarlo 30 min a 65°C antes del uso; esto es importante para evitar la presencia de enzimas que pudieran degradar dobles cadenas de RNA)
- Preabsorber el anticuerpo con polvo de embrión de la siguiente forma:

-Colocar 3 mg de polvo de embrión en 0.5 ml de TBST (en tubos de rosca) por 30 min a 70 °C con agitación.

-Colocar en hielo, permitiendo que se enfríe por unos minutos

-Añadir 5 µl de SO y 1 µl de anticuerpo anti-DIG (Roche, acoplado a fosfatasa)

-Agitar ligeramente por 1 h a 4°C

-Centrifugar por 5 min

-Remover el sobrenadante a un tubo nuevo y diluir a 2 ml con 1% SO/TBST

- Remover la solución de bloqueo de los tubos con cuidado de no llevarse las médulas
- Reemplazar la solución con el anticuerpo anti-DIG preabsorbido
- Mover ligeramente O/N a 4 °C

7. **3er. día** de hibridación.

- TBST 1X (añadir levamisol 0.48 mg/ml) 5 min T.A.
- TBST 1X 5 min T.A.
- TBST 1X 5 min T.A.
- TBST 1X 1 h T.A.
- TBST 1X 1 h T.A.
- TBST 1X 1 h T.A.
- TBST 1X 1 h T.A.
- TBST 1X O/N T.A.

8. **4o día** de hibridación. En este día se revela la hibridación

- NTMT 10 min T.A.
(NaCl 100 mM, Tris-HCl 100 mM pH=9.5, MgCl₂ 50 mM, Tween-20 0.1%, levamisol 2 mM y H₂O_{DEPC}; esta solución se prepara desde los stocks el día del uso)
- NTMT 10 min T.A.
- NTMT 10 min T.A.
- Transferir las médulas a una caja de 12 pozos
- Incubar las médulas en NTMT con 3.5 µl de NBT/ml y 3.5 µl BCIP/ml ambos de Roche)
- Incubar con agitación suave cubriendo la caja con aluminio (con el fin de evitar la luz, ya que el NBT y BCIP ambos sustratos de la fosfatasa, se precipitan con la luz) por ±30 min

- La señal optima se obtiene entre las 4-6 hr, pero esto varia de sonda en sonda y de tejido en tejido.
- Lavar con PBT 15 min T.A.
- Lavar con PBT 15 min T.A.
- En este punto se pueden limpiar la señal del ruido deshidratando las médulas con MeOHs ascendentes (25, 50, 75 y 100%) y posteriormente volviendo a rehidratar con MeOHs descendentes (75, 50 y 25%).
- Lavar con PBT 5 min T.A.
- Lavar con PBT 5 min T.A.
- Lavar con 50% glicerol/PBT
- Almacenar y tomar fotos en 80% glicerol/PBT 4°C

8.2. Sobre cortes en parafina

A) DIA 1: Prehibridación e hibridación de las secciones del tejido.

La prehibridación de las laminillas se lleva a cabo en recipientes Coplin con 250ml de solución. La otra forma de hacer esto, es en recipientes para 5 laminillas con un volumen de 20 ml. Todos los recipientes en los que se va a realizar la hibridación deben estar perfectamente lavados, enjuagados con H₂O/DEPC, así como autoclaveados (en caso de ser de vidrio se deben hornear).

1. Xilol puro 10 min 60°C
2. Xilol puro 10 min T. A.
3. EtOH 100% 5 min T. A.
4. EtOH 100% 5 min T. A.
5. EtOH 90% 5 min T. A.
6. EtOH 80% 5 min T. A.
7. EtOH 70% 5 min T. A.
8. EtOH 50% 5 min T. A.
9. EtOH 30% 5 min T. A.

10. Solución salina 0.15 M 5 min T. A.
11. PBS_{DEPC} 1X 5 min T. A.
12. 6% H₂O₂/PBS_{DEPC} 30 min T. A.
(Utilizar un H₂O₂ recién abierto)
13. PBS_{DEPC} 1X 5 min T. A.
14. PBS_{DEPC} 1X 5 min T. A.
15. 4% PFA/PBS_{DEPC} 20 min T. A.
16. PBS_{DEPC} 1X 5 min T. A.
17. PBS_{DEPC} 1X 5 min T. A.
18. 20 µg/ml proteinasa K de un stock de 10 mg/ml. Diluir la proteinasa en Tris-HCl 50 mM, EDTA 5 mM pH=8.0 por 1 min*
*NO debe dejarse por mas de 1 min la proteinasa, ya que puede dañarse el tejido.
19. PBS_{DEPC} 1X 5 min T. A.
20. 4% PFA/PBS_{DEPC} 20 min T. A.
21. Poner la mezcla de acetilación 10 min T. A.
Para un volumen de 250 ml: Trietanolamina 0.1M y 625 µl de anhidro acético. La mezcla debe ser fresca.
22. PBS_{DEPC} 1X 5 min T. A.
23. PBS_{DEPC} 1X 5 min T. A.
24. Solución salina 5 min T. A.
25. EtOH 30% 2 min
26. EtOH 50% 2 min
27. EtOH 70% 2 min
28. EtOH 80% 2 min
29. EtOH 90% 2 min
30. EtOH 100% 2 min
31. Dejar secar. Las muestras están listas para la sonda.
Hacer suficiente volumen de mezcla de hibridación. Se necesitan aproximadamente 100 µl/laminilla.

Mezcla de hibridación:

Mezcla final	Stock	Volumen a añadir-1 ml
Formamida 50%	100%	500 μ l
SSC 5X pH=5	20X	250 μ l
50 μ g/ml tRNA levadura	10 mg/ml	5 μ l
SDS 1%	10%	100 μ l
Heparina 50 μ g/ml	10 mg/ml	5 μ l
H ₂ O _{DEPC}		140 μ l

Diluir la sonda en la mezcla de hibridación en una relación 5:95 (sonda:solución)

32. Colocar 100 μ l de la mezcla de hibridación junto con la sonda por laminilla.

33. Cubrir con un parafilm o con cubreobjetos. Asegurarse que la mezcla de hibridación cubra completamente el tejido.

34. Incubar en una caja con tapa hermética toda la noche a 65°C. Poner en el fondo de la caja papeles mojados con formamida 50%/SSC 5X, con el fin de mantener húmeda la caja y evitar que se seque la mezcla de hibridación.

B) DIA 2; Lavados y enlace del anticuerpo vs DIG.

35. Una vez concluida la hibridación, pasar las laminillas a recipientes que contengan SSC 5X a 65°C hasta que el parafilm se caiga. *Llevar a cabo estos pasos en contenedores para 5 laminillas de un volumen de 20 ml, con el fin de cubrir perfectamente los tejidos con las mezclas de lavado.

36. Solución 1 30 min 65°C

(Formamida 50%, SSC 5X pH=5, SDS 1%)

37. Solución 1 30 min 65°C

38. Solución 2 10 min T. A.

(NaCl 0.5 M, Tris-HCl 10 mM pH=7.5, Tween 20 0.1%)

39. Solución 2 10 min T. A.

40. Solución 2 10 min T. A.

41. Solución 3 30 min 65°C

(Formamida 50%, SSC 2X pH=5)

**Comenzar con la preabsorción del anticuerpo antidigoxigenina. Ver más abajo.

42. Solución 3 30 min 65°C

43. PBT 10 min T. A.

(PBT: PBS 1X y Tween 20 al 0.1% v/v)

44. PBT 10 min T. A.

45. Suero de cabra al 10% en PBT 2-3 hr T. A.

46. PBT 10 min T. A.

47. Cubrir las laminillas con la solución de anticuerpo preabsorbido y cubrir con parafilm. Poner las laminillas dentro de una caja con papel húmedo, con el fin de mantener la humedad.

48. Incubar en esta cámara toda la noche (O/N) a 4°C

**La preabsorción del anticuerpo es la misma que en la "in situ" en pieza completa (ver arriba).

C) DIA 3: Lavados y detección de la señal.

49. PBT 5 min T. A.

*En este paso, esperar que el parafilm se caiga, no se debe remover ya que se dañan las muestras.

50. PBT 5 min T. A.

51. PBT 5 min T. A.

52. PBT 30 min T. A.

53. PBT 30 min T. A.

54. PBT 30 min T. A.

55. NTMT 5 min T. A.
(NTMT: NaCl 100 mM, Tris-HCl 100 mM pH=9.5, MgCl₂ 50 mM,
Tween-20 0.1%, Levamisol 2 mM)
56. NTMT 5 min T. A.
57. NTMT 5 min T. A.
58. NTMT conteniendo NBT 3.5µl y BCIP 3.5µl por ml.
(Stock de NBT 100 mg/ml en dimetilformamida
stock de BCIP 50 mg/ml en dimetilformamida)
59. Incubar en la oscuridad alrededor de 5-6 hr.
*La reacción colorimetrica puede monitorearse, observando brevemente las laminillas bajo un microscopio de disección. Evitar la exposición prolongada a la luz, ya que el sustrato puede precipitarse y dar señal inespecífica).
60. Cuando se haya desarrollado suficiente color, lavar las laminillas con PBT y posteriormente con H₂O destilada.
61. Secar las laminillas toda la noche y montarlas con Entellan evitando que se formen burbujas. Antes de poner entellan, se pueden deshidratar las laminillas con EtOH en concentraciones graduales y finalmente con xilol.

VI. RESULTADOS.

1. Muerte celular y estrés oxidativo en el sistema nervioso central

Como se mencionó en la introducción, durante el desarrollo del sistema nervioso central (SNC) hay muerte celular en distintas regiones [44, 50], sin embargo las señales que la inducen no han sido identificadas. Con el objetivo de determinar la participación de las ERO en la muerte celular durante el desarrollo del sistema nervioso, en este trabajo se determinó el patrón de muerte celular así como el de estrés oxidativo.

El análisis de la muerte y del estrés oxidativo se realizó por conveniencia metodológica dividiendo al SNC en dos: anterior y posterior. El análisis comprendió del día E11.5 al E15.5, etapa en la que algunas poblaciones neuronales inician el contacto con el tejido blanco, lo que coincide con el período de muerte celular (ver [51]).

1.1. Patrones de muerte celular en el sistema nervioso central (SNC) anterior.

A pesar de que se conocen algunas de las regiones en las que ocurre muerte celular en el SNC anterior del ratón, hasta la fecha no se han generado mapas temporales y espaciales de dicha muerte. La generación de mapas de muerte es útil pues facilita el análisis de mutantes en las moléculas involucradas en este proceso. Se generó un mapa de muerte, para posteriormente analizar si en las regiones de muerte hay presencia de ERO.

Durante el desarrollo embrionario, el sistema nervioso central anterior se divide en cinco vesículas cerebrales: telencéfalo, diencéfalo, mesencéfalo, romboencéfalo y mielencéfalo [125]. Al proseguir el desarrollo, cada una de ellas da lugar a las estructuras y núcleos cerebrales del adulto (ver tabla 2).

Tabla 2. Organización de las distintas vesículas cerebrales y su función en el adulto.

Vesículas cerebrales	Estructuras adultas	Función
Telencéfalo	Lóbulos olfatorios	Olfato
	Hipocampo	Almacén de la memoria
	Cerebro	Asociación (inteligencia)
Diencefalo	Retina	Visión
	Epitálamo	Glándula pineal
	Tálamo	Centro de relevo para las neuronas auditivas y ópticas
	Hipotálamo	Regula la respiración, el sueño y la temperatura
Mesencéfalo	Cerebro medio	Tractos de las fibras entre el cerebro anterior y posterior, los lóbulos ópticos y el tectum
Metencéfalo	Cerebelo	Coordinación de movimientos musculares complejos
	Puente	Tractos de las fibras entre el cerebro y el cerebelo
Mielencéfalo	Médula	Centro de actividades involuntarias

Para evaluar el patrón general de muerte celular que ocurre en las distintas vesículas cerebrales, se realizaron tinciones en pieza completa con el colorante vital anaranjado de acridina (AA) en los estadios E12.5 a E15.5 del desarrollo del ratón. Se observó que las vesículas cerebrales presentan patrones específicos de muerte celular, y que dichos patrones cambian en las diferentes etapas del desarrollo (Fig. 9a). Sin embargo, la estrategia de tinción con AA en pieza completa no resultó adecuada para generar un mapa tridimensional de la muerte celular en este sistema, ya que en estadios avanzados (E14.5 y E15.5) es difícil evaluar la presencia de muerte celular debido al grosor del tejido. No obstante, fue posible generar un mapa que muestra a *grosso modo* las regiones de las vesículas cerebrales en las que hay muerte celular en los diferentes estadios embrionarios (Fig 10).

Para corroborar los resultados arriba mencionados, se hicieron cortes transversales de algunas vesículas cerebrales en los estadios E12.5 y E15.5. Utilizando la técnica de TUNEL, se detectó muerte celular en regiones que previamente se detectaron con el colorante AA (Fig 9b). En el día E12.5 se observó muerte celular en la región de unión entre los dos hemisferios, así como en la región ventral del mielencéfalo. En el día E15.5, el diencéfalo presentó muerte celular sin alguna distribución particular; mientras que en el mesencéfalo se pudo observar una línea bilateral de células muriendo. Los resultados obtenidos sugieren que la muerte celular en el SNC anterior es dinámica tanto temporal como espacialmente. No obstante, la información obtenida no fue suficiente para proseguir con la evaluación de la presencia de ERO.

1.2. Muerte celular y ERO en la médula espinal.

La muerte celular en el SN posterior (de aquí en adelante referido como médula espinal) de distintos organismos sigue un patrón antero-posterior y medio-lateral [51]. Para detectar el estrés oxidativo y la muerte celular, se hicieron tinciones con la dihidrorodamina 123, un colorante redox sensible, y con el colorante vital anaranjado de acridina (AA). Se corroboró el patrón de muerte celular reportado previamente por Yamamoto y Henderson (1999), utilizando el AA en lugar de la técnica de TUNEL (ver Fig 1 de la publicación anexa). Es importante mencionar que es la población de motoneuronas la que muere en este período. De manera interesante, los resultados muestran que hay una correlación positiva tanto temporal como espacial entre la muerte celular y niveles elevados de ERO, lo cual sugiere que las ERO pueden estar involucradas en la muerte celular de las motoneuronas.

2. Patrones de expresión de enzimas antioxidantes

Debido a que las ERO pueden inducir muerte celular en el sistema nervioso, su presencia debe ser rigurosamente regulada. Las concentraciones celulares de las ERO están controladas tanto por los mecanismos que las producen como por aquellos que las eliminan, entre los que destacan las enzimas antioxidantes, tales como la catalasa, las superóxido dismutasas y las glutatión peroxidadas (ver [78]). En la actualidad no se cuenta con los patrones de expresión de las enzimas antioxidantes en el desarrollo del sistema nervioso central. Grabenbauer y col. (2001) reportaron la expresión del mRNA de la catalasa en algunas etapas del desarrollo embrionario, siendo expresado preferencialmente en el hígado, el riñón, los intestinos, el cerebro y la piel [126]. No obstante, el estudio no muestra la regulación espacial y temporal del mensajero de la catalasa en el sistema nervioso. Conocer los patrones de expresión de enzimas antioxidantes resulta relevante si se toma en cuenta que pueden ser un indicativo de la regulación de la presencia de las ERO [127]. Es por esto que se decidió conocer la expresión de distintas enzimas antioxidantes en el desarrollo del SNC.

2.1. Durante el desarrollo del SNC anterior

En cuanto a la expresión de los mRNA de las enzimas antioxidantes en el desarrollo del SNC anterior, se obtuvo el patrón de expresión de la catalasa a través de hibridación *in situ* durante los estadios E12.5-E15.5. El mRNA de la catalasa se expresa en todas las vesículas cerebrales con mayor señal en las regiones ventriculares (proliferativas) en los distintos estadios analizados (Fig 11). En E12.5 la expresión del mensajero se detectó en distintos tejidos embrionarios entre los que sobresale el hígado, lo cual coincide con lo reportado [126]. La expresión del mRNA de la catalasa en las distintas vesículas cerebrales en el sistema nervioso anterior se observó desde los estadios más tempranos

analizados en este estudio y de manera particular su expresión es más abundante en las regiones ventriculares de dichas vesículas.

2.2. Durante el desarrollo de la médula espinal

Mediante RT-PCR, se determinó que los mRNA de *cas-1*, *sod1* y *sod2* se expresan en la médula espinal en E13.5 (Fig 12a) -etapa en la que hay muerte neuronal abundante (ver publicación Fig 1). Una vez determinada la presencia de los mensajeros de estas enzimas, se evaluó su localización en la médula espinal por hibridación *in situ*. Se observó que la *cas-1*, la *sod1*, la *sod2* y la *gpx4* se encuentran expresadas en la médula espinal en distintos estadios embrionarios (E12-E15) [ver publicación Fig 2], pero no así el mRNA de la *sod3* (dato no mostrado). Cabe mencionar, que la expresión más abundante de los mensajeros de las enzimas antioxidantes corresponde con la expresión del factor de transcripción Islet 1/2, un factor específico de motoneuronas [51].

A través de Western blot se evaluó la expresión de la catalasa, la *sod1* y la *sod2* en extractos totales de médula espinal. Utilizando tejidos adultos como controles de la expresión de las enzimas antioxidantes, se observó que la expresión de la catalasa es baja en la médula espinal embrionaria (Fig 12b); la expresión de la *sod1* fue similar en los tejidos analizados tanto embrionarios como adultos, mientras que la expresión de la *sod2* fue baja en los tejidos adultos y no fue detectable en los tejidos embrionarios (Fig 12b). Los resultados muestran que la expresión de los mRNA de las enzimas antioxidantes en la médula espinal coincide con los lugares en los que hay muerte celular y estrés oxidativo en la población de motoneuronas. Estos datos sugieren que las motoneuronas pueden estar respondiendo las señales que promueven la presencia de niveles elevados de ERO induciendo la expresión de sus defensas antioxidantes.

3. Efecto del antioxidante EUK-134 en la muerte celular embrionaria

Diversos estudios de neuronas en cultivo han mostrado que la pérdida del soporte trófico induce incrementos de las ERO, las cuales inician el proceso de MCP [99]. Adicionalmente, la presencia de antioxidantes como la N-acetilcisteína o la superóxido dismutasa, promueve la sobrevivencia de neuronas deprivadas de factores tróficos [104, 128]. En el caso de las motoneuronas, su período de muerte coincide con el período de competencia por la inervación del blanco [44]. Para determinar si el incremento en los niveles de ERO induce la muerte de las motoneuronas, se evaluó el efecto *in vivo* del antioxidante EUK-134, un compuesto sintético que mimetiza la actividad de la superóxido dismutasa y la catalasa, el cual ha sido muy efectivo en prevenir la muerte neuronal en distintos modelos patológicos [129-131].

3.1. Efecto del EUK-134 en el desarrollo embrionario. Inyección del antioxidante en el saco amniótico.

Con la finalidad de evaluar la sobrevivencia embrionaria y para comprobar la permeabilidad de los compuestos a tejidos internos tales como la médula espinal, se hicieron inyecciones intra-amnióticas con el colorante AA en embriones de E12. Se obtuvieron embriones viables 24 horas después de la inyección con AA en los que el colorante es capaz de teñir varios tejidos en los que hay muerte celular, incluida la médula espinal y las extremidades (Fig 13). Es importante mencionar que la inyección intra-amniótica es técnicamente complicada, ya que la manipulación de las hembras preñadas y la inyección debe ser muy precisa para evitar altas tasas de mortalidad.

Entre la etapa E12 a la E14.5 del desarrollo del ratón, distintas regiones embrionarias presentan MCP entre las que se encuentran las extremidades, el paladar y la médula espinal [51, 124, 132]. Se ha mostrado además que la presencia de antioxidantes en extremidades en cultivo retarda la regresión interdigital y disminuye la muerte celular

[124]. Para evaluar si la muerte celular durante el desarrollo embrionario es afectada por la presencia de antioxidantes, se hicieron inyecciones intra-amnióticas con el antioxidante EUK-134, el cual tiene actividad de superóxido dismutasa y catalasa, o con solución salina, como control, en embriones en E12 y se analizó el efecto 48 hr post-inyección (E14). La tasa de sobrevivencia de los embriones inyectados fue de alrededor de un 50% usando solución salina, AA o el antioxidante (ver tabla 3). Los embriones sobrevivientes inyectados con 1 y 2 mM del antioxidante EUK-134, presentaron un retraso en la regresión interdigital y defectos en el desarrollo de la cabeza, a diferencia de los embriones inyectados con solución salina, cuyo desarrollo es similar a los embriones no inyectados (Fig 14). Sin embargo, estos resultados no son conclusivos ya que no se obtuvo un número significativo de embriones. No se realizaron más análisis, debido a la alta tasa de mortalidad de las hembras post-operación y por el número tan bajo de embriones sobrevivientes con alteraciones en el desarrollo (ver tabla 4).

3.2. El EUK-134 induce la sobrevivencia neuronal. Uso de explantes de médula espinal.

i) Efecto en la población de motoneuronas

Debido a los problemas técnicos con las inyecciones intra-amnióticas, se decidió usar una estrategia alternativa. Se hicieron explantes de médula espinal completa, donde se evaluó que el patrón de muerte celular se conservara en condiciones de cultivos y que las motoneuronas siguieran respondiendo a factores de sobrevivencia como lo hacen *in vivo*. Se cultivaron médulas espinales de los días E12, E13, y E14 por un lapso de 12 horas y se evaluó la MCP a través de la tinción con AA (comparar Fig 1 y 5a control de la publicación anexa; datos no mostrados). Los resultados mostraron que la muerte de las motoneuronas en cultivo es similar al patrón de muerte natural en E13.5. Es necesario hacer notar, que las médulas espinales en cultivo pierden todos los

contactos con el tejido blanco, por lo que la muerte de las motoneuronas se extiende a todo lo largo de la médula. Sin embargo, esta muerte es específica de las motoneuronas pues no se observó muerte en otras regiones de la médula. El GDNF es un factor de sobrevivencia para las motoneuronas *in vivo* [133, 134], en el cultivo de médula espinal, este factor de crecimiento fue capaz de rescatar a un 30% de las motoneuronas respecto a los cultivos control (Fig 3 de la publicación anexa). Una vez corroborado que la médula espinal se comporta en cultivo de manera similar a lo que ocurre *in vivo*, se evaluó el efecto del antioxidante EUK-134.

La presencia del antioxidante EUK-134 en los cultivos de médula espinal disminuye los niveles de las ERO, pero no así el Z-VAD-FMK, un inhibidor general de las caspasas, (Fig 4 publicación anexa). Además el EUK-134 disminuye la muerte celular de manera dosis dependiente cuando ésta se detecta con la tinción con AA (Fig 5a, publicación) así como con la técnica de TUNEL (53%; Fig 5b publicación). El Z-VAD-FMK, por su parte, reduce la muerte celular hasta un 95% al evaluarse por TUNEL, pero no así al evaluar su efecto con AA (Fig 5c, publicación). Esto sugiere que posiblemente el AA puede estar detectando formas de muerte celular que no son dependientes de caspasas en la médula espinal en desarrollo.

La consecuencia lógica de la reducción en la muerte celular es el incremento en el número de motoneuronas. Esto fue corroborado a través de la detección de un marcador molecular de motoneuronas (Islet 1/2) en los cultivos tratados con el EUK-134 y el Z-VAD-FMK (Fig 6a y b de la publicación). A pesar de que el Z-VAD-FMK redujo de manera considerable la muerte celular evaluada por TUNEL, el incremento en el número de motoneuronas es mayor con el EUK-134. Estos datos sustentan la hipótesis de que otro tipo de muerte celular independiente de caspasas puede estar ocurriendo en la médula espinal y que ésta es regulada también por ERO.

Para descartar la posibilidad de que el incremento en el número de motoneuronas por el antioxidante se debe a un incremento en la proliferación o la diferenciación más que a la sobrevivencia, se realizaron dos tipos de experimentos utilizando el marcaje celular con la bromo-deoxi-uridina (BrdU). En el primero, se cultivaron médulas espinales en presencia del BrdU tanto en el medio control así como en el medio con el antioxidante, para posteriormente evaluar la incorporación de BrdU y determinar algún cambio en la proliferación. En el segundo, se inyectó el BrdU a las hembras preñadas 12 o 24 horas antes de cultivar a las médulas espinales en presencia o ausencia del antioxidante. Se evaluó la presencia de células marcadas con BrdU en las regiones postmitóticas para determinar la diferenciación y la migración neuronal. En ningún caso se observaron cambios en la proliferación, diferenciación o migración celular (Fig 9 publicación). Por lo tanto, todo lo anterior sugiere que la disminución de las ERO en las médulas espinales cultivadas en presencia del antioxidante EUK-134, lleva a la disminución de la muerte celular y por consecuencia a un incremento en la sobrevivencia de las motoneuronas, indicando que las ERO son señales relevantes en la inducción de la muerte de las motoneuronas.

ii) Efecto del EUK-134 en una población interneuronal.

Un resultado inesperado fue que el EUK-134 afecta la sobrevivencia de las interneuronas D2, las que al igual que las motoneuronas, expresan el marcador Islet 1/2 [57, 59]. En la presencia del antioxidante, el número de interneuronas se incrementa respecto al control y a los explantes tratados con Z-VAD-FMK, (ver figura 15, área punteada), es importante mencionar, que en esta región no hay células positivas para TUNEL (indicativo de muerte celular con fragmentación del DNA) (ver el área punteada en la Fig 15). Con la intención de saber si el EUK-134 afecta la proliferación o la diferenciación de las interneuronas D2, se realizaron los experimentos con BrdU descritos en la sección

anterior. Se determino que ni la proliferación o la diferenciación de las interneuronas cambian en la presencia del antioxidante respecto a las médulas espinales cultivadas en su ausencia o en presencia del Z-VAD-FMK. Estos resultados sugieren que el antioxidante EUK-134 podría estar previniendo un tipo de muerte celular en las interneuronas D2 mediada por las ERO, pero que es independiente de caspasas y que sucede sin fragmentación del DNA. Además, sustentan la idea de que distintos tipos de muerte celular tanto dependientes como independientes de caspasas pueden estar ocurriendo en la médula espinal, los cuales pueden ser promovidos por las ERO y que pueden o no presentar fragmentación del DNA.

iii) Mecanismos de muerte en las motoneuronas.

La autofagia es un tipo de muerte celular independiente de caspasas que no se asocia con fragmentación del DNA [29]. Para evaluar si la autofagia contribuye a la muerte de las motoneuronas, se cultivaron médulas espinales en presencia de un inhibidor de la autofagia (LY294002). Los resultados en la Fig 7 de la publicación anexa, muestran que el LY294002 induce un incremento en el número de motoneuronas sin afectar el número de células TUNEL positivas. Esto indica que un porcentaje de la muerte de las motoneuronas ocurre por autofagia.

Para determinar que vía de las caspasas contribuye a la muerte de las motoneuronas, se cultivaron médulas espinales con inhibidores específicos de la caspasa-8 (Ac-IETD_CHO) y la caspasa-9 (Ac-LEHD-CHO). Como se puede ver en la Fig 8 de la publicación anexa, ambos inhibidores incrementan el número de motoneuronas en la misma proporción que el inhibidor general de las caspasas (Z-VAD-FMK). Contrariamente a lo que se esperaba, ni el Ac-IETD_CHO ni el Ac-LEHD-CHO disminuyeron el número de células TUNEL-positivas en contraste a la disminución inducida por el Z-VAD-FMK. Los resultados sugieren que el

mecanismo de muerte dependiente de caspasas en las motoneuronas involucra a la caspasa 8 y 9 muy probablemente en una sola vía, pero que hay otras caspasas involucradas en la degradación del DNA.

4. Muerte celular y ERO en las extremidades anteriores en desarrollo

4.1. Expresión de enzimas antioxidantes

En 1998, Salas-Vidal y colaboradores mostraron que la presencia de ERO coincide con las regiones en las que ocurre muerte celular interdigital y que la presencia de distintos antioxidantes previene la muerte celular interdigital durante el desarrollo de las extremidades en un sistema en cultivo. Por otro lado, Schnabel y colaboradores (en preparación) han observado que la actividad de las glutatión peroxidasas se encuentra en el límite de las regiones interdigitales que sufren muerte celular y las regiones que sobreviven, y que ésta actividad coincide con la expresión de la glutatión peroxidasa 4 (Gpx4). Con estos antecedentes, se evaluó la expresión de las Sods en las extremidades en desarrollo. Usando hibridaciones *in situ*, se observó la presencia de los mensajeros de las tres sods, lo cual corrobora el resultado obtenido a través de RT-PCR (Fig 12a). La expresión de estos mRNAs se restringe a áreas adyacentes a las regiones de muerte celular (Fig. 8b), con un patrón particular para cada una de ellas. Es interesante notar que, en etapas tempranas del desarrollo de la extremidad, la expresión de las Sods es homogénea, mientras que en etapas con muerte celular, su expresión se excluye de las zonas de degeneración, las cuales coinciden con la presencia de ERO (Fig 8a). A diferencia de las otras dos sod, la sod3, se expresa en la parte más proximal de la extremidad y se excluye en la tercera falange. Estos resultados sugieren que las enzimas antioxidantes pueden estar jugando un papel relevante en regular la presencia de ERO y por lo tanto en la muerte celular.

4.2. Efecto del EUK-134 en la regresión interdigital.

Antecedentes previos mostraron que la regresión interdigital puede ser prevenida por la presencia de antioxidantes como el fenol o el dimetilsulfonato [124]. Como se ha mencionado, el antioxidante EUK-134, ha resultado muy efectivo para proteger de la muerte celular inducida por distintos modelos de patologías como la isquemia [129]. Por otro lado, los resultados de esta investigación mostraron que la expresión de algunas enzimas antioxidantes se encuentra en las regiones en las que no hay MCP. Decidimos evaluar si el EUK-134 era capaz de prevenir la muerte celular interdigital de las extremidades en cultivo.

Se hicieron cultivos de extremidades anteriores en E13 en presencia de distintas concentraciones del EUK-134 (50, 500 y 1000 μM). La etapa de inicio del experimento, corresponde al inicio de la muerte celular interdigital. Como se puede observar en la Fig 17, en presencia de 500, 1000 y 2000 μM de EUK-134 la regresión interdigital fue retardada en comparación con las extremidades control. Sin embargo, al evaluar la muerte celular con el AA no hay una clara disminución en el número de células muertas (Fig 18). Dado lo anterior, decidimos evaluar la muerte celular usando la técnica de TUNEL. El antioxidante EUK-134, fue capaz de retardar la regresión interdigital y de disminuir la muerte celular (Fig 18).

6. Resultados-Figuras

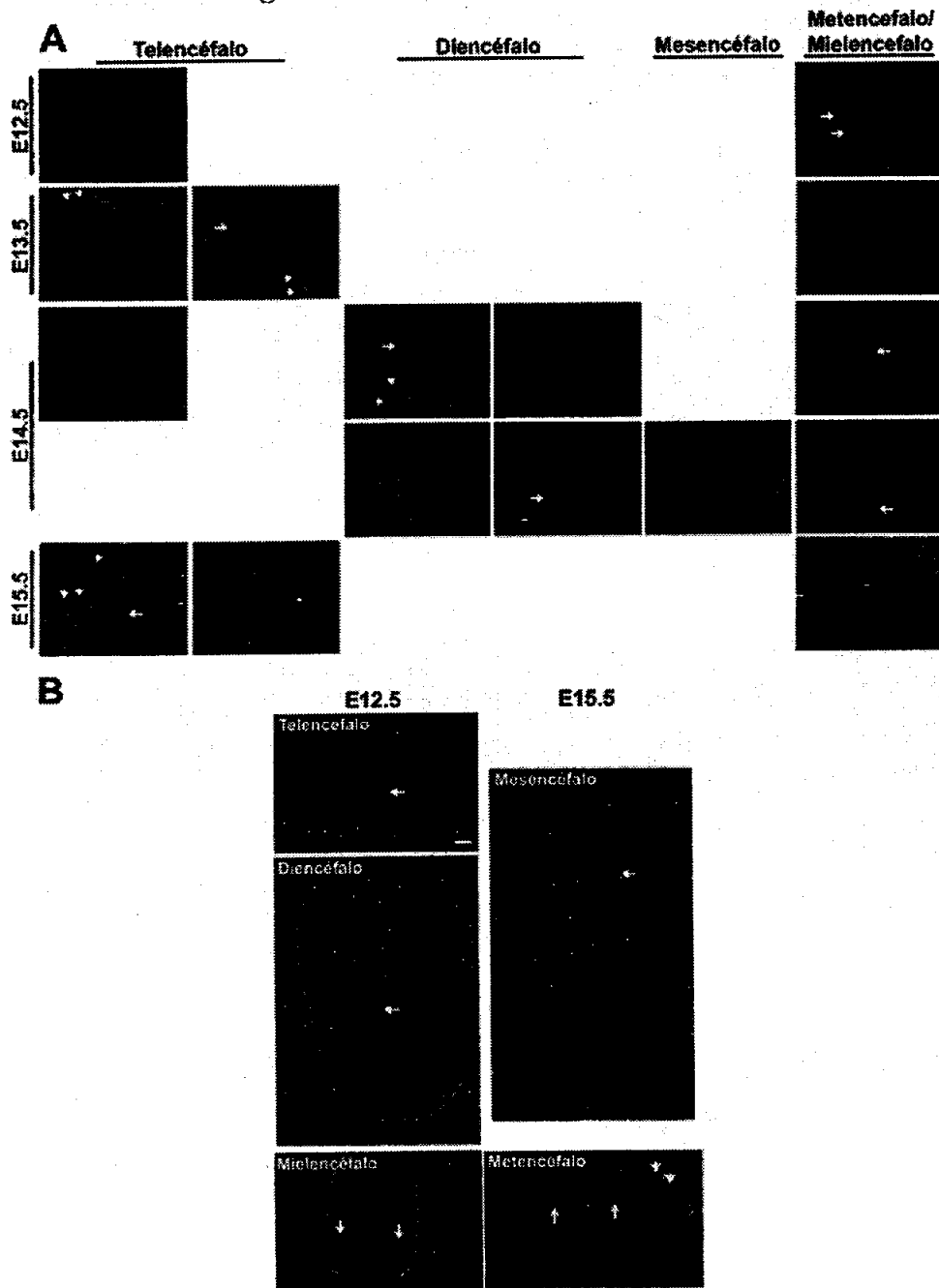
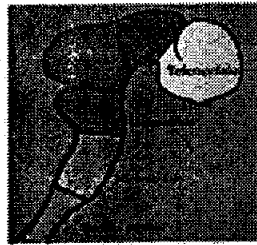


Fig 9. Muerte celular durante el desarrollo del sistema nervioso central.

A: Tinción con anaranjado de acridina en pieza completa del día E12.5 al E15.5. Se muestra la muerte celular en las diferentes vesículas cerebrales (flechas) durante las diferentes etapas analizadas. La señal inespecífica se señala con cabezas de flecha. **B:** Muerte celular detectada por la técnica de TUNEL. Se muestran cortes representativos en la etapa E12.5 y E15.5; en E12.5 la muerte en la región del miencéfalo se detectó tanto con AA como con TUNEL. Flechas: Señal positiva para TUNEL. Cabezas de flecha: Señal inespecífica.

Vesículas cerebrales



Vista de una sección sagital

Vista de un corte transversal

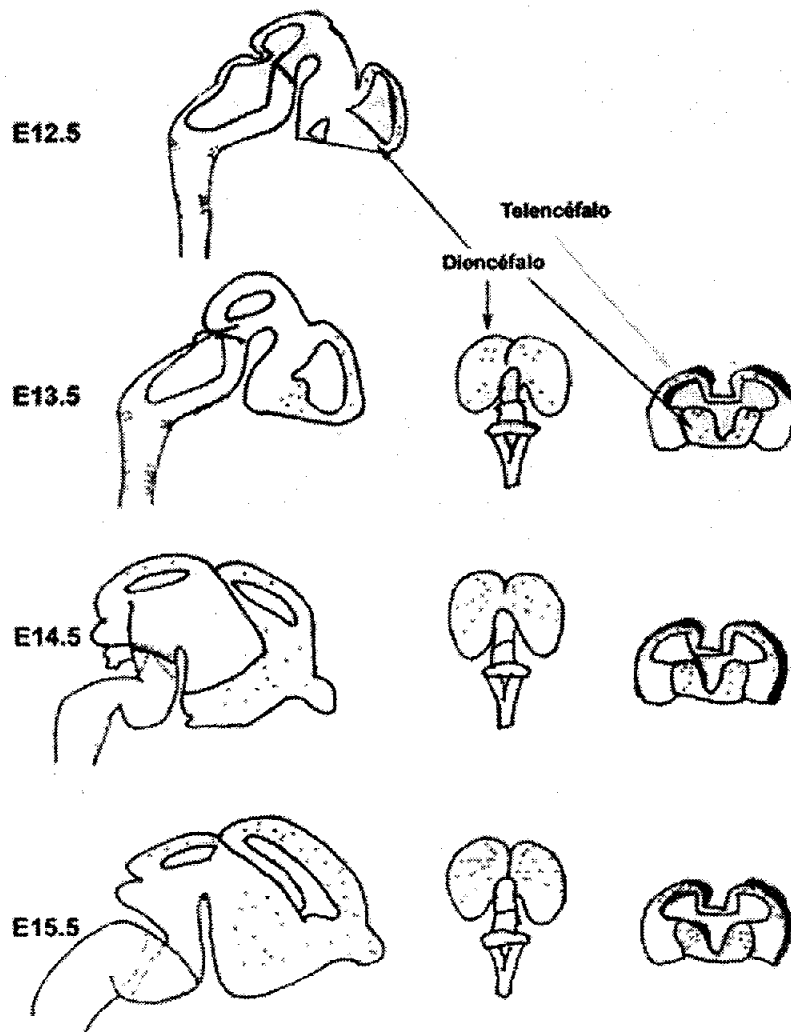


Fig 10. Mapa de muerte celular. Se tiñeron las distintas vesículas cerebrales de la etapa E12.5 a la E15.5 con anaranjado de acridina (5 μ gr/ml). Este mapa de muerte se obtuvo en base a las observaciones de las tinciones con AA en las distintas etapas de desarrollo. El esquema a la izquierda, representa un corte sagital del SN anterior, el del centro, representa al diencefalo aislado del telencéfalo y finalmente, el de la derecha representa un corte transversal que comprende al telencéfalo y al diencefalo. Las flechas indican la vesícula cerebral correspondiente al esquema superior.

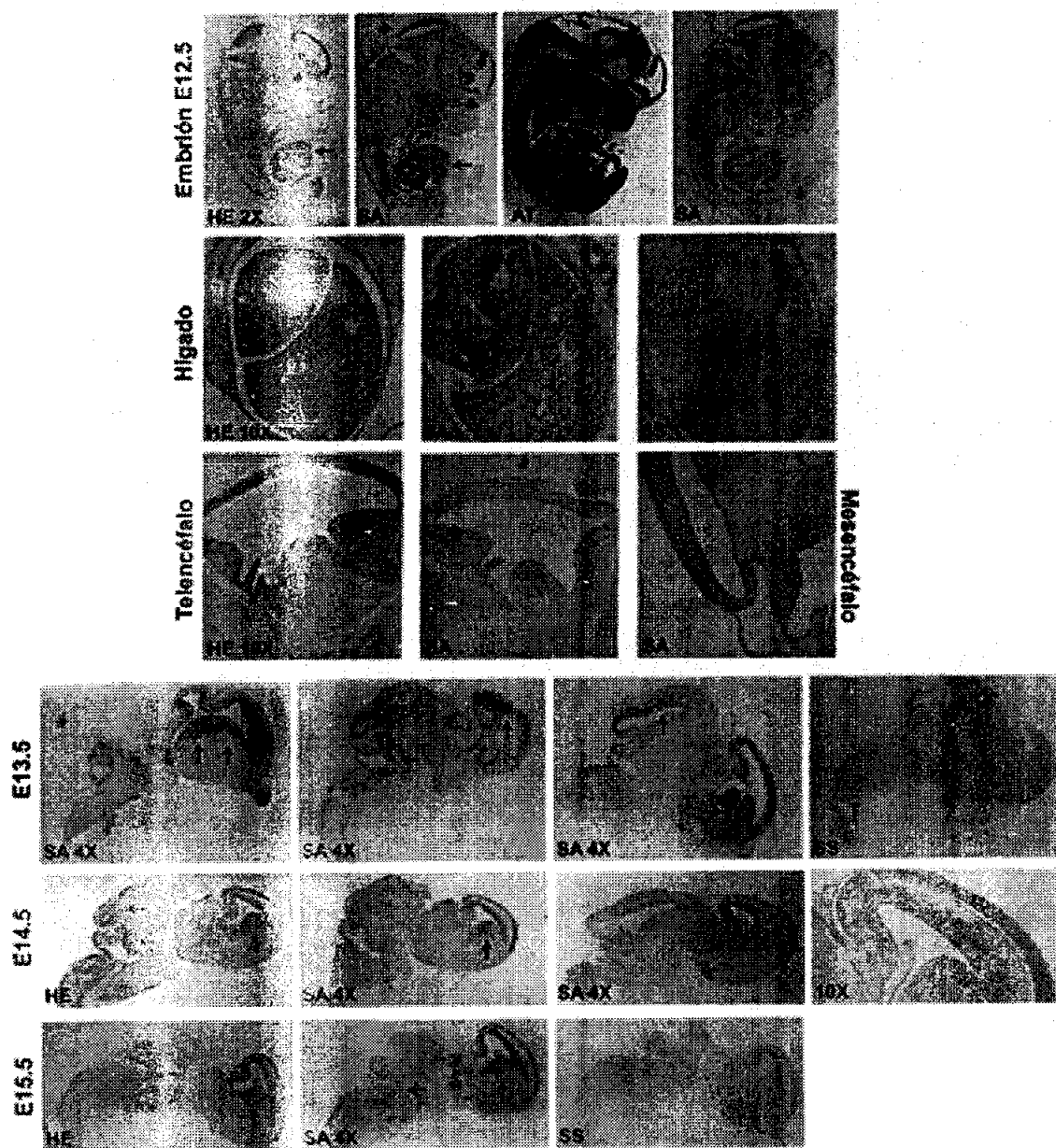


Fig 11. Hibridación *in situ* contra el mensajero de la catalasa en cortes sagitales de embriones de E12.5 y cerebros de E13.5 al E15.5. Se muestra que el mensajero se localiza principalmente en las regiones ventriculares de las distintas vesículas cerebrales (ver las flechas y el mapa que corresponde a las vesículas en la Fig 9c). Dichas regiones también contienen un número mayor de células como se puede observar en los tejidos teñidos con HE. Como puede observarse, la señal obtenida con la sonda antisentido es específica y al utilizar la sonda sentido no hay señal. Se muestran distintos cortes en diferentes niveles en algunos estadios. En la etapa E12.5 se muestran acercamientos (flechas) a los órganos que presentan más señal: el hígado y el cerebro. En cada una de las imágenes se indica cada condición y su correspondiente aumento. HE, tinción con hematoxilina y eosina; AT, tinción con azul de toluidina; SA, hibridación utilizando la sonda antisentido; SS, hibridación utilizando la sonda sentido.

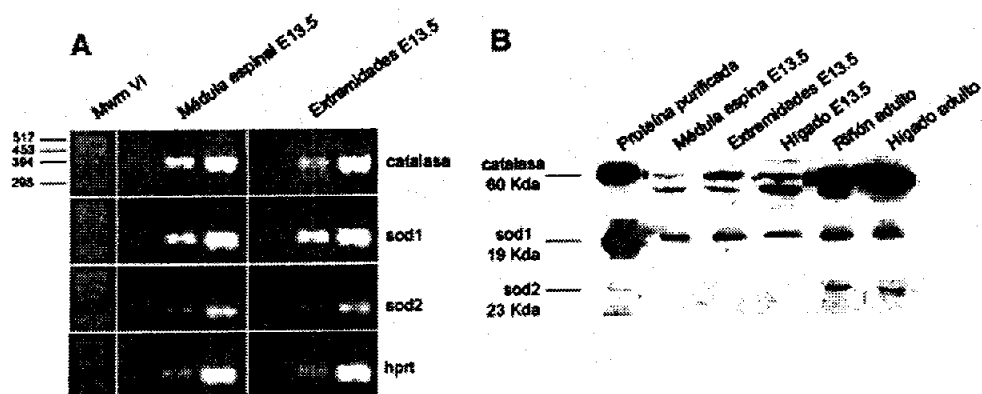


Fig 12. Expresión del mRNA y de la proteína de distintas enzimas antioxidantes. **A:** RT-PCR semi-cuantitativo para *cas-1*, *sod1*, *sod2* y *hppt*, de la médula espinal y de las extremidades anteriores en la etapa E13.5. Se tomaron los ciclos 20, 25 y 30 del PCR. Se puede observar que tanto la médula espinal como las extremidades, presentan niveles similares de expresión de los diferentes mensajeros. El mRNA control es *hppt*. **B:** Western blot contra las proteínas catalasa, *sod1* y *sod2*. Se hicieron extractos de los tejidos embrionarios y adultos, como se indica en la figura. Se observa que hay mayor expresión de la catalasa y la *sod2* en los tejidos adultos respecto a los embrionarios, sin embargo la expresión proteica de la *sod1* es equivalente en todos los tejidos analizados. Además la tinción de la membrana con Ponceau muestra niveles equivalentes de proteínas.

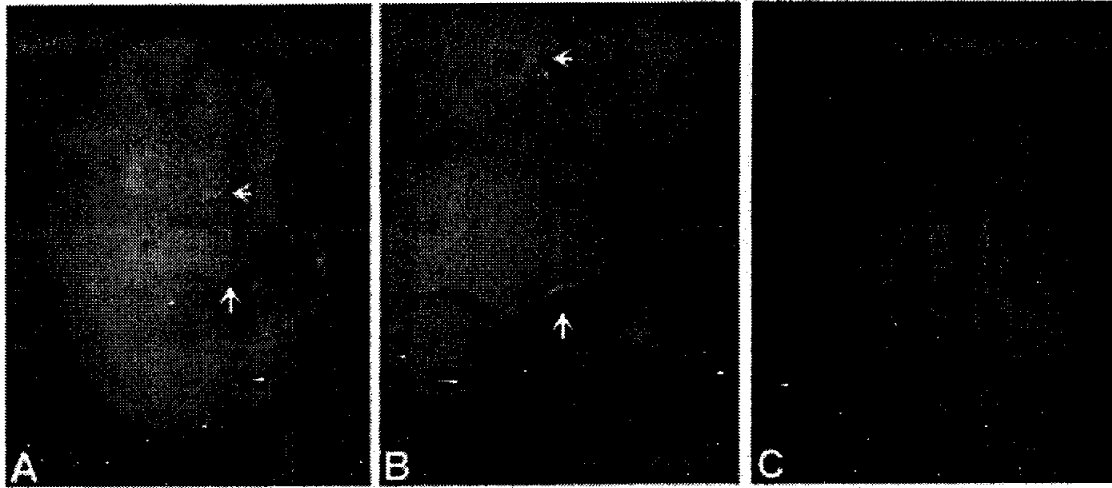


Fig 13. Embriones teñidos con anaranjado de acridina después de la inyección intra-amniótica. **A:** Se muestra un embrión teñido con AA después de 24 horas de la inyección intra-amniótica con AA en E12.5. Las flechas indican partes del embrión teñidas con AA que corresponden a tejidos en los que hay muerte celular y cuya amplificación se muestran en B y C. **B:** Amplificación del embrión en A. Se observa que tanto la extremidad anterior como el área de los bigotes hay tinción con AA, indicativo de muerte celular (áreas verde intenso, como se indica por las flechas). **C:** Se muestra la médula espinal del embrión en A y se puede observar que la tinción corresponde específicamente a la muerte celular que ocurre de manera natural (puntos brillantes).

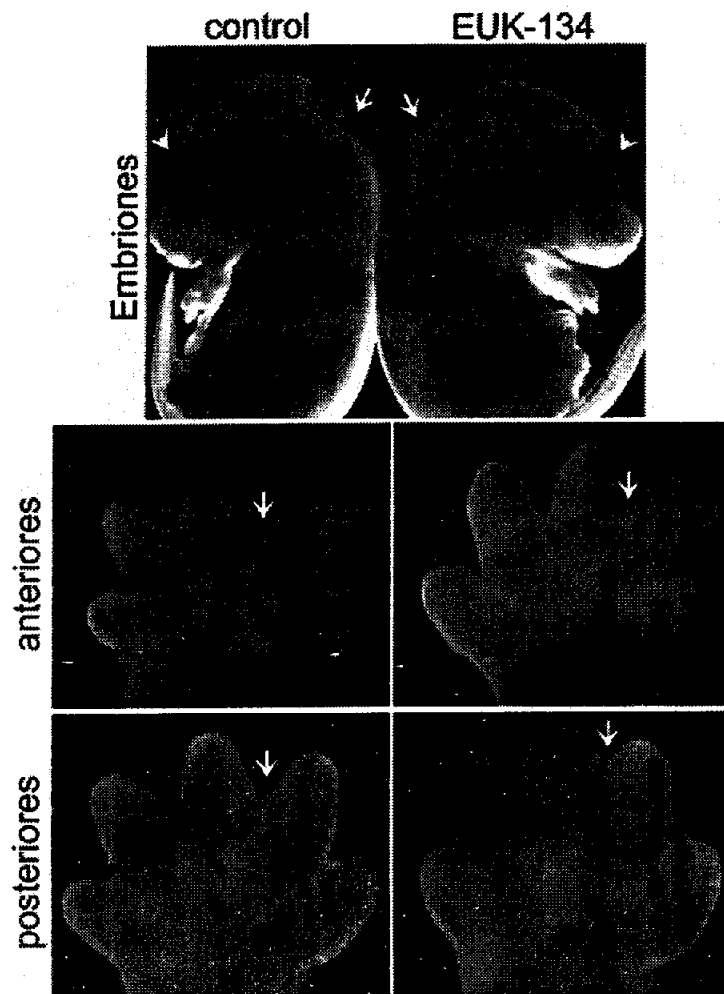


Fig 14. Inyección del antioxidante EUK-134 en el saco amniótico de embriones de E12.5. Se muestra el efecto de la inyección del antioxidante EUK-134 a una dosis de 2 mM. El antioxidante induce el hinchamiento de algunas vesículas cerebrales (flechas) y deformaciones de la cara (cabeza de flecha). También hay un retraso en la regresión interdigital tanto en las extremidades anteriores como posteriores (ver flechas)

Tabla 3. Tasa de supervivencia de embriones inyectados con EUK-134 o anaranjado de las soluciones control AA y solución salina.

Solución inyectada	Sobrevivencia embionaria
EUK-134	30% (35/116)
Solución salina	38% (23/59)
Anaranjado de acridina	51% (33/64)
Total	38% (91/139)

Tabla 4. Porcentajes de embriones inyectados con EUK-134 que presentaron alteraciones en el desarrollo.

Condiciones	Ratonas inyectadas	Sobrevivencia embionaria	Fenotipo de regresión interdigital
0.1 mM EUK-134	2	50% (6/12)	
0.5 mM EUK-134	3	24% (4/48)	50% (2)
1 mM EUK-134	10	24% (14/58)	14% (2)
2 mM EUK-134	3	42% (8/19)	25% (2)
5 mM EUK-134	2	30% (3/10)	
Total EUK-134	20	24% (35/147)	
Anaranjado de acridina (control)	7	39% (23/59)	
Solución salina (control)		30% (35/116)	
Total de los controles		46% (58/125)	

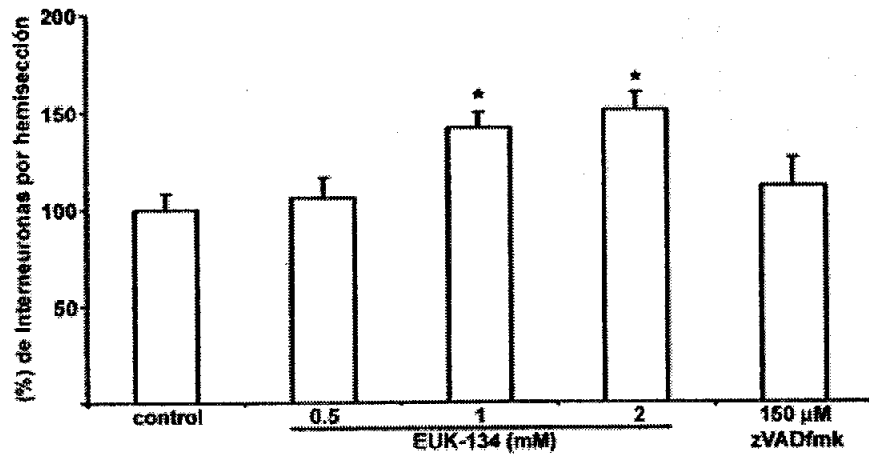
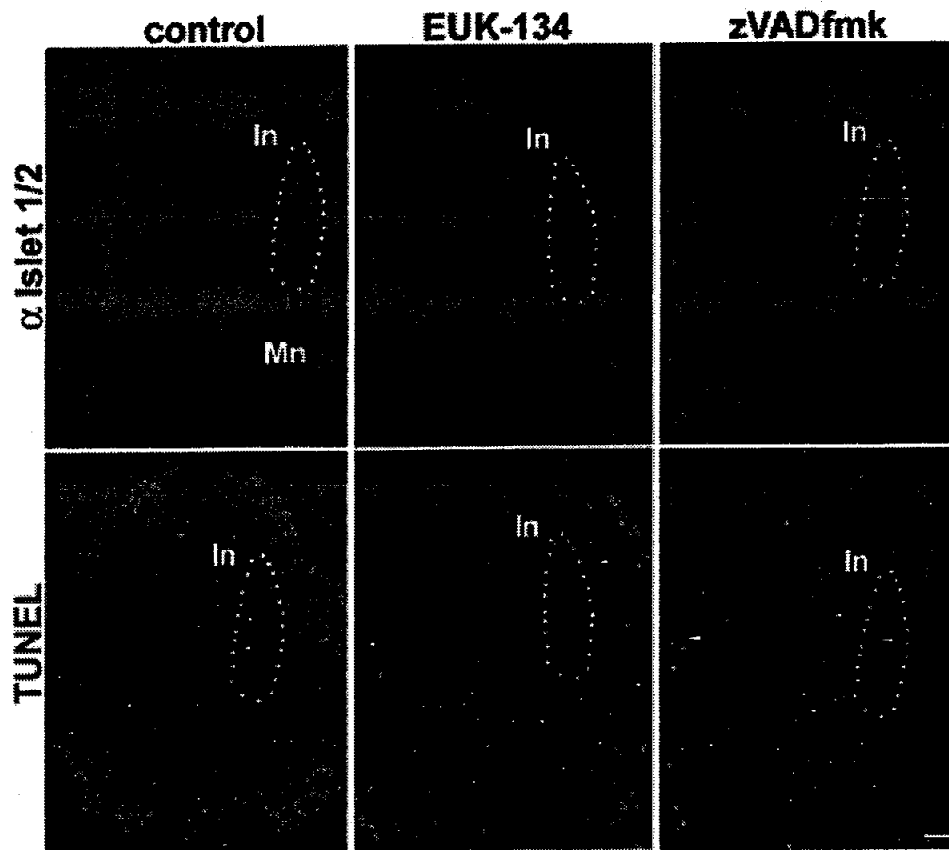


Fig 15. El antioxidante EUK-134 induce la sobrevivencia de las interneuronas D2. La presencia del EUK-134 genera el incremento en la sobrevivencia de las interneuronas D2 detectadas por el marcador Islet 1/2. Como se muestra en la gráfica, el efecto del antioxidante en la sobrevivencia es dependiente de la dosis, en cambio el inhibidor de las caspasas no conduce a un incremento en la sobrevivencia. Las imágenes muestran el efecto del EUK-134 a una dosis de 2 mM. El área punteada muestra a la población de interneuronas. La barra corresponde a 25 μ m. In, interneuronas D2; Mn, motoneuronas. (* $P < 0.01$).

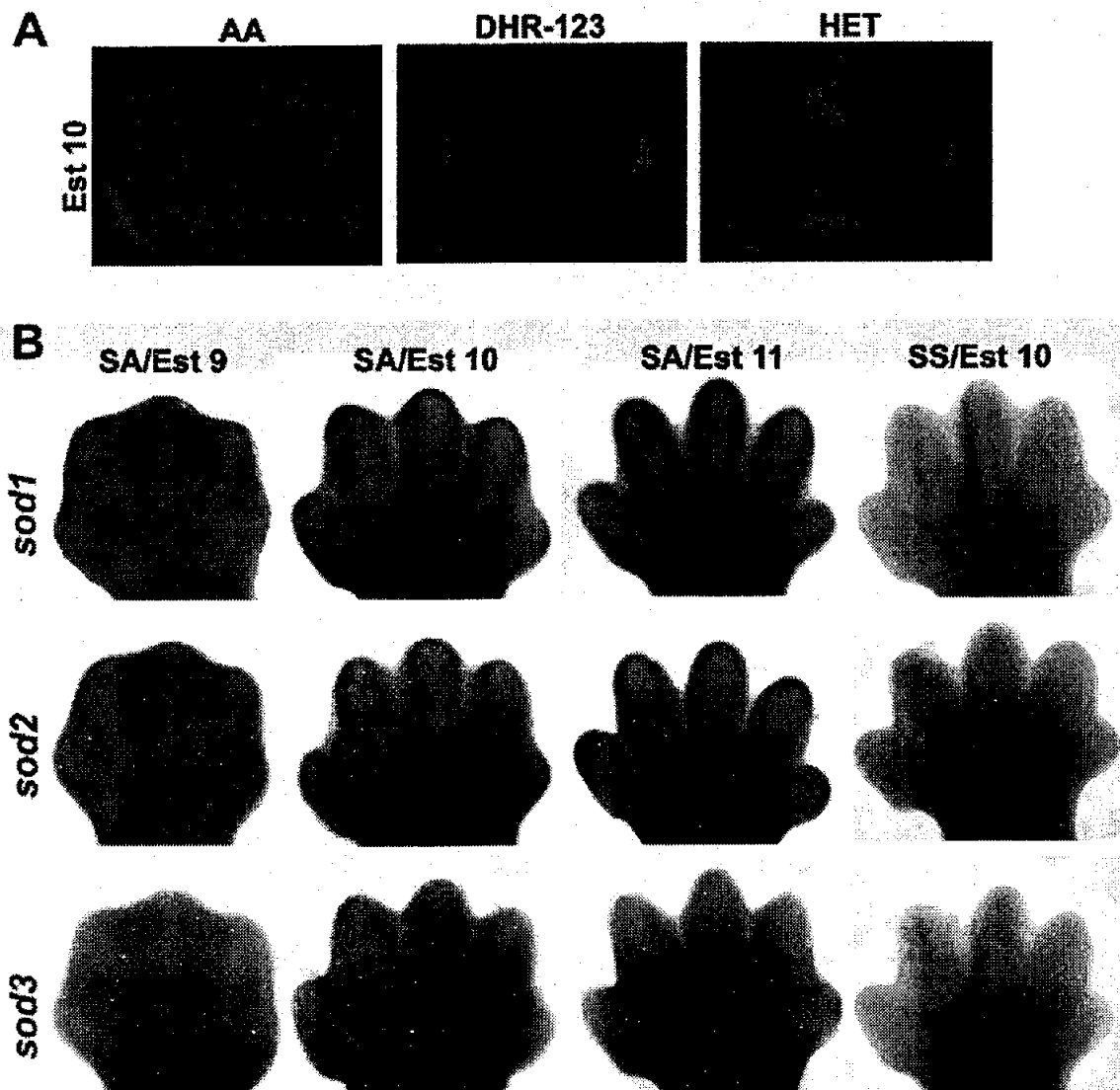


Fig 16. Muerte celular, estrés oxidativo y expresión de enzimas antioxidantes en las extremidades durante el desarrollo del ratón. **A:** Se puede observar la coincidencia entre la muerte celular -evaluada con anaranjado de acridina (AA)- y el estrés oxidativo -evaluada tanto por la dihidrorodamina 123 (DHR-123) como por el hidroetidio (HET)- en las regiones interdigitales de las extremidades anteriores embrionarias en el estadio 10 en E13. **B:** Se muestra la expresión del mRNA de distintas enzimas antioxidantes como la sod1, sod2 y sod3, durante distintas etapas del desarrollo de las extremidades. Se puede observar que la expresión de cada mRNA es distintivo en cada una de las etapas analizadas y en la etapa que corresponde a la muerte las tres *sods* se excluyen de la región de muerte. SA, sonda antisentido; SS, sonda sentido; Est, estadio.

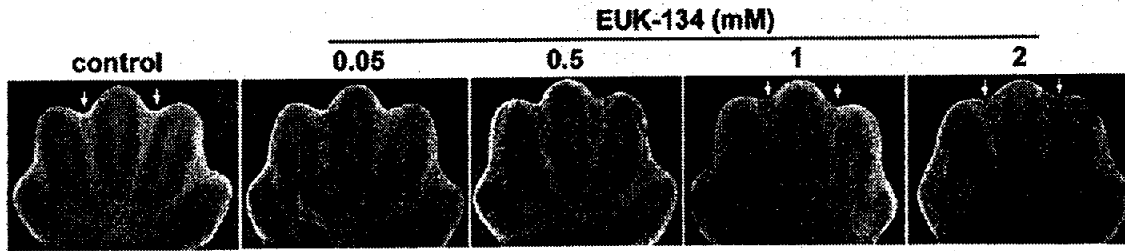


Fig 17. Efecto del antioxidante EUK-134 en la regresión interdigital. Extremidades anteriores en E13 estadio 9 se cultivaron por 8 horas en presencia del EUK-134 en distintas concentraciones. Se analizó la muerte celular con la tinción vital AA y se tomaron imágenes confocales de cada condición. Se puede observar que el antioxidante retarda la regresión interdigital

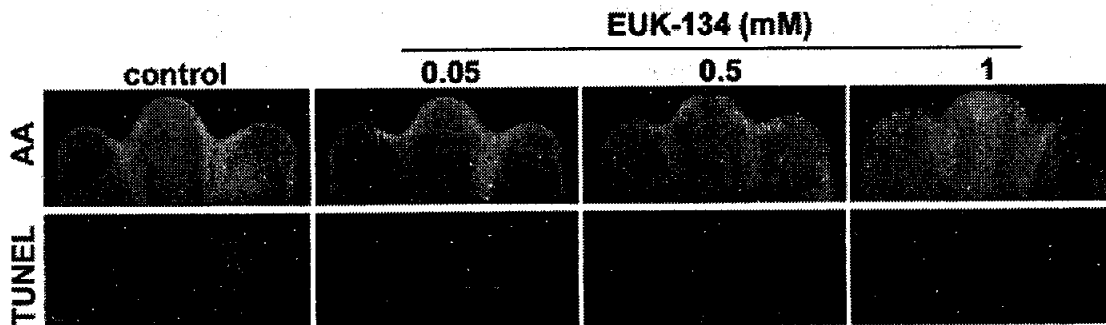


Fig 18. Efecto del antioxidante EUK-134 en la muerte celular interdigital. Se evaluó la muerte celular tanto por la tinción con anarajado de acridina (AA) en pieza completa como con TUNEL en secciones de extremidades anteriores cultivadas por 8 horas en las condiciones indicadas. Se observa en la tinción con AA que no hay una disminución obvia en la muerte celular interdigital aunque es muy claro el efecto en la regresión interdigital. Cuando se evalúa por TUNEL en las secciones transversales de las extremidades, hay una ligera disminución en el número de células muriendo en la región interdigital. También se puede observar que el grosor del tejido es mayor en las extremidades tratadas con la dosis mas alta del antioxidante.

VII. DISCUSION

El objetivo de la presente investigación fue analizar el papel de las ERO como señales inductoras de muerte celular durante el desarrollo del sistema nervioso central. Los resultados obtenidos muestran que hay una correlación en espacio y tiempo entre la muerte celular y los niveles elevados de ERO en las motoneuronas durante el desarrollo de la médula espinal. Además hay una mayor sobrevivencia de motoneuronas al ser cultivadas en presencia del antioxidante EUK-134. Este efecto es aún mayor que el que se obtiene al inhibir a las caspasas con el Z-VAD-FMK, lo cual sugiere, por un lado, que las ERO son señales que inducen la muerte de las motoneuronas y, por otro, que otros tipos de muerte celular independiente de caspasas están ocurriendo en esta población. Finalmente proponemos que las ERO participan en la activación de diferentes formas de muerte celular durante el desarrollo embrionario.

Muerte celular y estrés oxidativo en el SN central

Los fenómenos celulares como la proliferación y la diferenciación son fundamentales durante la morfogénesis del sistema nervioso central. De manera paradójica, la muerte celular juega también un papel central en la ontogenia del sistema nervioso. En 1991, Oppenheim resaltó la importancia de la muerte celular en el desarrollo del sistema nervioso central de distintos organismos y presentó un panorama general de algunas regiones en las que este fenómeno ocurre [44]. Así, diversos tipos de neuronas tales como motoneuronas, neuronas sensoriales, neuronas autonómicas, entre otras sufren muerte celular durante períodos tempranos del desarrollo embrionario; en los últimos años, además, se ha reportado la muerte entre las células gliales como los oligodendrocitos, las células de Schwann y los astrocitos (por [45] ver [50]). Tradicionalmente el análisis de la muerte celular durante el desarrollo se ha hecho sobre secciones de tejido, sin embargo en estas condiciones es difícil visualizar patrones de muerte celular. Actualmente y

Henderson (1999) reportaron el primer estudio comparativo y sistemático de los patrones de MCP en el desarrollo de la médula espinal del pollo, la rata y el ratón, donde se muestra, a través de la técnica de TUNEL en pieza completa, que la muerte en esta región sigue un patrón antero-posterior y medio lateral [51]. Los resultados obtenidos en la presente investigación muestran el mismo patrón de muerte celular en la médula espinal en desarrollo, pero utilizando el colorante AA en vez de la técnica de TUNEL. El uso de la tinción con AA para detectar muerte celular resulta muy conveniente ya que es una técnica rápida comparada con el TUNEL y además parece detectar distintos tipos de muerte celular [124, 136, 137]. En el cerebro en desarrollo, a pesar de conocerse que en diferentes regiones ocurre muerte celular, no se tiene un mapa completo de muerte celular. La generación de mapas de muerte celular resultaría útil para la evaluación de ratones con pérdida o ganancia de función en genes que afecten la muerte celular en el SNC. El análisis de la muerte celular usando la tinción con AA en el cerebro en desarrollo, nos llevó a la generación de un mapa de muerte celular que muestra a *grosso modo* que hay muerte celular en las vesículas cerebrales en todos los estadios del desarrollo analizados (E11-E15). Algunas de las regiones en las que se detectó muerte celular tales como la corteza y la *lamina terminalis* del telencéfalo, así como el mielencéfalo habían sido reportadas previamente [39]. Además, tanto en el diencefalo como en el mesencefalo hay regiones con MCP cuya identidad no fue determinada en este estudio. La tinción con AA en pieza completa no resultó conveniente para analizar la MCP en estadios avanzados del cerebro ya que el grosor del tejido aumenta, lo que dificulta la visualización de la MCP en las partes más internas del tejido.

La proporción de MCP que ocurre en el sistema nervioso se ha estimado entre un 20 y un 90% dependiendo de la población analizada [44, 50]. En el caso del telencéfalo, se ha reportado que, en la región de la corteza, alrededor de un 75% de células mueren cerca de las regiones

ventriculares [46]. Nuestros resultados, a pesar de no ser cuantitativos, no muestran esta proporción de muerte en la corteza y están en concordancia con otros estudios en los que sólo reportan un 5% de muerte celular en esta región ([138]. La muerte celular en las regiones proliferativas de la corteza y en la lamina terminalis del telencéfalo – estructura importante en la morfogénesis del SN ya que la muerte en esta región separa a los dos hemisferios cerebrales- han sido asociadas a la activación de las caspasas, ya que en el mutante de la caspasa-9 hay menos MCP en ambas regiones, produciendo malformaciones cerebrales [39]. En general, nuestros resultados confirman que la muerte celular ocurre en escala masiva en el SNC y que es un proceso dinámico tanto espacial como temporal, por lo que este fenómeno degenerativo parece jugar un papel crítico en la construcción del sistema nervioso.

La dinámica de muerte celular en la médula espinal en desarrollo ha sido bien descrita, en particular la que ocurre en la población de motoneuronas. También nuestros resultados corroboraron la dinámica de muerte celular en la población de motoneuronas, por lo que la médula espinal resultó un buen modelo para el estudio de las moléculas involucradas en desencadenar la MCP en el desarrollo del SNC.

Las ERO como inductoras de la muerte de las motoneuronas.

Como ya se ha mencionado anteriormente, distintas evidencias sugieren que el estado redox de la célula tiene un papel relevante en distintas formas de muerte celular: a) se han observado incrementos en las ERO previos a la presencia de las características típicas de muerte celular [104]; b) el uso de antioxidantes previene la muerte celular [139, 140] y c) la sobre-expresión de las enzimas antioxidantes previene a las células de la muerte en modelos de enfermedades neurodegenerativas o isquemia [141]. Muchos estudios previos han usado cultivos de células adultas o animales bajo condiciones patológicas para mostrar la relación de las ERO con la MCP, sin embargo pocos reportes han centrado su

atención en el desarrollo embrionario. Salas-Vidal y col (1998) reportaron una correlación positiva entre los niveles de ERO y muerte celular masiva durante el desarrollo de las extremidades, el paladar, el esternón, la vesícula ótica y el ojo. Además, mostraron que la muerte en los interdígitos es prevenida por la presencia de antioxidantes [124]. En cuanto a la participación de las ERO en la muerte celular en el SNC en desarrollo, solo se tiene evidencia de que la inyección del antioxidante N-acetilcisteína a embriones de pollo incrementa la sobrevivencia de las motoneuronas braquiales de la médula espinal [133].

En el presente estudio decidimos investigar si las ERO participan en la muerte de las motoneuronas durante el desarrollo de la médula espinal. Usando la DHR-123, una tinción sensible al estado redox, encontramos una correlación espacio-temporal positiva entre las regiones de muerte celular y las áreas de ERO elevadas en la médula espinal. También encontramos una correlación positiva entre las áreas de muerte celular y aquellas que expresan a la *Sod2*, *Cas1* y *Gpx4*. En particular, la expresión de la *Sod2* es muy similar al patrón de muerte y estrés oxidativo. En el cerebro en desarrollo, también hay una correlación positiva en algunas áreas de muerte celular (regiones proliferativas de la corteza) y la expresión de la *Cas-1* (Fig 9 y 11), aunque en este caso no se determinó la presencia de ERO debido a las restricciones metodológicas de la preparación en pieza completa. Es interesante mencionar que las enzimas antioxidantes son reguladas positivamente en condiciones de estrés oxidativo [142] y que la expresión más abundante de *Cas-1* y *Sod1*, en el cerebro adulto está en las regiones resistentes a la neurodegeneración inducida por isquemia [143, 144].

La *Sod2* y *Cas1* son regulados por los genes *Foxo*, los cuales pueden ser blancos de detectores de estrés incluyendo aquellos de estrés oxidativo [145]. Por otro lado, algunos factores de crecimiento pueden promover sobrevivencia por activar la expresión de enzimas

antioxidantes. Además los factores de crecimiento BDNF y GDNF, los cuales inducen la sobrevivencia de las motoneuronas, inducen incrementos en la actividad de la catalasa, las glutatión peroxidasas y la Cu-Zn superóxido dismutasa [146, 147]. En cualquier caso, si la expresión de las enzimas antioxidantes es estimulada por el estrés oxidativo que promueve la muerte celular o por los factores de crecimiento que promueven la sobrevivencia, los niveles elevados en la expresión de genes que codifican a las enzimas antioxidantes son indicadores de una condición de estrés oxidativo. Sin embargo, la correlación descrita arriba no distingue entre la participación de las ERO como una causa o como una consecuencia de la muerte celular. Por lo tanto, para investigar en que nivel de la cascada de muerte participan las ERO, evaluamos el efecto de un antioxidante en la muerte celular de las motoneuronas utilizando explantes de médula espinal.

Durante el desarrollo de la médula espinal, las motoneuronas proyectan sus axones a sus blancos para establecer conexiones sinápticas, pero aquellas que no establecen contacto con su blanco mueren. En los explantes de médula espinal utilizados en el presente estudio, se pierde la conexión con todos los blancos, por lo que mas motoneuronas mueren en el cultivo que durante el desarrollo *in vivo* después de un período similar de desarrollo en cultivo. Esta situación reproduce lo que pasa en una situación *in vivo* cuando los blancos son removidos [133]. El Gdnf es un factor de crecimiento que previene a las motoneuronas de morir cuando son privadas de sus blancos [133, 148]. El Gdnf suplementado a los cultivos de médula usados en el presente estudio, rescata alrededor de un 30% de motoneuronas. Este resultado no es sorprendente ya que la sobrevivencia de las motoneuronas depende de distintos factores de crecimiento [149], por lo que no se espera una recuperación del 100%. Por lo tanto, el cultivo de médula espinal responde de manera similar a lo que sucede en el animal intacto,

validando su uso como modelo para estudiar el fenómeno de muerte celular en las motoneuronas.

El EUK-134 es un compuesto sintético con una actividad combinada de superóxido dismutasa y catalasa por lo que es capaz de degradar al anión superóxido y al peróxido de hidrógeno [129]. En modelos de esclerosis amiotrófica lateral y apoplejía, el EUK-134 es capaz de prevenir la muerte neuronal [131] e incrementar el tiempo de vida de ratones mutantes en la *Sod2* [130]. Cuando el EUK-134 es añadido a los cultivos de médula espinal, pudimos observar un decremento en el número de células bajo estrés oxidativo, así como disminución en la muerte celular (detectada tanto por la tinción con AA o por TUNEL). Hemos descartado la posibilidad de que el aumento en los niveles de ERO sea una consecuencia de la muerte celular ya que en presencia del Z-VAD-FMK la muerte celular disminuye sin un decremento en el estrés oxidativo. En concordancia con la reducción en la muerte celular, el número de motoneuronas se incrementa en presencia del EUK-134 o el Z-VAD-FMK en el medio de cultivo. Debido a que la generación de motoneuronas *in vivo* termina entre el E11 y E12 [150] no se esperaba que la diferenciación celular durante el cultivo contribuyera a incrementar la población neuronal. De acuerdo a esta predicción, no se observaron células marcadas en la región de motoneuronas después del marcaje con BrdU tanto *in vivo* como *in vitro*. Además el EUK-134 no tiene ningún efecto sobre el número de células proliferando. Por lo tanto, la explicación más probable es que el EUK-134 al disminuir los niveles de ERO previene la muerte celular. Otros datos que apoyan esta hipótesis es el efecto del EUK-134 tanto en cultivos de extremidades anteriores como en las inyecciones intra-amnióticas, en los que hay un retraso en la regresión interdigital, además de la disminución de la muerte celular evaluada tanto por AA como por TUNEL. Estos datos apoyan la idea que las ERO participan en la activación de la muerte de

las motoneuronas durante el desarrollo y muy posiblemente en otras regiones embrionarias.

Las motoneuronas mueren por mecanismos dependientes e independientes de caspasas que son regulados por las ERO

De acuerdo a criterios morfológicos, la muerte celular que ocurre en el desarrollo se ha clasificado en tres tipos [11]:

1. La muerte celular tipo I, que presenta las características típicas de apoptosis (como la condensación de la cromatina y el encogimiento celular) y el cual es bien conocido que es regulado por miembros de la familia de las caspasas y de Bcl-2 [10]. Además se ha reportado muerte apoptótica independiente de caspasas [21].
2. El tipo II o autofagia, el cual se caracteriza por la presencia de muchas vacuolas fagolisosomales sin cambios aparentes en el núcleo; donde el complejo PI3K-III cinasa es un regulador positivo de la autofagia, mientras que la mTOR cinasa es un regulador negativo [10, 29].
3. El tipo III es una degeneración vacuolada no-lisosomal, la cual ha sido menos caracterizada.

Los datos presentados aquí, apoyan la participación de al menos dos mecanismos de muerte celular (el tipo I y II) de las motoneuronas durante el desarrollo de la médula espinal. Generalmente, se ha asumido que el principal mecanismo de muerte es el dependiente de las caspasas y es aceptado que el último paso en la cascada de activación de las caspasas es la degradación del DNA (ver Fig 10 del artículo anexo). Este proceso de degradación del DNA es detectado frecuentemente en geles de agarosa o por la técnica de TUNEL en el tejido *in situ*. Usando inhibidores de caspasas específicos, hemos mostrado la participación de las caspasas en la muerte de las motoneuronas (evidenciado por el número de motoneuronas que sobreviven). La degradación del DNA en la región de las motoneuronas parece involucrar también a las caspasas ya que el inhibidor pan-caspasa Z-VAD-FMK produce una disminución

significativa en las células TUNEL positivas. Sin embargo, ni el inhibidor específico de la caspasa 8 ni el de la caspasa 9 producen una reducción significativa en el número de células TUNEL (+), a pesar de que los tres inhibidores de caspasas producen un incremento similar en el número de motoneuronas sobrevivientes. Por lo tanto la caspasa-8 y -9 parecen actuar en la misma vía de muerte, pero ninguna de las dos parece afectar directamente a moléculas involucradas en la degradación del DNA (ver Fig 10 del artículo anexo). La marcada reducción en las células TUNEL (+) respecto al incremento en las motoneuronas sobrevivientes con el inhibidor general de caspasas podría indicar que la degradación del DNA puede ser prevenida aún cuando las motoneuronas han muerto (previo al cultivo de la médula espinal). Además, la fragmentación del DNA parece estar separada de otros aspectos fenotípicos de la apoptosis, por ejemplo cuando células con ausencia de actividad de la DNAsa CAD son inducidas a morir, estas no muestran fragmentación del DNA pero si manifiestan otras características de apoptosis tales como el encogimiento del cuerpo celular y la exposición de la fosfatidilserina (ver [25]). También en *C. elegans* la pérdida de función de la nucleasa *nuc 1* muestra que la fragmentación del DNA puede ser un fenómeno cascada debajo de la activación de las caspasas que es indispensable para la muerte celular (ver [25]). De manera alternativa, el bloqueo de caspasas puede forzar a las motoneuronas a cambiar a una vía de muerte que es independiente de caspasas [151, 152].

Es interesante recalcar que el EUK-134 causa un incremento mayor en el número de motoneuronas que los inhibidores de las caspasas (143 vs 72%). Estos datos sugieren que un tipo de muerte celular independiente de caspasas ocurre en una subpoblación de motoneuronas, la cual no es detectada por la técnica de TUNEL (más del 50%). Oppenheim y colaboradores han reportado que las motoneuronas mueren en ratones nulos para los genes que codifican a la caspasa-3 y -9 [152], así como en médulas espinales de pollo tratadas con inhibidores

de caspasas [153]. La tinción con AA puede detectar muerte celular apoptótica o al menos coincide con regiones donde hay muerte celular apoptótica en abundancia [124, 136]. De hecho, los patrones de muerte celular obtenidos con la tinción con AA en la médula espinal son muy similares a los patrones determinados por TUNEL en muestras de pieza completa [51]. El EUK-134 disminuye casi por completo la tinción con AA, mientras que el Z-VAD-FMK solo produce una reducción parcial. En contraste, se observa el efecto inverso cuando la muerte celular fue detectada por TUNEL. Nosotros sugerimos que la AA es capaz de detectar además de células apoptóticas, células que mueren por un mecanismo no-apoptótico o al menos por un mecanismo que no correlaciona con la degradación del DNA. Se ha reportado que la AA tiñe células autofágicas al detectar lisosomas con un pH ácido [137], por lo tanto la autofagia puede ser uno de los mecanismos de muerte celular regulado por las ERO que ocurre en la médula espinal en desarrollo y que no puede ser detectado por la técnica de TUNEL. En apoyo a la contribución de la autofagia en la muerte de las motoneuronas, la inhibición de la PI3K-III incrementa el número de motoneuronas sin afectar de manera significativa el número de células TUNEL (+). Se ha documentado que las muertes tipo 2 y 3 ocurren en la médula espinal del pollo [154] y de la rana [11], así como en otras regiones del desarrollo del sistema nervioso central como el núcleo del istmo-óptico [11]. La microscopía electrónica se ha considerado la prueba definitiva para identificar células autofágicas; sin embargo, una desventaja de esta técnica es la dificultad de llevar a cabo un análisis cuantitativo. Se ha descrito recientemente que la distribución de la molécula LC3 (una cadena ligera asociada a microtúbulos) cambia durante la autofagia, permitiendo la detección de este proceso *in vivo* [155]. Por lo tanto LC3 puede ser un marcador útil para estimar el número de motoneuronas autofágicas durante el desarrollo. Otras metodologías incluyen el uso del Lysotracker, un colorante vital que es incorporado a células con alta actividad lisosomal,

sin embargo esta tinción puede detectar tanto autofagia (lisosomas propios) como heterofagia (macrófagos engullendo restos celulares).

Tomando en cuenta todos los resultados expuestos, concluimos que las ERO están involucradas en el control de diferentes formas de la muerte motoneuronal (Fig 10, artículo anexo). Dos de estas formas, probablemente serían, la apoptosis típica que involucra a las caspasas; en la cuál las células con este tipo de muerte son visualizadas por detectar la degradación del DNA; y una apoptosis atípica que también involucra a las caspasas, o por lo menos a la caspasa-8 y caspasa-9, pero en la que las células muertas no se pueden visualizar detectando degradación del DNA. Los mecanismos que inician estas dos últimas formas de muerte podrían involucrar a la vía extrínseca de muerte, la cual es comúnmente mediada por receptores que contienen dominios intracelulares de muerte. Recientemente se reportó la participación de la caspasa-8 y de Fas en la muerte de las motoneuronas [121, 156]. Además se ha demostrado que las ERO pueden activar a la caspasa-8 [157, 158] y junto con la caspasa-9 inducir muerte celular no-apoptótica [157, 158]. Otros experimentos son necesarios para establecer si la caspasa-8 en las motoneuronas está siendo regulada por las ERO, además de esclarecer el tipo de muerte celular asociada a la activación de esta. La tercera forma de muerte –muy posiblemente autofagia– no involucra a las caspasas y además no puede ser visualizada por métodos que detectan la degradación de DNA [29]. En cualquier proceso de degeneración celular, la degradación del DNA es implícita, sin embargo existen diferencias substanciales en como y cuando ocurre en cada tipo de degeneración celular.

Se ha sugerido que la apoptosis es un tipo de degeneración celular rápida en la cual el DNA puede comenzar a ser degradado tan rápido como la señal inicial de muerte es recibida. En contraste, la autofagia (u otro mecanismo no-apoptótico) es un proceso degenerativo lento en el cual el DNA empieza a ser degradado en estadios tardíos. Esta

conclusión implica que un número importante de motoneuronas mueren en un tiempo dado durante el proceso de degeneración no pueden ser detectadas al estimar la degradación del DNA (ej., por la técnica de TUNEL). Por lo que no es posible estimar la contribución de cada tipo de muerte celular de los que hemos mencionado anteriormente, debido a que la presencia de inhibidores de caspasas puede desviar la vía de muerte a mecanismos independientes de caspasas (ej., autofagia; [151, 152, 159]). No obstante, podemos estimar que el EUK-134 rescata cerca de un 80% de motoneuronas (44.6 motoneuronas/hemisección antes del cultivo comparado con 34 motoneuronas/hemisección después del cultivo con EUK-134), esto significa que alrededor de un 20% de motoneuronas no son protegidas por el antioxidante en el estadio del desarrollo usado en la presente investigación. Esto podría deberse a que este porcentaje de neuronas ya se ha comprometido a morir, pues su proceso de muerte se inicio antes de iniciar el cultivo; o bien porque la permeabilidad del compuesto no sea del 100%. Además se debe considerar que podría existir un porcentaje de neuronas cuya muerte sea dependiente de caspasas pero independiente de niveles elevados de ERO.

Los tipos de muerte celular dependiente e independiente de caspasas pueden estar ligados al mismo proceso de activación de muerte. Tanto células apoptóticas y no-apoptóticas son observadas comúnmente en regiones donde hay muerte celular abundante [11]. Además se ha observado en distintos sistemas que la reducción en la actividad de las caspasas lleva a la inducción de un tipo de muerte celular no-apoptótica [151, 152]. En ciertas condiciones, una señal de muerte puede activar la vía rápida de muerte celular por apoptosis dependiente de caspasas, mientras que en otras se requerirían varias señales débiles para iniciar la degradación de la célula. Las células que reciben señales suficientes pueden alcanzar el umbral de activación de las caspasas, enzimas necesarias para iniciar la apoptosis, mientras que aquellas que no alcanzan este umbral pueden morir por mecanismos alternativos lentos.

Las ERO parecen ser señales tempranas que regulan el tipo de muerte dependiente y el independiente de caspasas en las motoneuronas. La incapacidad del EUK-134 para reducir el número de células TUNEL (+) a los niveles del Z-VAD-FMK puede indicar que el antioxidante no fue capaz de proteger en estadios tardíos del proceso apoptótico, apoyando la idea de que las ERO son señales iniciales previas a la activación de las caspasas y por lo tanto a la degradación del DNA.

Las ERO: disparadoras cosmopolitas de muerte en el desarrollo del ratón

Otros datos a favor de que existan mecanismos de muerte celular alternativos a la apoptosis son los resultados obtenidos de la población de interneuronas dorsales de la médula espinal. En el desarrollo normal de la médula encontramos una reducción del 35% aproximadamente en la población de interneuronas D2 entre el período E13 y E13.5 (dato no mostrado). Después de 12 h en cultivo hay una disminución en el número de interneuronas en la misma proporción que *in vivo*. Este dato sugiere que la sobrevivencia de esta población no depende de blancos externos a la médula espinal. De manera sorprendente no detectamos células TUNEL positivas en esta región tanto *in vivo* como en las medulas cultivadas lo cual implica que hay un tipo de muerte sin degradación de DNA que puede ocurrir en esta población. Como con las motoneuronas, esta posible muerte celular no se ve afectada por el Z-VAD-FMK indicando que este tipo de muerte también es independiente de caspasas pero que es reducida [resultado inferido por el incremento en células Islet (+)] en presencia del EUK-134. Además no hubo ningún efecto del EUK-134 en la proliferación o la diferenciación de las células de la región de las interneuronas D2. En apoyo a nuestras observaciones, en el ratón con ausencia de función en $p75^{NTR}$, hay disminución en la muerte celular de la médula espinal. Como resultado más células Islet (+) están presentes en la región de interneuronas y en la de motoneuronas en los

mutantes de p75 y NGF cuando se comparan con el animal silvestre [160]. Estos datos sugieren que una cascada de señalización común NGF/p75 mediada por ERO, podría activar un mecanismo de muerte celular independiente de caspasas en las motoneuronas y las interneuronas D2. Sin embargo, se requiere de una investigación más detallada de las causas de la muerte celular de las interneuronas D2.

Por otro lado, el EUK-134 tiene efectos en la muerte celular que ocurre en las extremidades en desarrollo. Como se ha mencionado anteriormente, Salas-Vidal et al mostraron la correlación entre la muerte celular y la presencia de niveles elevados de ERO, en las regiones interdigitales de las extremidades en desarrollo [124]. Con la finalidad de establecer si los mecanismos antioxidantes son regulados en las etapas de muerte celular interdigital, determinamos la expresión de algunas enzimas antioxidantes a través de hibridación *in situ* durante los períodos de muerte interdigital. En general, la expresión de la Sod1, Sod2, Sod3 y Cas-1 (dato no mostrado) se encuentra justo en el límite de las regiones interdigitales, así como en la punta de los dedos excluyendo el epitelio más distal. La única excepción es la Sod3 la cual solo está en las regiones laterales de los dígitos pero no en las puntas. Esto podría indicar que aquellas células destinadas a morir no expresan a las enzimas antioxidantes mientras aquellas que sobreviven incrementan su expresión. Un dato interesante es que en presencia del antioxidante EUK-134 hay disminución en la regresión interdigital y disminución en la muerte celular de las células interdigitales. Esta última observación apoya la idea que las ERO inducen la muerte celular de los interdígitos y que los mecanismos antioxidantes son importantes en regular la presencia de las ERO en regiones en las que no hay muerte celular. Las preguntas que aún quedan abiertas son: ¿cuál es la fuente del incremento en las ERO en los interdígitos? y ¿cuáles son las moléculas blanco de las ERO que llevan a la fase de ejecución de la muerte?

El retraso de la regresión interdigital por el antioxidante EUK-134 fue corroborado en las inyecciones intra-amnióticas. En estos experimentos además observamos que en la región de la cabeza hay inflamación tanto en la región del cerebro así como una malformación de la nariz. Estos defectos han sido observados en los algunos mutantes en las caspasas y en el mutante de *Apaf* [38-40, 161]. Se requiere de la estandarización adecuada de la inyección intra-amniótica para analizar de manera histológica el efecto del antioxidante en el desarrollo cerebral e incluso también en la médula. Muy posiblemente las ERO juegan un papel importante como mediadoras de MCP en todo el organismo en desarrollo.

¿Cómo las ERO regulan la muerte de las motoneuronas?

La muerte celular puede ser regulada tanto por factores que promueven la sobrevivencia o que inducen la muerte de las células. Generalmente se considera que las cascadas de señalización que inducen la sobrevivencia se originan de fuentes externas, mientras que los activadores de muerte celular pueden originarse desde fuentes extrínsecas o intrínsecas, y en algunos caso la muerte celular es activada espontáneamente en la ausencia de factores de sobrevivencia. Los factores de crecimiento o neurotrofinas llevan a la sobrevivencia de las neuronas tanto *in vivo* como *in vitro*. Además algunos de estos factores de crecimiento pueden proteger a las neuronas contra el estrés oxidativo [147, 162, 163]. En cultivos neuronales la ausencia de Ngf induce la expresión y la actividad de la NADPH oxidasa [164] y la oxido nítrico sintetasa neuronal (ONSn) [139], fuente del anión superóxido y del óxido nítrico respectivamente. Por otro lado, el Ngf y el Gdnf rescatan a las neuronas de morir aparentemente al inducir incrementos en los niveles de glutatión y/o por inducir la actividad de enzimas antioxidantes, tales como la catalasa, la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa [110,

147]. Por otro lado se ha reportado que existen factores que promueven la muerte celular. En hepatocitos de rata, el factor Tgf β induce apoptosis la cual es acompañada de la generación de ERO [165]; la muerte celular inducida por la ausencia de factores de crecimiento o por la presencia de Tnf α está acompañada por un incremento en los niveles del anión superóxido e inhibida por un número de antioxidantes y atrapadores de ERO [166].

Durante los estadios utilizados en la presente investigación, las motoneuronas están haciendo contacto con sus células blanco, en esta etapa ellas requieren de factores de crecimiento tales como Bdnf, Gdnf, Nt3 y otros para sobrevivir [149, 167, 168]. Tradicionalmente, la muerte celular se visualizaba como un proceso pasivo el cual ocurría solo por la ausencia de factores de sobrevivencia. En los últimos años, se ha considerado que los "factores de muerte" tales como el Ngf/p75, Fas y Tgf β pueden tener un rol activo en la muerte de las neuronas [156, 168-171]. En particular, Fas ha sido involucrado en la muerte de las motoneuronas tanto *in vivo* como *in vitro* [121, 156]. Fas parece activar la muerte de las motoneuronas al incrementar los niveles de NOSn y la generación de peroxinitrito, y la presencia de MnTBAP, un atrapador de ERO, puede rescatar a las motoneuronas de la muerte inducida por Fas [121]. Recientemente se ha mostrado que la muerte inducida por TNF se da a través de la activación de las MAPK, vía incrementos en los niveles de ERO, donde la fuente de estas parece ser la mitocondria [172]. Es muy probable que los incrementos en los niveles de las ERO observados en nuestros cultivos puedan ser inducidos por la presencia de "factores de muerte". Todas estas evidencias sugieren que durante el desarrollo las motoneuronas son expuestas a estrés oxidativo posiblemente a través de la acción de "factores de muerte" específicos producidos en la medula espinal. En contraste, los factores de crecimiento producidos por las

células blanco podrían prevenir la muerte de las motoneuronas al inducir la expresión de mecanismos antioxidantes.

Las ERO pueden actuar de manera autónoma para controlar la muerte de las motoneuronas de tal manera que tanto la ausencia de factores de crecimiento incrementa los niveles de ERO (ej: incrementando la actividad de la NADPH oxidasa), o bien que su presencia disminuya los niveles de ERO (ej: incrementando la actividad de las enzimas antioxidantes). Otra alternativa es que las ERO sean producidas por células vecinas de origen no neuronal que actúen de manera directa o indirecta sobre las motoneuronas. Recientemente se ha reportado el papel de la microglía como una fuente de anión superóxido y como inductora de la muerte natural de las neuronas de Purkinje en el cerebelo en desarrollo [173]. En el sistema nervioso, la microglía es probablemente el tipo celular más importante para engullir a las células muertas; de tal manera que al igual que los macrófagos la microglía parece llevar a cabo una explosión respiratoria, la cual lleva a un incremento en la producción de las ERO durante la fagocitosis. En el gusano *Caenorhabditis elegans*, el engullimiento es una etapa importante para la activación de la muerte celular, el cual se evidencia en mutantes con baja activación de las caspasas [174]. Por lo tanto, es posible que células no neuronales puedan ser la fuente de las ERO involucradas en la muerte de las motoneuronas. Por ejemplo, se ha mostrado que la degeneración neuronal en los mutantes de la Sod1 asociada a la esclerosis amiotrófica lateral se lleva a cabo de manera no autónoma [175], por lo que la muerte de las motoneuronas tanto natural como patológica puede ser mediada por un mecanismo similar.

En conclusión, nuestros datos sugieren que distintas formas de muerte celular están presentes de manera simultánea durante el desarrollo de la medula espinal y cuyo punto en común es la elevación de las ERO en estadios tempranos de su activación. Es necesario resaltar

que la muerte no-apoptótica independiente de caspasas parece ser el mecanismo principal para la degeneración neuronal observada en muchas enfermedades que afectan a los humanos. Además, el estrés oxidativo es considerado un proceso relevante en la degeneración asociada a estas enfermedades, por lo que un mecanismo común puede ser usado tanto en la muerte neuronal natural como en la patológica. En suma, definir como las ERO regulan la muerte celular durante el desarrollo normal resulta importante para comprender el mecanismo que lleva a la neurodegeneración en condiciones patológicas, de tal manera que se puedan plantear procedimientos terapéuticos eficientes.

En conjunto los resultados obtenidos en el sistema nervioso central y en las extremidades apoyan la hipótesis de que los incrementos en las ERO conducen a la muerte celular, aparentemente como un mecanismo general del desarrollo embrionario para regular la muerte celular. Sin embargo cada sistema tiene sus particularidades como en el caso de la medula espinal en las que las células cuentan con mecanismos de respaldo para garantizar la muerte de las motoneuronas.

VIII. CONCLUSIONES

- 1.- Los patrones de muerte celular son dinámicos durante el desarrollo del sistema nervioso. En particular, hemos confirmado que el patrón de muerte en la población de motoneuronas es antero-posterior y ventro-lateral.
- 2.- Hay una correlación entre los niveles elevados de ERO, la expresión de algunas enzimas antioxidantes y la muerte de las motoneuronas durante el desarrollo de la médula espinal. Esto sugiere que las ERO son las señales que desencadenan el proceso de muerte celular.
- 3.- El GDNF induce la sobrevivencia de la población de motoneuronas en la médula espinal en cultivo, tal como lo hace de manera natural durante el desarrollo. Además la muerte celular que ocurre en las médulas espinales en cultivo es similar a su contraparte *in vivo*. Por lo que el explante de médula espinal resulta un buen modelo para estudiar los fenómenos celulares como la muerte.
- 4.- Las células que mueren en la etapa que comprendió el estudio en la médula espinal son la población de motoneuronas, la cual puede ser identificada por la formación de columnas en el eje antero-posterior, característica de esta población.
- 5.- La presencia del antioxidante EUK-134 en cultivos de médula espinal, reduce el nivel de las ERO, disminuye la muerte celular -evaluada tanto por TUNEL como por AA-, e incrementa el número de motoneuronas. Por otro lado, el EUK-134 retarda la regresión interdigital y disminuye la muerte celular en las extremidades en desarrollo tanto en cultivo como en el embrión. Además, la inyección intra-amniótica del EUK-134 da como resultado defectos en la morfología de la cabeza, probablemente asociados a la disminución de la muerte celular, sin embargo esta propuesta debe ser abordada con más detalle en un estudio posterior. Estos resultados indican que las ERO pueden jugar un papel como disparadoras de la muerte celular durante el desarrollo embrionario.

6.- El Z-VAD-FMK disminuye el número de células TUNEL (+) pero esta disminución no se refleja en el incremento de las motoneuronas. En cambio, el EUK-134 rescata un número mayor motoneuronas en comparación con el Z-VAD-FMK a pesar de que este disminuye casi en su totalidad la presencia de células TUNEL (+), indicativo de la degradación del DNA. Esto sugiere que otra forma distinta a la apoptosis clásica es también prevenida por el antioxidante.

7.- El inhibidor de la PI3K-III cinasa LY294002 incrementa el número de motoneuronas sin tener ningún efecto en la degradación del DNA, esto indica que las motoneuronas pueden morir además por autofagia.

8.- Los inhibidores específicos de la caspasa 8 y 9 promueven la sobrevivencia de un porcentaje de motoneuronas sin tener ningún efecto en la degradación del DNA. Al parecer ambas caspasas convergen en una sola ruta de muerte, la cual parece no estar implicada en la degradación del DNA.

9.- Por lo tanto, el EUK-134 al disminuir las ERO evita la muerte celular que se da por la muerte tipo I y II en las motoneuronas.

10.- Finalmente, los resultados sugieren que distintos tipos de muerte celular están presentes en la médula espinal, en particular en la población de motoneuronas, los cuales parecen tener en común el incremento en los niveles de las ERO como un evento de activación temprano en la cascada.

IX. PERSPECTIVAS

- 1.- Como se ha visto en la médula espinal, la generación de mapas tridimensionales de muerte resulta útil para visualizar patrones de muerte celular que no son evidentes cuando se analizan sobre cortes de tejido (ej, ver regiones en el diencéfalo E14.5). Por lo que sería importante generar mapas tridimensionales de muerte celular y estrés oxidativo durante el desarrollo del cerebro, en rebanadas al vibratomo, teñidas con anaranjado de acridina y dihidrorodamina 123, para posteriormente empalmar las diferentes secciones y generar el mapa tridimensional.
- 2.- Para conocer los mecanismos que están produciendo el incremento en los niveles de ROS, por un lado pueden analizarse los mecanismos productores o bien los mecanismos que las remueven. A este respecto la inhibición de la NADPH oxidasa utilizando el inhibidor DPI podría ser de utilidad para analizar por un lado si hay una disminución del estrés oxidativo utilizando la tinción con el Het y por el otro analizar si hay una disminución de la muerte celular o un aumento en la sobrevivencia, analizados por TUNEL o por inmunofluorescencia contra Islet-1 respectivamente.
- 3.- Para determinar si las enzimas antioxidantes están jugando un papel regulador en la muerte celular sería interesante analizar si en los ratones con pérdida o ganancia de función de los genes de enzimas antioxidantes (como la catalasa, las superóxido dismutasas o las peroxidasas), la muerte celular se altera durante el desarrollo de la médula espinal.
- 4.- El análisis de la expresión de las enzimas antioxidantes a nivel celular resultaría útil para evaluar si existe una coincidencia entre la expresión de las enzimas antioxidantes y la muerte celular o el estrés oxidativo. Para esto es necesario contar con anticuerpos adecuados que detecten en inmunofluorescencia la presencia de las proteínas. En este punto, se han obtenido resultados preliminares, en los que la SOD1 presenta una expresión ubicua en la médula espinal, en cambio la catalasa parece estar restringida a lugares donde hay muerte celular

abundante como es el caso de la región de motoneuronas, así como en los ganglios de la raíz dorsal (datos no mostrados). Sin embargo no se obtuvo ningún resultado en el análisis de la SOD2 muy posiblemente porque el anticuerpo utilizado no fue el adecuado.

5.- Si bien sabemos que las ERO están implicadas en desencadenar MCP, sería interesante ahora comprender que moléculas se encuentran por debajo de ellas. Por ejemplo, se sabe que una molécula regulada por ERO es la cinasa ASK-1 la cual puede mediar la muerte celular de distintos tipos celulares. Existen otros candidatos que pueden ser evaluados como posibles blancos de las ERO que posteriormente desencadenan la muerte de las células.

6.- Para conocer las moléculas de muerte implicadas en la muerte de las motoneuronas tanto en condiciones normales como en aquellas en la que se bloquea otra vía de muerte, sería interesante inhibir de manera específica a las caspasas o la vía autofágica. Otras vías que no requieren a las caspasas como la presencia de Aif podrían también contribuir a la muerte de las neuronas, un análisis de estos componentes resultaría de interés para disectar como es que las motoneuronas mueren.

7.- El estudio de la muerte celular en condiciones fisiológicas resulta importante, por lo que las inyecciones intra-amnióticas serían de utilidad. Se requiere por lo tanto de mejorar la técnica de inyección para posteriormente probar el efecto de diferentes inhibidores en la vía de muerte como se ha sugerido en los párrafos anteriores.

X. ANEXO

XI. BIBLIOGRAFIA

1. Glucksmann, *Cell deaths in normal vertebrate ontogeny*. Biology Reviews, 1951. 26: p. 59-85.
2. Danial, N.N. and S.J. Korsmeyer, *Cell death: critical control points*. Cell, 2004. 116(2): p. 205-19.
3. Guimaraes, C.A., et al., *Alternative programs of cell death in developing retinal tissue*. J Biol Chem, 2003. 278(43): p. 41938-46.
4. Jacobson, M.D., M. Weil, and M.C. Raff, *Programmed cell death in animal development*. Cell, 1997. 88(3): p. 347-54.
5. Abraham, M.C. and S. Shaham, *Death without caspases, caspases without death*. Trends Cell Biol, 2004. 14(4): p. 184-93.
6. Leist, M. and M. Jaattela, *Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms*. 2001. 2(8): p. 589-98.
7. Sanders, E.J. and M.A. Wride, *Programmed cell death in development*. Int Rev Cytol, 1995. 163: p. 105-73.
8. Schweichel, J.U. and H.J. Merker, *The morphology of various types of cell death in prenatal tissues*. Teratology, 1973. 7(3): p. 253-66.
9. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer, 1972. 26(4): p. 239-57.
10. Yuan, J., M. Lipinski, and A. Degtarev, *Diversity in the mechanisms of neuronal cell death*. Neuron, 2003. 40(2): p. 401-13.
11. Clarke, P.G., *Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms*. 1990. 181(3): p. 195-213.
12. Ravagnan, L., T. Roumier, and G. Kroemer, *Mitochondria, the killer organelles and their weapons*. J Cell Physiol, 2002. 192(2): p. 131-7.
13. Sprick, M.R. and H. Walczak, *The interplay between the Bcl-2 family and death receptor-mediated apoptosis*. Biochim Biophys Acta, 2004. 1644(2-3): p. 125-32.
14. Hengartner, M.O., *The biochemistry of apoptosis*. Nature, 2000. 407(6805): p. 770-6.
15. Kroemer, G. and S.J. Martin, *Caspase-independent cell death*. Nat Med, 2005. 11(7): p. 725-30.
16. Chang, H.Y. and X. Yang, *Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases*. Microbiol Mol Biol Rev, 2000. 64(4): p. 821-46.
17. Kuwana, T. and D.D. Newmeyer, *Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis*. Curr Opin Cell Biol, 2003. 15(6): p. 691-9.
18. Ashkenazi, A. and V.M. Dixit, *Death receptors: signaling and modulation*. Science, 1998. 281(5381): p. 1305-8.
19. Hong, S.J., T.M. Dawson, and V.L. Dawson, *Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling*. Trends Pharmacol Sci, 2004. 25(5): p. 259-64.
20. Cande, C., et al., *Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death?* Journal of Cell Science, 2002. 115(Pt 24): p. 4727-34.
21. Cande, C., et al., *Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria*. Biochimie, 2002. 84(2-3): p. 215-22.
22. Susin, S.A., et al., *Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor*. Nature, 1999. 397(6718): p. 441-6.
23. Ferri, K.F., et al., *Apoptosis control in syncytia induced by the HIV type 1-envelope glycoprotein complex: role of mitochondria and caspases*. J Exp Med, 2000. 192(8): p. 1081-92.

24. Loeffler, M., et al., *Dominant cell death induction by extramitochondrially targeted apoptosis-inducing factor*. *Faseb J*, 2001. 15(3): p. 758-67.
25. van Gurp, M., et al., *Mitochondrial intermembrane proteins in cell death*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. 304(3): p. 487-97.
26. Lorenzo, H.K. and S.A. Susin, *Mitochondrial effectors in caspase-independent cell death*. *FEBS Lett*, 2004. 557(1-3): p. 14-20.
27. Parrish, J., et al., *Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in C. elegans*. *Nature*, 2001. 412(6842): p. 90-4.
28. Wang, X., et al., *Mechanisms of AIF-mediated apoptotic DNA degradation in Caenorhabditis elegans*. *Science*, 2002. 298(5598): p. 1587-92.
29. Gozuacik, D. and A. Kimchi, *Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism*. *Oncogene*, 2004. 23(16): p. 2891-906.
30. Larsen, K.E. and D. Sulzer, *Autophagy in neurons: a review*. *Histol Histopathol*, 2002. 17(3): p. 897-908.
31. Meijer, A.J. and P. Codogno, *Regulation and role of autophagy in mammalian cells*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004. 36(12): p. 2445-62.
32. Assuncao Guimaraes, C. and R. Linden, *Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles*. *Eur J Biochem*, 2004. 271(9): p. 1638-50.
33. Petiot, A., et al., *Diversity of signaling controls of macroautophagy in mammalian cells*. *Cell Structure and Function*, 2002. 27(6): p. 431-41.
34. Holler, N., et al., *Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule*. *Nat Immunol*, 2000. 1(6): p. 489-95.
35. Edinger, A.L. and C.B. Thompson, *Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy*. *Curr Opin Cell Biol*, 2004. 16(6): p. 663-9.
36. Shimizu, S., et al., *Retardation of chemical hypoxia-induced necrotic cell death by Bcl-2 and ICE inhibitors: possible involvement of common mediators in apoptotic and necrotic signal transductions*. *Oncogene*, 1996. 12(10): p. 2045-50.
37. Kane, D.J., et al., *Expression of bcl-2 inhibits necrotic neural cell death*. *J Neurosci Res*, 1995. 40(2): p. 269-75.
38. Kuan, C.Y., et al., *Mechanisms of programmed cell death in the developing brain*. *Trends in Neurosciences*, 2000. 23(7): p. 291-7.
39. Kuida, K., et al., *Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9*. *Cell*, 1998. 94(3): p. 325-37.
40. Cecconi, F., et al., *Apaf1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development*. *Cell*, 1998. 94(6): p. 727-37.
41. Yoshida, H., et al., *Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development*. *Cell*, 1998. 94(6): p. 739-50.
42. Johnson, E.M., Jr. and T.L. Deckwerth, *Molecular mechanisms of developmental neuronal death*. *Annu Rev Neurosci*, 1993. 16: p. 31-46.
43. Ellis, R.E., J.Y. Yuan, and H.R. Horvitz, *Mechanisms and functions of cell death*. *Annu Rev Cell Biol*, 1991. 7: p. 663-98.
44. Oppenheim, R.W., *Cell death during development of the nervous system*. *Annual Review of Neuroscience*, 1991. 14: p. 453-501.
45. Bossy-Wetzell, E., R. Schwarzenbacher, and S.A. Lipton, *Molecular pathways to neurodegeneration*. *Nat Med*, 2004. 10 Suppl: p. S2-9.
46. Blaschke, A.J., K. Staley, and J. Chun, *Widespread programmed cell death in proliferative and postmitotic regions of the fetal cerebral cortex*. *Development*, 1996. 122(4): p. 1165-74.
47. Blaschke, A.J., J.A. Weiner, and J. Chun, *Programmed cell death is a universal feature of embryonic and postnatal neuroproliferative regions throughout the central nervous system*. *J Comp Neurol*, 1998. 396(1): p. 39-50.
48. Yaginuma, H., et al., *A novel type of programmed neuronal death in the cervical spinal cord of the chick embryo*. *J Neurosci*, 1996. 16(11): p. 3685-703.

49. White, F.A., et al., *Widespread elimination of naturally occurring neuronal death in Bax-deficient mice*. The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society For Neuroscience, 1998. 18(4): p. 1428-39.
50. Burek, M.J. and R.W. Oppenheim, *Programmed cell death in the developing nervous system*. Brain Pathol, 1996. 6(4): p. 427-46.
51. Yamamoto, Y. and C.E. Henderson, *Patterns of programmed cell death in populations of developing spinal motoneurons in chicken, mouse, and rat*. Developmental Biology, 1999. 214(1): p. 60-71.
52. Sohal, G.S., *The role of target size in neuronal survival*. J Neurobiol, 1992. 23(9): p. 1124-30.
53. Lee, S.K. and S.L. Pfaff, *Transcriptional networks regulating neuronal identity in the developing spinal cord*. Nat Neurosci, 2001. 4 Suppl: p. 1183-91.
54. Gilbert, S.F., *Developmental biology*. 6th edition ed. Embriology, ed. t. edition. 2000, Sunderland, MA, USA: Sinauer Associates, Inc.
55. Caspary, T. and K.V. Anderson, *Patterning cell types in the dorsal spinal cord: what the mouse mutants say*. Nat Rev Neurosci, 2003. 4(4): p. 289-97.
56. Jurata, L.W., J.B. Thomas, and S.L. Pfaff, *Transcriptional mechanisms in the development of motor control*. Curr Opin Neurobiol, 2000. 10(1): p. 72-9.
57. Helms, A.W. and J.E. Johnson, *Specification of dorsal spinal cord interneurons*. Current Opinion in Neurobiology, 2003. 13(1): p. 42-9.
58. Muller, T., et al., *The homeodomain factor lbx1 distinguishes two major programs of neuronal differentiation in the dorsal spinal cord*. Neuron, 2002. 34(4): p. 551-62.
59. Gross, M.K., M. Dottori, and M. Goulding, *Lbx1 specifies somatosensory association interneurons in the dorsal spinal cord*. Neuron, 2002. 34(4): p. 535-49.
60. Halliwell, B. and J.M.C. Gutteridge, *Free radicals in biology and medicine*. Third ed. Oxford Science Publications, ed. T. edition. 1999, New York, USA: Oxford University press.
61. Castagne, V., et al., *Relationships between neuronal death and the cellular redox status. Focus on the developing nervous system*. Progress in Neurobiology, 1999. 59: p. 397-423.
62. Turpaev, K.T., *Reactive oxygen species and regulation of gene expression*. Biochemistry (Mosc), 2002. 67(3): p. 281-92.
63. Thannickal, V.J. and B.L. Fanburg, *Reactive oxygen species in cell signaling*. Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol., 2000. 279: p. L1005-L1028.
64. Droge, W., *Free radicals in the physiological control of cell function*, in *Physiol. Rev.* 2002. p. 47-95.
65. Halliwell, B., *Reactive oxygen species and the central nervous system*. J Neurochem, 1992. 59(5): p. 1609-23.
66. Zelko, I.N., T.J. Mariani, and R.J. Folz, *Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression*. Free Radic Biol Med, 2002. 33(3): p. 337-49.
67. Folz, R.J. and J.D. Crapo, *Extracellular superoxide dismutase (SOD3): tissue-specific expression, genomic characterization, and computer-assisted sequence analysis of the human EC SOD gene*. Genomics, 1994. 22(1): p. 162-71.
68. Jones, P.L., et al., *Cloning and characterization of the murine manganous superoxide dismutase-encoding gene*. Gene, 1995. 153(2): p. 155-61.
69. Yu, B.P., *Cellular defenses against damage from reactive oxygen species*. Physiol Rev, 1994. 74(1): p. 139-62.
70. Rojkind, M., et al., *Role of hydrogen peroxide and oxidative stress in healing responses*. Cell Mol Life Sci, 2002. 59(11): p. 1872-91.
71. Arthur, J.R., *The glutathione peroxidases*. Cell Mol Life Sci, 2000. 57(13-14): p. 1825-35.

72. Imai, H. and Y. Nakagawa, *Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells*. Free Radic Biol Med, 2003. 34(2): p. 145-69.
73. Rhee, S.G., et al., *Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases*. IUBMB Life, 2001. 52(1-2): p. 35-41.
74. Nishiyama, A., et al., *Redox regulation by thioredoxin and thioredoxin-binding proteins*. IUBMB Life, 2001. 52(1-2): p. 29-33.
75. Dringen, R., *Metabolism and functions of glutathione in brain*. Prog Neurobiol, 2000. 62(6): p. 649-71.
76. Storey, K.B., *Oxidative stress: animal adaptations in nature*. Braz J Med Biol Res, 1996. 29(12): p. 1715-33.
77. Bokov, A., A. Chaudhuri, and A. Richardson, *The role of oxidative damage and stress in aging*. Mech Ageing Dev, 2004. 125(10-11): p. 811-26.
78. Sauer, H., M. Wartenberg, and J. Hescheler, *Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation*. Cell Physiol Biochem, 2001. 11(4): p. 173-86.
79. Sauer, H., et al., *Involvement of reactive oxygen species in cardiotrophin-1-induced proliferation of cardiomyocytes differentiated from murine embryonic stem cells*. Experimental Cell Research, 2004. 294(2): p. 313-24.
80. Policastro, L., et al., *Imbalance of antioxidant enzymes in tumor cells and inhibition of proliferation and malignant features by scavenging hydrogen peroxide*. Molecular Carcinogenesis, 2004. 39(2): p. 103-13.
81. Burdon, R.H. and C. Rice-Evans, *Free radicals and the regulation of mammalian cell proliferation*. Free Radic Res Commun, 1989. 6(6): p. 345-58.
82. Rao, G.N. and B.C. Berk, *Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression*. Circ Res, 1992. 70(3): p. 593-9.
83. Ruiz-Gines, J.A., et al., *Reactive oxygen species induce proliferation of bovine aortic endothelial cells*. J Cardiovasc Pharmacol, 2000. 35(1): p. 109-13.
84. Wedgwood, S. and S.M. Black, *Combined superoxide dismutase/catalase mimetics alter fetal pulmonary arterial smooth muscle cell growth*. 2004. 6(1): p. 191-7.
85. Laurent, A., et al., *Controlling tumor growth by modulating endogenous production of reactive oxygen species*. Cancer Res, 2005. 65(3): p. 948-56.
86. Yang, K.D. and M.F. Shaio, *Hydroxyl radicals as an early signal involved in phorbol ester-induced monocytic differentiation of HL60 cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1994. 200(3): p. 1650-7.
87. Katoh, S., et al., *Hyperoxia induces the neuronal differentiated phenotype of PC12 cells via a sustained activity of mitogen-activated protein kinase induced by Bcl-2*. Biochem J, 1999. 338 (Pt 2): p. 465-70.
88. Ren, J.G., et al., *Apoptosis, redifferentiation and arresting proliferation simultaneously triggered by oxidative stress in human hepatoma cells*. Cell Biol Int, 1998. 22(1): p. 41-9.
89. Sauer, H., et al., *Role of reactive oxygen species and phosphatidylinositol 3-kinase in cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells*. FEBS Lett, 2000. 476(3): p. 218-23.
90. Goldkorn, T., et al., *H2O2 acts on cellular membranes to generate ceramide signaling and initiate apoptosis in tracheobronchial epithelial cells*. J Cell Sci, 1998. 111 (Pt 21): p. 3209-20.
91. Li, P.F., et al., *Requirement for protein kinase C in reactive oxygen species-induced apoptosis of vascular smooth muscle cells*. Circulation, 1999. 100(9): p. 967-73.
92. Zettl, U.K., et al., *Apoptosis of myelin-reactive T cells induced by reactive oxygen and nitrogen intermediates in vitro*. Cellular Immunology, 1997. 178(1): p. 1-8.
93. Hampton, M.B. and S. Orrenius, *Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis*. FEBS Lett, 1997. 414(3): p. 552-6.

94. Dumont, A., et al., *Hydrogen peroxide-induced apoptosis is CD95-independent, requires the release of mitochondria-derived reactive oxygen species and the activation of NF-kappaB*. *Oncogene*, 1999. 18(3): p. 747-57.
95. Yamakawa, H., et al., *Activation of caspase-9 and -3 during H2O2-induced apoptosis of PC12 cells independent of ceramide formation*. *Neurol Res*, 2000. 22(6): p. 556-64.
96. Vollgraf, U., M. Wegner, and C. Richter-Landsberg, *Activation of AP-1 and nuclear factor-kappaB transcription factors is involved in hydrogen peroxide-induced apoptotic cell death of oligodendrocytes*. *J Neurochem*, 1999. 73(6): p. 2501-9.
97. Satoh, T., et al., *Survival factor-insensitive generation of reactive oxygen species induced by serum deprivation in neuronal cells*. *Brain Research*, 1996. 733(1): p. 9-14.
98. Buttke, T.M. and P.A. Sandstrom, *Oxidative stress as a mediator of apoptosis*. *Immunol Today*, 1994. 15(1): p. 7-10.
99. Kane, D.J., et al., *Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species*. *Science*, 1993. 262(5137): p. 1274-7.
100. Ratan, R.R., T.H. Murphy, and J.M. Baraban, *Macromolecular synthesis inhibitors prevent oxidative stress-induced apoptosis in embryonic cortical neurons by shunting cysteine from protein synthesis to glutathione*. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society For Neuroscience*, 1994. 14(7): p. 4385-92.
101. Rothstein, J.D., et al., *Chronic inhibition of superoxide dismutase produces apoptotic death of spinal neurons*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(10): p. 4155-9.
102. Fleury, C., B. Mignotte, and J.L. Vayssiere, *Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling*. *Biochimie*, 2002. 84(2-3): p. 131-41.
103. Sandstrom, P.A., M.D. Mannie, and T.M. Buttke, *Inhibition of activation-induced death in T cell hybridomas by thiol antioxidants: oxidative stress as a mediator of apoptosis*. *J Leukoc Biol*, 1994. 55(2): p. 221-6.
104. Greenlund, L.J., T.L. Deckwerth, and J.r. Johnson EM, *Superoxide dismutase delays neuronal apoptosis: a role for reactive oxygen species in programmed neuronal death*. *Neuron*, 1995. 14(2): p. 303-15.
105. Wang, P., et al., *Overexpression of human copper, zinc-superoxide dismutase (SOD1) prevents postischemic injury*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(8): p. 4556-60.
106. Weisbrot-Lefkowitz, M., et al., *Overexpression of human glutathione peroxidase protects transgenic mice against focal cerebral ischemia/reperfusion damage*. *Brain Res Mol Brain Res*, 1998. 53(1-2): p. 333-8.
107. Keller, J.N., et al., *Mitochondrial manganese superoxide dismutase prevents neural apoptosis and reduces ischemic brain injury: suppression of peroxynitrite production, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction*. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society For Neuroscience*, 1998. 18(2): p. 687-97.
108. Sugawara, T., et al., *Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase in transgenic rats protects vulnerable neurons against ischemic damage by blocking the mitochondrial pathway of caspase activation*. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society For Neuroscience*, 2002. 22(1): p. 209-17.
109. Sheng, H., et al., *Mice overexpressing extracellular superoxide dismutase have increased resistance to focal cerebral ischemia*. *Neuroscience*, 1999. 88(1): p. 185-91.
110. Sampath, D., et al., *Effects of nerve growth factor on glutathione peroxidase and catalase in PC12 cells*. *Journal of Neurochemistry*, 1994. 62(6): p. 2476-9.

111. Yamada, K., et al., *Possible involvement of catalase in the protective effect of interleukin-6 against 6-hydroxydopamine toxicity in PC12 cells*. Brain Res Bull, 1997. 43(6): p. 573-7.
112. Larrick, J.W. and S.C. Wright, *Cytotoxic mechanism of tumor necrosis factor-alpha*. Faseb J, 1990. 4(14): p. 3215-23.
113. Carmody, R.J., A.J. McGowan, and T.G. Cotter, *Reactive oxygen species as mediators of photoreceptor apoptosis in vitro*. Experimental Cell Research, 1999. 248(2): p. 520-30.
114. Matsuda, M., et al., *Protective activity of adult T cell leukemia-derived factor (ADF) against tumor necrosis factor-dependent cytotoxicity on U937 cells*. J Immunol, 1991. 147(11): p. 3837-41.
115. Chang, D.J., G.M. Ringold, and R.A. Heller, *Cell killing and induction of manganous superoxide dismutase by tumor necrosis factor-alpha is mediated by lipoxygenase metabolites of arachidonic acid*. Biochem Biophys Res Commun, 1992. 188(2): p. 538-46.
116. Ratan, R.R., T.H. Murphy, and J.M. Baraban, *Oxidative stress induces apoptosis in embryonic cortical neurons*. Journal of Neurochemistry, 1994. 62(1): p. 376-9.
117. Busciglio, J. and B.A. Yankner, *Apoptosis and increased generation of reactive oxygen species in Down's syndrome neurons in vitro*. Nature, 1995. 378(6559): p. 776-9.
118. Bowling, A.C. and M.F. Beal, *Bioenergetic and oxidative stress in neurodegenerative diseases*. Life Sci, 1995. 56(14): p. 1151-71.
119. Barja, G., *Free radicals and aging*. Trends Neurosci, 2004. 27(10): p. 595-600.
120. Andersen, J.K., *Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence?* Nat Med, 2004. 10 Suppl: p. S18-25.
121. Raoul, C., et al., *Motoneuron death triggered by a specific pathway downstream of Fas. potentiation by ALS-linked SOD1 mutations*. Neuron, 2002. 35(6): p. 1067-83.
122. Hanada, H., et al., *Do reactive oxygen species underlie the mechanism of apoptosis in the tadpole tail?* Free Radic Biol Med, 1997. 23(2): p. 294-301.
123. Kashiwagi, A., et al., *Thyroxine enhancement and the role of reactive oxygen species in tadpole tail apoptosis*. Free Radic Biol Med, 1999. 26(7-8): p. 1001-9.
124. Salas_Vidal, E., et al., *Reactive oxygen species participate in the control of mouse embryonic cell death*. Experimental Cell Research, 1998. 238(1): p. 136-47.
125. Kandel, E., J. Schwartz, and T. Jessell *Principles of Neural Science*. 4 edition ed. 2000, New York, NY: McGraw-Hill Medical.
126. Grabenbauer, M., H.D. Fahimi, and E. Baumgart, *Detection of peroxisomal proteins and their mRNAs in serial sections of fetal and newborn mouse organs*. J Histochem Cytochem, 2001. 49(2): p. 155-64.
127. Muralikrishnan, D. and K.P. Mohanakumar, *Neuroprotection by bromocriptine against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity in mice*. Faseb J, 1998. 12(10): p. 905-12.
128. Ferrari, G., C.Y. Yan, and L.A. Greene, *N-acetylcysteine (D- and L-stereoisomers) prevents apoptotic death of neuronal cells*. The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society For Neuroscience, 1995. 15(4): p. 2857-66.
129. Baker, K., et al., *Synthetic combined superoxide dismutase/catalase mimetics are protective as a delayed treatment in a rat stroke model: a key role for reactive oxygen species in ischemic brain injury*. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1998. 284(1): p. 215-21.
130. Melov, S., et al., *Lifespan extension and rescue of spongiform encephalopathy in superoxide dismutase 2 nullizygous mice treated with superoxide dismutase-catalase mimetics*. The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society For Neuroscience, 2001. 21(21): p. 8348-53.

131. Jung, C., et al., *Synthetic superoxide dismutase/catalase mimetics reduce oxidative stress and prolong survival in a mouse amyotrophic lateral sclerosis model*. *Neuroscience Letters*, 2001. 304(3): p. 157-60.
132. Sanchez-Carbente, M.R., et al., *Motoneuronal death during spinal cord development is mediated by oxidative stress*. *Cell Death Differ*, 2005. 12(3): p. 279-91.
133. Caldero, J., et al., *Peripheral target regulation of the development and survival of spinal sensory and motor neurons in the chick embryo*. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society For Neuroscience*, 1998. 18(1): p. 356-70.
134. Oppenheim, R.W., et al., *Glial cell line-derived neurotrophic factor and developing mammalian motoneurons: regulation of programmed cell death among motoneuron subtypes*. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society For Neuroscience*, 2000. 20(13): p. 5001-11.
135. Raff, M.C., et al., *Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system*. *Science*, 1993. 262(5134): p. 695-700.
136. Abrams, J.M., et al., *Programmed cell death during Drosophila embryogenesis*. *Development (Cambridge, England)*, 1993. 117(1): p. 29-43.
137. Paglin, S., et al., *A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles*. *Cancer Research*, 2001. 61(2): p. 439-44.
138. Thomaidou, D., et al., *Apoptosis and its relation to the cell cycle in the developing cerebral cortex*. *J Neurosci*, 1997. 17(3): p. 1075-85.
139. Estevez, A.G., et al., *Nitric oxide and superoxide contribute to motor neuron apoptosis induced by trophic factor deprivation*. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society For Neuroscience*, 1998. 18(3): p. 923-31.
140. Stull, N.D., D.P. Polan, and L. Iacovitti, *Antioxidant compounds protect dopamine neurons from death due to oxidative stress in vitro*. *Brain Research*, 2002. 931(2): p. 181-5.
141. Barnham, K.J., C.L. Masters, and A.I. Bush, *Neurodegenerative diseases and oxidative stress*. 2004. 3(3): p. 205-14.
142. Rohrdanz, E. and R. Kahl, *Alterations of antioxidant enzyme expression in response to hydrogen peroxide*. *Free Radical Biology & Medicine*, 1998. 24(1): p. 27-38.
143. Moreno, S., E. Mugnaini, and M.P. Ceru, *Immunocytochemical localization of catalase in the central nervous system of the rat*. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society*, 1995. 43(12): p. 1253-67.
144. Moreno, S., R. Nardacci, and M.P. Ceru, *Regional and ultrastructural immunolocalization of copper-zinc superoxide dismutase in rat central nervous system*. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society*, 1997. 45(12): p. 1611-22.
145. Brunet, A., et al., *Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase*. *Science*, 2004. 303(5666): p. 2011-5.
146. Gabaizadeh, R., et al., *BDNF protection of auditory neurons from cisplatin involves changes in intracellular levels of both reactive oxygen species and glutathione*. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 1997. 50(1-2): p. 71-8.
147. Chao, C.C. and E.H. Lee, *Neuroprotective mechanism of glial cell line-derived neurotrophic factor on dopamine neurons: role of antioxidation*. *Neuropharmacology*, 1999. 38(6): p. 913-6.
148. Houenou, L.J., et al., *Regulation of spinal motoneuron survival by GDNF during development and following injury*. *Cell and Tissue Research*, 1996. 286(2): p. 219-23.
149. Sendtner, M., et al., *Developmental motoneuron cell death and neurotrophic factors*. *Cell and Tissue Research*, 2000. 301(1): p. 71-84.

150. Nornes, H.O. and M. Carry, *Neurogenesis in spinal cord of mouse: an autoradiographic analysis*. Brain Research, 1978. 159(1): p. 1-6.
151. Chautan, M., et al., *Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase-independent pathway*. Current Biology : Cb, 1999. 9(17): p. 967-70.
152. Oppenheim, R.W., et al., *Programmed cell death of developing mammalian neurons after genetic deletion of caspases*. The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society For Neuroscience, 2001. 21(13): p. 4752-60.
153. Yaginuma, H., et al., *Caspase activity is involved in, but is dispensable for, early motoneuron death in the chick embryo cervical spinal cord*. Molecular and Cellular Neurosciences, 2001. 18(2): p. 168-82.
154. Chu_Wang, I.W. and R.W. Oppenheim, *Cell death of motoneurons in the chick embryo spinal cord. I. A light and electron microscopic study of naturally occurring and induced cell loss during development*. The Journal of Comparative Neurology, 1978. 177(1): p. 33-57.
155. Mizushima, N., et al., *In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker*. Mol Biol Cell, 2004. 15(3): p. 1101-11.
156. Raoul, C., C.E. Henderson, and B. Pettmann, *Programmed cell death of embryonic motoneurons triggered through the Fas death receptor*. The Journal of Cell Biology, 1999. 147(5): p. 1049-62.
157. Choi, W.S., et al., *Phosphorylation of p38 MAPK induced by oxidative stress is linked to activation of both caspase-8- and -9-mediated apoptotic pathways in dopaminergic neurons*. J Biol Chem, 2004. 279(19): p. 20451-60.
158. Wang, X., et al., *Necrotic cell death in response to oxidant stress involves the activation of the apoptogenic caspase-8/bid pathway*. J Biol Chem, 2003. 278(31): p. 29184-91.
159. Xue, L., G.C. Fletcher, and A.M. Tolkovsky, *Autophagy is activated by apoptotic signalling in sympathetic neurons: an alternative mechanism of death execution*. Mol Cell Neurosci, 1999. 14(3): p. 180-98.
160. Frade, J.M. and Y.A. Barde, *Genetic evidence for cell death mediated by nerve growth factor and the neurotrophin receptor p75 in the developing mouse retina and spinal cord*. Development, 1999. 126(4): p. 683-90.
161. Roth, K.A., et al., *Epistatic and independent functions of caspase-3 and Bcl-X(L) in developmental programmed cell death*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(1): p. 466-71.
162. Mark, R.J., et al., *Fibroblast growth factor-8 protects cultured rat hippocampal neurons from oxidative insult*. Brain Research, 1999. 830(1): p. 88-93.
163. Salinas, M., et al., *Nerve growth factor protects against 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress by increasing expression of heme oxygenase-1 in a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent manner*. The Journal of Biological Chemistry, 2003. 278(16): p. 13898-904.
164. Tammariello, S.P., M.T. Quinn, and S. Estus, *NADPH oxidase contributes directly to oxidative stress and apoptosis in nerve growth factor-deprived sympathetic neurons*. The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society For Neuroscience, 2000. 20(1): p. RC53.
165. Albright, C.D., et al., *Mitochondrial and microsomal derived reactive oxygen species mediate apoptosis induced by transforming growth factor-beta1 in immortalized rat hepatocytes*. Journal of Cellular Biochemistry, 2003. 89(2): p. 254-61.
166. Moreno_Manzano, V., et al., *Selective involvement of superoxide anion, but not downstream compounds hydrogen peroxide and peroxy nitrite, in tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis of rat mesangial cells*. The Journal of Biological Chemistry, 2000. 275(17): p. 12684-91.

167. Garces, A., et al., *GFRalpha 1 is required for development of distinct subpopulations of motoneuron*. The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society For Neuroscience, 2000. 20(13): p. 4992-5000.
168. Sedel, F., C. Bechade, and A. Triller, *Nerve growth factor (NGF) induces motoneuron apoptosis in rat embryonic spinal cord in vitro*. The European Journal of Neuroscience, 1999. 11(11): p. 3904-12.
169. Kriegstein, K., et al., *Reduction of endogenous transforming growth factors β prevents ontogenetic neuron death*. Nature, 2000. 3(11): p. 1085-1090.
170. Barker, V., et al., *TNFalpha contributes to the death of NGF-dependent neurons during development*. Nature Neuroscience, 2001. 4(12): p. 1194-8.
171. Yang, L., et al., *Target depletion of distinct tumor necrosis factor receptor subtypes reveals hippocampal neuron death and survival through different signal transduction pathways*. The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society For Neuroscience, 2002. 22(8): p. 3025-32.
172. Kamata, H., et al., *Reactive oxygen species promote TNFalpha-induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases*. Cell, 2005. 120(5): p. 649-61.
173. Marin_Teva, J.L., et al., *Microglia promote the death of developing Purkinje cells*. Neuron, 2004. 41(4): p. 535-47.
174. Hoepfner, D.J., M.O. Hengartner, and R. Schnabel, *Engulfment genes cooperate with ced-3 to promote cell death in Caenorhabditis elegans*. Nature, 2001. 412(6843): p. 202-6.
175. Clement, A.M., et al., *Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice*. Science, 2003. 302(5642): p. 113-7.