



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Lipoperoxidación en la muerte
apoptótica de neuronas granulares de
cerebelo inducida por bajo potasio.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

JUAN MANUEL HERNÁNDEZ

MARTÍNEZ



DIRECTOR DE TESIS:
DR. JULIO EDUARDO ROQUE MORÁN ANDRADE

2007



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.

A mi mamá: por creer en mí en todo momento, incluso cuando yo lo dejé de hacer. Por enseñarme que la vida no nos está garantizada y que somos lo que hacemos de ella. Por ser un ejemplo tangible y constante de superación personal y amor al conocimiento.

Agradecimientos

Gracias a todos los miembros de mi familia por ayudarme, a lo largo de estos años, a convertirme en el hombre que soy, gracias por proveerme con un ambiente propicio para el desarrollo de este trabajo (ustedes son mi sopa primigenea).

Papá sería imposible agradecerte todo lo que has hecho por mí, más aún, el intentarlo en tan solo un párrafo. Gracias por tu tiempo, por los libros científicos para niños, por el laboratorio casero de la secundaria, por tus consejos, por compartir conmigo tu experiencia de vida, por compartirme tus aciertos y tus errores, por buscar el hacerme un ser humano pleno y feliz. Gracias por procurar en todo momento y por sobre todas las cosas, este pequeño logro.

Jola muchas gracias por tu cariño e interés por mi mundo, valoro mucho las noches en las que discutimos mi trabajo, eres de las pocas personas que conozco en las que la esencia del científico brilla con fuerza: la capacidad de maravillarte ante los fenómenos naturales y un genuino interés por descubrir su causa.

Jaime, siempre has sido para mí un modelo a seguir, en un principio lo fuiste por el simple hecho de ser mi hermano mayor, ahora soy capaz de ver más y veo en ti, entre otras cosas, lo mucho que se puede alcanzar cuando el esfuerzo y la disciplina son la base. Cuando me sentí más solo, el saberte mi hermano me hizo seguir adelante.

Chave, en todos nuestros logros siempre estás tú. Sin ti, la vida como la conocemos no nos sería posible. Gracias por tu cariño, por acompañarme a cenar cuando regreso tarde del laboratorio o el gimnasio.

A mis amigos porque muchos de ustedes sin saberlo y otros con pleno conocimiento de causa me han ayudado a crecer, son todos ustedes una fuente de inspiración y de crítica constructiva, sin ustedes mi mundo sería un lugar muy gris.

A todos mis compañeros en el laboratorio bl-302 por su disponibilidad y entusiasmo para ayudarme a resolver cualquier duda que se presentó en mi camino. Especialmente a Alette Ortega Gómez, quién hizo de mi ingreso al laboratorio una experiencia agradable, gracias por los fines de semana en los que me ayudaste a hacer mis primeros experimentos, te debo mucho.

A los miembros de mi jurado por el tiempo que le dedicaron a la revisión de este trabajo.

Un especial agradecimiento al Dr. Abel Santamaría Del Ángel por proporcionarme la técnica de TBARS y por el interés en los resultados a lo largo de la elaboración de este proyecto.

Dra. Patricia Ramos Morales, gracias por enseñarnos (a sus alumnos) a desenvolvemos como biólogos, a valorar nuestra profesión y a asumirla en nuestra vida diaria, gracias a usted comprendí que

ser biólogo significa ser capaz de pensar con lógica cuando se es presentado ante un problema. No es saberlo todo, sino saber que es lo que se necesita para contestar.

A mi tutor de tesis, el Dr. Julio Eduardo Roque Morán Andrade, gracias por el interés que le prestas a cada uno de tus estudiantes, no solo en el ámbito profesional sino en el humano. Gracias por construir en todos nosotros la confianza necesaria para llegar a nuestras propias conclusiones, por respetarlas.

Este trabajo fue posible gracias al apoyo recibido por los proyectos: CONACyT 47158-Q y DGAPA-UNAM IN222303.

Agradezco especialmente el apoyo técnico recibido por mi amiga y maestra, la Bióloga Guadalupe Domínguez Macouzet. Sin ti, este trabajo no contaría con las estrellas de la película, tus hijas las NGC.

"We can forgive a man for making a useful thing as long as he does not admire it. The only excuse for making a useless thing is that one admires it intensely"

Oscar Wilde

INDICE

• Resumen.....	V
• Abreviaturas.....	VII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Apoptosis.....	1
1.1.1. Características.....	1
1.1.2. Muerte durante el desarrollo del sistema nervioso.....	5
1.1.3. Muerte en condiciones patológicas.....	8
1.2. Especies reactivas de oxígeno.....	8
1.2.1. Estrés oxidativo.....	10
1.2.2. Peroxidación.....	11
1.2.2.1.Lipídica.....	11
1.2.2.2.Proteínas.....	13
1.2.2.3.DNA.....	14
2. ANTECEDENTES.....	17
3. OBJETIVOS.....	19
3.1. Objetivo general.....	19
3.2. Objetivos particulares.....	19
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
4.1. Cultivo de Neuronas Granulares de Cerebelo.....	20
4.2. Inducción de muerte celular.....	20
4.3. Viabilidad celular.....	21
4.4. Determinación de Proteínas por el método de Bradford.....	21
4.5. TBARS.....	21
4.6. Identificación de Dienes Conjugados.....	22
4.7. Detección de anión superóxido.....	22
4.8. Análisis estadístico.....	23

5. RESULTADOS.....	24
5.1. Efecto de K5 en la morfología y viabilidad de las NGC.....	24
5.2. Efecto de K5 en la generación de ROS.....	25
5.3. Dienes Conjugados (DC).....	28
5.4. Sustancias Reactivas al TBA (TBARS)	29
6. DISCUSIÓN.....	30
7. CONCLUSIONES.....	34
8. REFERENCIAS.....	35

RESUMEN

Cuando las neuronas granulares del cerebelo (NGC) de ratas de 7-8 días son cultivadas en un medio con concentraciones despolarizantes de potasio (K25) sobreviven y maduran por más de 7 días *in vitro* (DIV) (Morán, 1989). Bajo estas condiciones, cuando las NGC son transferidas a un medio con una concentración baja de potasio (K5), éstas mueren de forma apoptótica en un lapso de 24-48 horas, probablemente mimetizando lo que ocurre *in vivo* durante el desarrollo del cerebelo. Se ha demostrado que la muerte apoptótica de las NGC inducida por K5 está mediada por un incremento en los niveles especies reactivas de oxígeno (ROS) (Valencia y Morán, 2001). Las ROS pueden participar en el programa de muerte apoptótica de dos maneras: como moléculas de señalización o como moléculas efectoras al causar daño oxidativo a carbohidratos, ácidos nucleicos, proteínas y lípidos. La lipoperoxidación (LPO) es una reacción oxidativa que afecta a los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs). Esta reacción puede iniciarse por la pérdida de un hidrógeno, lo que produce un átomo de carbono con un electrón libre generando un radical de ácido graso. Este radical puede formar complejos no reactivos si se combina con otro radical de ácido graso o con un atrapador de radicales libres, en el segundo caso es necesario que ocurra un entrecruzamiento con PUFAs. También puede generar un dieno conjugado, el cual puede reaccionar con oxígeno molecular y formar el radical lipoperoxilo. Durante la LPO, la ruptura de los enlaces de carbono provoca la formación de aldehídos, como el malondialdehído (MDA), capaz de interactuar con el grupo tiol de las proteínas, entrecruzar el grupo amino de los lípidos con las proteínas y generar cromolípidos y proteínas agregadas.

En este trabajo indujimos muerte apoptótica de NGC por medio de la disminución en la concentración de potasio y evaluamos en un curso temporal: 1) viabilidad celular; 2) producción de $O_2^{\cdot-}$ y 3) la presencia de dos productos de la LPO: dienos conjugados y MDA. Bajo estas condiciones encontramos un incremento significativo en los niveles de dienos conjugados a las 4 y a las 18 horas después del tratamiento con K5. Dicho incremento correlacionó con un aumento en los niveles de $O_2^{\cdot-}$. Aunque encontramos dos aumentos en los niveles de dienos conjugados, no encontramos MDA a las 4 horas y tampoco vimos ninguna disminución de la viabilidad a ese tiempo. En el caso del MDA, encontramos un incremento significativo sólo después de 18 hrs de tratamiento con K5, cuando la viabilidad disminuyó cerca de 40%. Estos resultados sugieren que la producción de ROS inducida por K5 podría actuar como una señal inicialmente de muerte celular, causando un daño moderado en macromoléculas. Posteriormente, las ROS podrían tener una acción efectora en una fase más avanzada de la muerte, causando un mayor daño oxidativo.

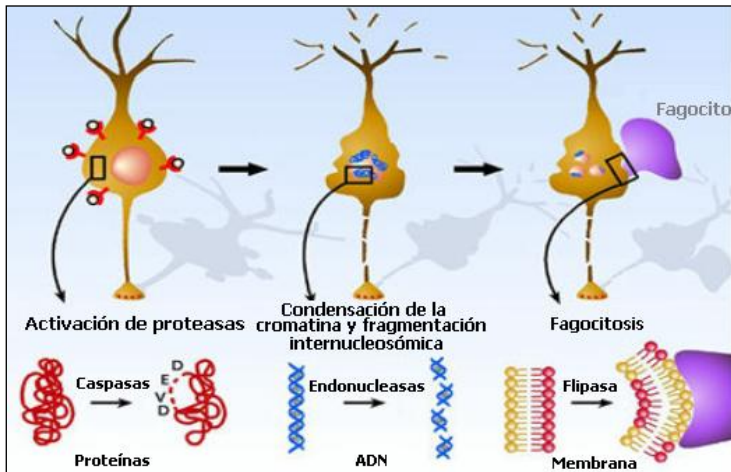
Abreviaturas

3-NT: 3-Nitrotirosina
aa: Amino Acid; Aminoácido
AD: Alzheimer`s disease, Enfermedad de Alzheimer
ADP: Adenosín difosfato
AIF: apoptosis inducing factor; factor inductor de la apoptosis.
AMPC: Adenosín monofosfato cíclico
APAF-1: Apoptogenic proteases activating factor; factor activador de las proteasas apoptogénicas.
ATP: Adenosín trifosfato
Bak y Bax: miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2
Bcl-2: miembro prototipo de la familia Bcl-2, identificado como producto del proto-oncogen bcl-2.
Bcl-XL: miembro antiapoptótico de la familia Bcl-2. Se une y bloquea la activación de Apaf-1
BH: Bcl-2 homology domain; Homología Bcl-2.
BH3: dominio pro-apoptótico de la familia de proteínas Bcl-2.
BH4: dominio antiapoptótico de la familia Bcl-2
C. Elegans: *Caenorhabditis elegans*
Ca²⁺: Ión de Calcio
CaMK: Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase; Proteína cinasa dependiente de Ca²⁺-calmodulina.
CaN: Calcineurin phosphatase; fosfatasa de calcineurina
CARD: Caspase recruitment domain; Dominio de reclutamiento de caspasas.
Caspasa: Cystein-aspartase; Aspartasa de cisteína
DC: Dieno Conjugado
DD: death domain; Dominio de muerte
DED: Death effector domain; Dominio efector de muerte
DEVD: Asp-Glu-Val-Asp, sitio de inhibición de caspasa-3
DE: Dihidroetidina
DIV: Days in vitro; Días in vitro
DMSO: Dimetilsulfóxido
DNA: Deoxyribonucleic acid, Ácido Desoxirribonucleico
FAD: Dinucleótido de flavín adenina.
FADD: Dominio de muerte asociado a Fas
GABA: Gamma aminobutyric acid; Ácido gama-aminobutírico.
GMPC: Guanilil mono fosfato cíclico
Hrs: Horas
K5: Concentración de KCl en el medio de 5 mM
K25: Concentración de KCl en el medio de 25 mM
KCl: Cloruro de Potasio
KO: Knock out
LPO: Lipid peroxidation; Peroxidación lipídica, lipoperoxidación.
MAPK: Mitogen activated protein kinase; Cinasas de proteína activadas por mitógenos.
MDA: Malondialdehido
MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
NADPH: Forma reducida del fosfato del dinucleótido de nicotinamida adenina.
NFkb: Factor nuclear kappa b
NGC: Neuronas granulares de cerebelo
NGF: Nerve Growth Factor; Factor de crecimiento nervioso
NO: Nitric Oxide; Óxido Nítrico.
O₂: Oxígeno Molecular
O₂⁻: Anión superóxido
OH⁻: Radical Hidroxilo
pb: Pares de bases
PBS: Amortiguador salino de fosfatos
PD: Parkinson`s disease; Enfermedad de Parkinson
PUFA: Polyunsaturated fatty acid; Ácido graso poli-insaturado

ROS: Reactive Oxygen Species; Especies reactivas de oxígeno
SNC: Sistema Nervioso Central
SNP: Sistema Nervioso Periférico
SOD: Superoxide Dismutase. Superoxido dismutasa
TBA: Thiobarbituric Acid, Acido tiobarbitúrico
TBARS: TBA reactive Species; Especies reactivas al TBA
VSCCs: Voltage sensitive calcium channels; Canales de calcio sensibles a voltaje.

1. INTRODUCCION

1.1 Apoptosis



hepatocitos que morían diferencialmente; una población que moría con características necróticas clásicas y otra en la que se podía observar condensación de cromatina, formación de vesículas citoplasmáticas y la presencia de lisosomas intactos. Kerr inicialmente denominó a este segundo tipo de muerte como “necrosis por encogimiento”, pero al observar que éste era un proceso activo con características ultraestructurales conservadas y que ocurría en diversos tejidos, postuló que era un fenómeno inherentemente programado que permitía la homeostasis tisular y lo denominó apoptosis (Kerr et al., 1972; Kerr, 2002).

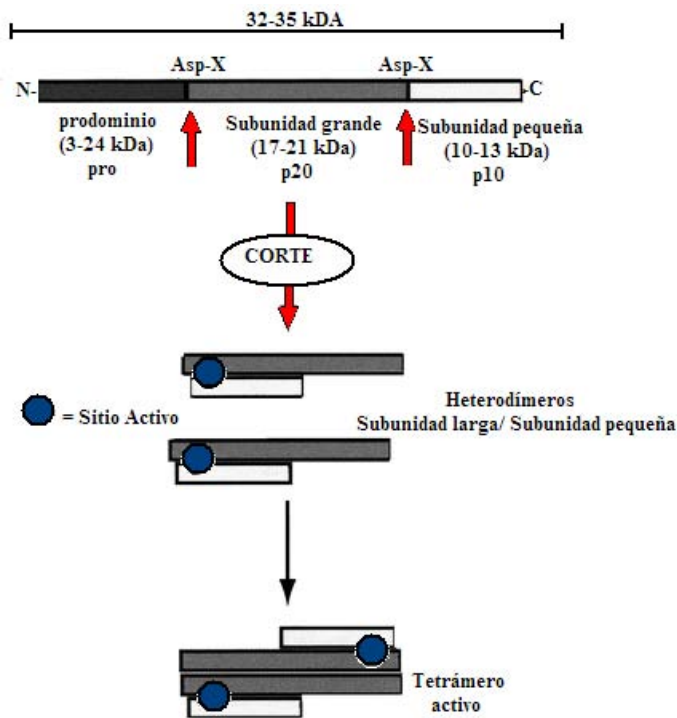
La apoptosis participa en procesos fisiológicos como el modelado de estructuras, la eliminación de células activadas del sistema inmune, posterior a una infección, la eliminación de células transformadas y la eliminación de células infectadas en procesos virales (Rathmel y Thompson, 2002; Benedict et al., 2002; Johnstone et al., 2002), entre otros. Dado que no hay liberación de componentes citoplasmáticos al medio, este tipo de muerte no genera procesos inflamatorios.

1.1.1 Características

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada que requiere de ATP y síntesis *de novo* de proteínas y se distingue de otros tipos de muerte por medio de parámetros bioquímicos y morfológicos que incluyen: degradación del DNA en fragmentos internucleosomales de aproximadamente 180 pb, encogimiento nuclear y celular, condensación de la cromatina, empaquetamiento de los componentes intracelulares, formación de cuerpos apoptóticos, vacuolización del citoplasma, translocación de fosfatidilserina, activación de proteasas y enzimas específicas (Samejima1 y Earnshaw, 2005; Valencia y Morán, 2001) (Fig. 1).

A diferencia de la apoptosis, la necrosis es generalmente reconocida como un proceso pasivo en el que diferentes insultos dañan a la célula, hinchándola y provocándole severos daños membranales,

Fig1. Algunos eventos moleculares de la apoptosis: Translocación de fosfatidilserina por las flipasas, fragmentación del ADN por endonucleasas, condensación de la cromatina y activación de caspasas. DEVD es la secuencia del sitio de corte de la caspasa-3



de una familia de proteasas denominadas caspasas. Estas proteasas son aspartasas de cisteína que tienen una cisteína como grupo nucleofílico para el procesamiento del sustrato y tienen un requerimiento específico por el residuo de aspartato (D) al cual rompen en los enlaces D-X. Las caspasas son las responsables del procesamiento proteolítico de proteínas nucleares y de citoesqueleto que permiten el desensamblaje celular. (Chang y Yang, 2000)

Hasta la fecha se han clonado y caracterizado 15 caspasas de mamíferos (Eckhart et al., 2005). Todas ellas son sintetizadas como precursores inactivos (zimógenos) con 3 dominios: un prodominio N-terminal (altamente variable), una subunidad grande (p20) y una subunidad pequeña (p10). El dominio catalítico consiste de las subunidades p20 y p10, las cuales están altamente conservado entre todas las caspasas (Thornberry, 1997; Thornberry 1998).

La activación de las caspasas se induce por un corte proteolítico en el prodominio N-terminal y en la región de acoplamiento, lo cual lleva a la formación de un tetrámero dispuesto en dirección opuesta, con dos sitios catalíticos $(p20/p10)_2$, es decir, heterotetrámeros de dos heterodímeros con dos sitios activos (Leopold Eckhart et al., 2005; Chang y Yang, 2000; Wilson et al., 1994; Rotonda et

afectando el potencial mitocondrial, disminuyendo los niveles de ATP y provocando finalmente causando la muerte. (Edinger y Thompson, 2004; Proskuryakov y Konoplyannikov, 2003). Morfológicamente, durante la necrosis se observa vacuolización del citoplasma, ruptura de la membrana celular, cambios en la estructura nuclear correspondientes a una fragmentación irregular del DNA, liberación del contenido celular y citocinas pro-inflamatorias al tejido aledaño (Edinger y Thompson, 2004).

Muchas de las características asociadas a la muerte apoptótica se deben a la participación

Fig2. Estructura y corte de procaspasa. Las procaspasas, formadas por 3 dominios, sufren dos cortes proteolíticos para su activación.

al.,1996) (Fig. 2).

Las caspasas pueden ser clasificadas filogenéticamente en dos grupos: uno se relaciona con ICE (caspasa-1) y el otro con ced-3. Estos dos grupos pueden ser subdivididos dependiendo de si presentan un prodominio corto (Caspasa-3, -6, -7) o largo (el resto de las caspasas).

Aquellas caspasas cuyo prodominio es corto, de menos de 30 aa, se consideran ejecutoras del programa apoptótico, salvo la caspasa-14 que tiene una función en la diferenciación de queratinocitos epidermales pero no en la apoptosis. Existen varios modelos para la activación de las caspasas, pero de manera general se puede decir que las caspasas iniciadoras se autoprocenan por medio de un mecanismo de oligomerización, mientras que las caspasas ejecutoras se activan por la acción proteolítica de las caspasas iniciadoras o por la granzima B. Los prodominios largos, de más de 80 aa, se encuentran en las caspasas iniciadoras. Estos prodominios forman estructuras que sirven como plataformas para la interacción entre proteínas, las caspasas que las presentan pertenecen a la superfamilia DD, en la cual se incluyen moléculas adaptadoras de la señalización inflamatoria y apoptótica.

Existen dos tipos de dominios que regulan la interacción entre los activadores de las caspasas y las caspasas iniciadoras: el dominio DED y el dominio CARD. DED se encuentra en FADD, la cual es una proteína adaptadora acoplada al receptor Fas/APO-1/CD95, una vez que este receptor se une a su ligando a través del DD. El CARD se encuentra en la caspasa-1, -2, -4, -5, -9, -11, -12, y -13, un DED forma el prodominio de la caspasa-8 y dos DED el de la caspasa-10. (Boldin et al., 1996; Muzio et al., 1996; Abraham y Shaham, 2004; Zheng et al., 2001; Medema et al 1997).

Se reconocen dos vías de activación de la apoptosis: la vía extrínseca y la intrínseca. La vía

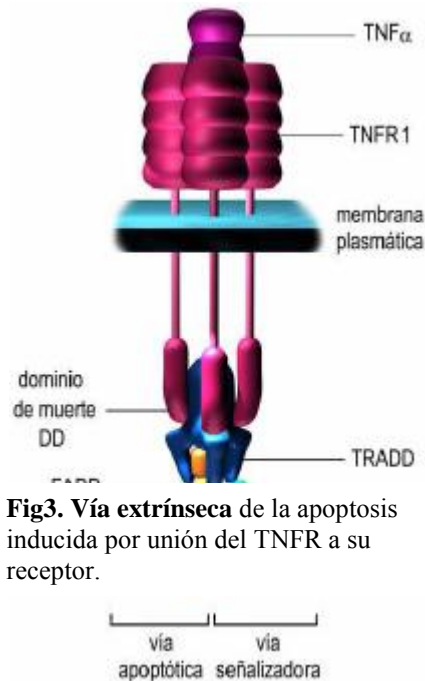


Fig3. Vía extrínseca de la apoptosis inducida por unión del TNFR a su receptor.

extrínseca está mediada por ligandos que se unen a receptores de muerte (FAS, TNFR, TRAIL, etc) en la superficie celular y que por medio de FADD/MORT1, reclutan a la procaspasa-8 o -10, que se autoactiva por la proximidad de los dominios. Estas caspasas iniciadoras a su vez, activan por proteólisis a las caspasas ejecutoras o efectoras (Daniel y Korsmeyer, 2004; Hengartner, 2000) (Figura 3).

La vía intrínseca se activa por estrés celular como un daño al ADN, agente quimioterapéuticos, privación de suero y radiación UV y puede estar mediada por proteínas supresoras de tumores como p53, oncogenes como c-myc, etc. Esta vía requiere la disrupción de la membrana mitocondrial y la liberación de proteínas mitocondriales tales como el citocromo c y Smac/Diablo.

El citocromo c es una proteína de 13 kDa, soluble, aceptora de electrones de la cadena respiratoria y que se localiza en el espacio intermembranal mitocondrial. Durante la apoptosis, esta proteína se transloca al citosol (Liu X et al., 1996). El citocromo c funciona uniéndose a Apaf-1

formando un complejo multimérico dependiente de ATP que se denomina apoptosoma, el cual induce la activación de la caspasa-9 y con ello la cascada de activación de las caspasas. Smac/Diablo, por su parte, se une a IAP antagonizando su acción antiapoptótica (Hengartner, 2000; Li et al., 1997; Zou et al.; 1999). La permeabilización de la membrana mitocondrial se regula por las acciones opuestas de miembros de la familia Bcl-2, la cual incluye a miembros antiapoptóticos como Bcl-2 y Bcl-XL y proapoptóticos como Bak, Bim, Bad y Bax (Adams y Cory, 1998).

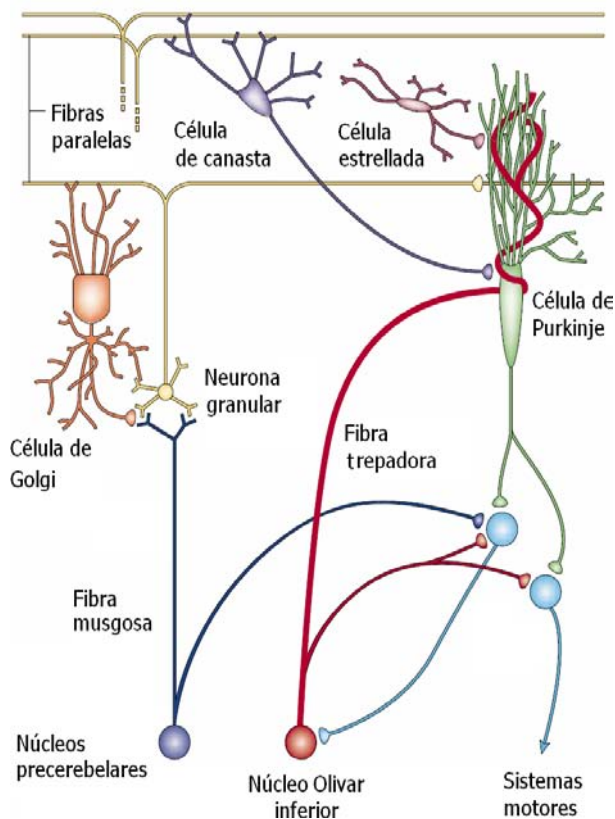
Las proteínas multidominios proapoptóticas Bcl-2, como Bax y Bak, pueden activarse directamente por interacción con la proteína Bid que posee sólo el dominio BH3. Alternativamente, la unión de otras proteínas apoptóticas como Noxa, Puma, Bad y Bim a las antiapoptóticas Bcl2 y BclXL, origina la inactivación de Bax y Bak. La liberación regulada de factores pro-apoptóticos de la mitocondria causa la inducción de las caspasas iniciadoras y ejecutoras así como una pérdida del potencial de membrana mitocondrial. La liberación de estos factores no sólo inicia la activación de las caspasas por la formación del apoptosoma, sino que también rompe la cadena de transferencia de electrones resultando en una deficiencia energética y en un aumento en la generación ROS (Reed, 1997; Adams y Cory, 1998).

Como ya se mencionó, el programa apoptótico de muerte puede ser activado por diversas señales, tales como: la falta de factores tróficos, agentes quimioterapéuticos, señales del desarrollo (LaCasse et al., 1998). La apoptosis también puede ser desencadenada por la unión de un ligando a receptores de muerte, de los cuales Fas/APO-1/CD95 y los de TNF son los mejor caracterizados.

1.1.2 Muerte durante el desarrollo del sistema nervioso

La muerte apoptótica neuronal es un proceso celular altamente conservado que ocurre en virtualmente todos los organismos que presentan SN. En los organismos multicelulares, la homeostasis tisular se mantiene gracias a un balance entre la proliferación celular y la muerte celular. Por ejemplo, se sabe que la muerte apoptótica neuronal ocurre en invertebrados como *C. elegans* y *Drosophila melanogaster*, así como en estructuras discretas del cerebro de vertebrados y que la desregulación de la apoptosis durante la morfogénesis provoca malformaciones del sistema nervioso, en particular defectos en el cierre del tubo neural (Kuida et al., 1998, 1996).

A diferencia de lo que ocurre en vertebrados, se cree que durante el desarrollo del SN de invertebrados, las neuronas mueren de una manera predeterminada que depende más de la composición genética que de las señales tróficas circundantes. (Meier et al., 2000). Se estima que en el SNC aproximadamente la mitad de la población celular original es eliminada de manera apoptótica, con la



finalidad de optimizar las conexiones sinápticas, remover neuronas innecesarias y moldear los circuitos neurales (Oppenheim 1991).

La teoría neurotrófica postula que las neuronas de proyección se generan en exceso y que para sobrevivir tienen que competir por cantidades limitadas de factores de supervivencia, los cuales son producidos por las células diana con la que establecerán inervación. Aquellas neuronas que no reciban las cantidades suficientes de dichos factores serán eliminadas mediante un proceso de MCP (Oppenheim, 1991).

EL NGF fue el primer factor neurotrófico en descubrirse (Levi-Montalcini, 1966). Se encuentra presente en el SNC, promueve la supervivencia y

maduración de neuronas sensoriales y simpáticas en el SNP, así como de células colinérgicas situadas en el prosencéfalo y el estriado (Bibel y Barde, 2000). El efecto del NGF está mediado por el receptor de alta afinidad TRK-A, que es un receptor de tirosina-cinasa que activa MAP cinasas y la vía de AKT.

Los modelos mejor caracterizados de muerte apoptótica neuronal durante el desarrollo son aquellos que utilizan cultivos de neuronas simpáticas privadas de NGF y el de cultivos de NGC no despolarizadas y en ausencia de suero. Una de estas estructuras es el cerebelo. El cerebelo representa aproximadamente el 10% del encéfalo, pero contiene más de la mitad de las neuronas presentes en el mismo. En el cerebelo, las neuronas se encuentran distribuidas de manera regular en unidades repetidas que forman circuitos básicos (Fig4). En la corteza cerebelar se pueden encontrar 5 tipos neuronales; las neuronas estrelladas, las de canasta y las de Purkinje, que son GABAérgicas, las NGC, que utilizan glutamato como neurotransmisor y las células de Golgi, que contienen GABA y glicina. En los mamíferos adultos, la corteza cerebelar está formada por 3 capas principales: la capa externa, la capa de Purkinje y la capa interna.

Las NGC constituyen la mayor parte del cerebelo y se encuentran en la capa interna o granular, en donde reciben aferencias de las fibras musgosas, provenientes de núcleos en médula espinal y tallo cerebral y que llevan información sensorial de la periferia así como información desde la corteza

cerebral. Las terminales bulbosas de las fibras

Fig4. Diagrama de un circuito funcional cerebelar. Las fibras musgosas y las fibras trepadoras provienen de distintos núcleos precerebelares y hacen contacto con las células granulares y con las de Purkinje, respectivamente. La principal vía eferente cerebelar está dada por la actividad de la célula de Purkinje.

musgosas contactan tanto a las NGC como a las interneuronas de Golgi en complejos sinápticos llamados glomérulos cerebelares. En la rata, los glomérulos cerebelares se establecen a partir del día 12 postnatal y las NGC se generan postnatalmente a partir de células originarias de la capa germinal externa. La capa germinal externa consta de dos zonas; la zona superficial proliferativa y la zona premigratoria. Las NGC migran a través de estas zonas hasta llegar a la capa granular en donde durante las primeras 2-3 semanas postnatales establecen el mayor número de sinápsis con las dendritas de las células de Purkinje (Burgoyne y Cambray-Deakin, 1988).

Durante este proceso morfogénico se ha observado que ocurre la eliminación apoptótica de aproximadamente el 50% de las neuronas generadas inicialmente. Se cree que la eliminación de estas neuronas está mediada por la competencia sináptica que actúa como factor trófico promoviendo la supervivencia (Raff et al., 1993; Sastry y Rao, 2000)

1.1.3 Muerte en condiciones patológicas

En individuos adultos, la muerte de neuronas y glía está íntimamente relacionada con el origen y progresión de la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas como el AD, PD, Huntington y la Esclerosis Lateral Amiotrófica (Mattson, 2000; Nijhawan et al., 2000). Por lo tanto, una caracterización detallada de los mecanismos reguladores y ejecutores asociados a la muerte neuronal programada durante el desarrollo, podría ayudar a identificar nuevos blancos terapéuticos para atenuar la muerte celular en condiciones patológicas.

1.2 Especies reactivas de oxígeno

El O_2 es el aceptor final de electrones de la cadena respiratoria mitocondrial y de otras vías metabólicas. Durante la respiración celular, que termina con la reducción del O_2 a agua, se producen especies reactivas de oxígeno (ROS). Estas ROS también se forman durante la vía de las ciclooxigenasa y por enzimas celulares como la p450-oxidasa, Xantina-oxidasa y la NADPH-oxidasa.

Los electrones que se encuentran en los átomos y las moléculas, ocupan regiones espaciales que se denominan orbitales. Cada orbital puede tener un máximo de dos electrones. Por ejemplo, los dos electrones que forman un enlace covalente ocupan el mismo orbital pero tienen *spins* opuestos. Si un orbital contiene solamente un electrón, se dice que ese electrón está desapareado. Un radical libre es una especie química capaz de tener una existencia independiente y que contiene uno o más electrones desapareados.

El término ROS se refiere, en sentido estricto, tanto a los radicales de oxígeno como a algunos derivados no radicales del oxígeno que son agentes oxidantes y que pueden ser fácilmente convertidos en radicales (HOCl, HOBr, O₃, ONOO⁻, ¹O₂, H₂O₂). Por lo tanto, todos los radicales de oxígeno son ROS pero no todas las ROS son radicales de oxígeno. El término especies reactivas (RS) es mucho más amplio y abarca tanto a las especies reactivas de oxígeno como a las de nitrógeno (RNS), a las de cloro (RCS), a las de bromo (RBS) y finalmente a las de azufre. (Halliwell, 2006).

El SNC es particularmente vulnerable al ataque de ROS por varias razones:

- a. El cerebro tiene una alta actividad metabólica oxidativa producto de la respiración mitocondrial. Se sabe que en humanos el oxígeno molecular se utiliza a una tasa de 3.5 ml/100g NT/min. El cerebro, que corresponde al 2% de la masa de un individuo, ocupa el 20% del O₂ total aspirado con la finalidad de suplir la alta demanda de ATP (se producen 4 x 10²¹ moléculas de ATP/min) necesaria para alcanzar la homeostasis iónica intracelular que permite la apertura y cierre de los canales iónicos que se asocian a la propagación de los potenciales de acción y neurosecreción.
- b. Tiene una alta concentración de sustratos que se pueden oxidar con facilidad.
- c. Tiene bajos niveles de enzimas antioxidantes como por ejemplo de catalasa y glutatión peroxidasa.
- d. Genera una gran cantidad de ROS debido a reacciones neuroquímicas específicas, como la involucrada en la oxidación de la dopamina y en excitotoxicidad glutamatérgica.
- e. Tiene un radio alto de superficie membranal con respecto al volumen citoplasmático y tiene una extensa morfología axonal lo que la hace propensa a daños periféricos.
- f. Las neuronas tienen una vida media larga y por lo tanto son capaces de acumular daños asociados al estrés oxidativo al que han sido sometidas.

La reactividad de las ROS es sumamente variable; tomemos como ejemplo al O₂^{•-}, el cual es capaz de comportarse como un reductor o un oxidante dependiendo de la naturaleza de la molécula con la que reaccione. Aunque el O₂^{•-} es precursor de otras ROS mucho más nocivas, solamente reacciona con un número limitado de moléculas. El H₂O₂ es un oxidante más potente y a su vez más reactivo; sus blancos son relativamente limitados, pero incluyen a la metionina y a ciertas cisteínas reactivas, puede reaccionar con ciertos metales de transición y generar OH⁻ por medio de reacciones de tipo Fenton (Halliwell y Gutteridge, 1992; Koppenol, 2001). Finalmente, el OH⁻ es sumamente reactivo y puede causar daño oxidativo en biomoléculas por medio de reacciones en cadena de radicales libres. El OH⁻ es sumamente nocivo porque es capaz de iniciar la peroxidación lipídica así como de crear radicales libres en proteínas y polinucleótidos por la abstracción de átomos de hidrógeno.

1.2.1 Estrés oxidativo

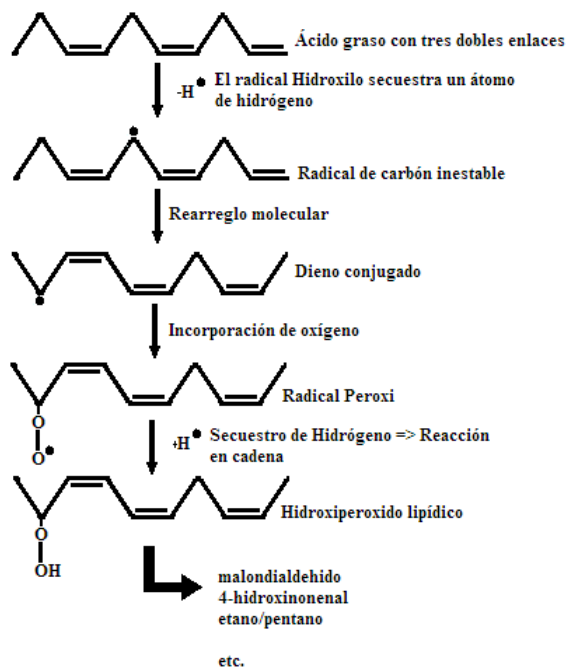
El incremento intracelular y acumulación de ROS puede ocurrir tanto en condiciones fisiológicas (señalización y metabolismo celular entre otras) como patológicas (insultos tóxicos, neurodegeneración). Las ROS son capaces de perturbar los sistemas antioxidantes causando daño a las macromoléculas celulares tales como, ácidos nucleicos, proteínas, carbohidratos y lípidos.

El estrés oxidativo ha sido definido como un desbalance entre el estado pro-oxidante y antioxidante celular (Chandra et al., 2000), capaz de causar daño pero no siendo este daño una condición intrínseca al estrés oxidativo. Muchas ROS no son removidas inmediatamente porque cumplen funciones biológicas importantes (Halliwell y Gutteridge., 2006) y oscilaciones entre el balance pro-oxidante y antioxidante celular son muy comunes en organismos sanos como por ejemplo durante la defensa ante infecciones y en la regulación de la respuesta inflamatoria, el O_2^* regula la división celular en fibroblastos *in vitro* y es capaz de terminar la cadena de peroxidación lipídica al reaccionar con radicales alcoholilo.

La existencia de enzimas cuya función primordial es la generación de ROS (NADPH-oxidasa, la oxidasa dual, la mieloperoxidasa, la óxido nítrico sintasa y la hemo-oxigenasa), así como una inducción y regulación controlada en respuesta a factores de crecimiento, citocinas y señales dependientes de calcio, nos habla de la existencia de mecanismos pro-oxidantes favorecidos a lo largo de la evolución por su relevancia en la fisiología celular. Por ejemplo, uno de los papeles fisiológicos de las ROS es la modulación en la expresión de genes activados por factores transcripcionales sensibles al estado redox celular, como es el caso para el NF κ b (Remacle, 1995; Cimino, 1997).

Una vez que las ROS han cumplido su función, es necesario que sean removidas para evitar que su alta reactividad con biomoléculas genere daño celular, para esto existen sistemas antioxidantes, como el del glutatión y enzimas como la SOD o la catalasa. Algunos modelos experimentales han demostrado la importancia de estos sistemas antioxidantes en la fisiología celular como es el caso de ratones knock-out de SOD2 (la isoforma mitocondrial de SOD), los cuales presentan cardiomiopatía y neurodegeneración (McCord, 1994).

Una de las consecuencias del desbalance en la concentración fisiológicas de ROS en su interacción con macromoléculas, lo puede generar una gran cantidad de modificaciones estructurales y funcionales (Stark, 2005). Estas modificaciones pueden ser directas cuando las ROS actúan sobre la maquinaria molecular o indirectas cuando los subproductos del ataque por ROS afectan otros componentes celulares. Las moléculas oxidadas representan un daño potencial porque interfieren con



las funciones celulares normales y porque son capaces de propagar la reacción de radicales libres. Los blancos de la acción peroxidante de los ROS son las proteínas, DNA y membranas celulares.

1.2.2 Peroxidación

1.2.2.1 Lipídica

Las neuronas son especialmente susceptibles a procesos peroxidativos debido al alto contenido en sus membranas de PUFAs. Los dobles enlaces en las membranas neuronales permiten la fácil remoción de

átomos de hidrógeno por acción de ROS (especialmente por el $\text{OH}\cdot$ y el $\text{O}_2\cdot^-$).

Durante la lipoperoxidación, el ácido graso pierde un átomo de hidrógeno de un metileno quedando así, un átomo de carbono con un electrón libre, radical de ácido graso o radical de carbono.

El radical de carbono que se formó en este evento, a partir del ácido graso poli-insaturado, sufre cambios conformacionales relativos al rearrreglo de los dobles enlaces para formar un dieno conjugado que, bajo condiciones aeróbicas y en presencia de oxígeno molecular forma el radical lipoperóxido.

La lipoperoxidación continúa conforme los dienos conjugados se combinan con el O_2 para formar radicales peroxi adicionales. Los radicales peroxi secuestran el hidrógeno de las cadenas de

ácidos grasos adyacentes, propagándose así el proceso peroxidativo. Los radicales peroxi pueden formar peróxidos cíclicos o, si toman hidrógenos de cadenas

Fig5. Secuencia de las reacciones de lipoperoxidación. (Mod. de Young y McEneny, 2001)

adyacentes, se forman hidroxiperóxidos lipídicos. (Fig. 5)

La lipoperoxidación es un evento en cadena, dado que la acción de un solo radical $\text{OH}\cdot$ puede generar numerosos reactivos tóxicos que rigidifican la membrana (permitiendo así el paso de Ca^{2+} hacia el medio intracelular) e interrumpen su integridad, ocasionando daño en proteínas de membrana, citosólicas y DNA.

La peroxidación lipídica es un evento que ha sido implicado en la patogénesis de diversas enfermedades degenerativas como arteriosclerosis, diabetes, inflamación, desórdenes neurodegenerativos, daño por isquemia-reperfusión y daño en médula espinal (Stark, 2005; Farooqui y Horrocks, 1998).

La peroxidación de los lípidos interrumpe la organización de la membrana, causando cambios en su fluidez, permeabilidad e inhibiendo procesos metabólicos y alteraciones en el transporte iónico (Stark, 2005)

El daño oxidativo a las membranas mitocondriales puede generar un ciclo de retroalimentación positiva en el que se induce una mayor producción de ROS (Green y Reed, 1998). Por ejemplo, se ha observado que la producción de peróxidos lipídicos y de productos aldehídicos genera un estado de depleción de GSH dado que la destoxificación de estos productos ocurre a través de la GSH-Px y la glutatión S-transferasa. (Arakawa et al., 2006). Los productos de la peroxidación lipídica como el MDA, 4-HNE y acroleína son capaces de reaccionar con diversas moléculas como las proteínas por medio de reacciones covalentes que involucran al grupo tiol o con grupos amino de la guanosina para formar aductos cíclicos. De todos los aldehídos α,β -insaturados, la acroleína es el más electrófilo y muestra una gran reactividad con las proteínas (Uchida, 1999; Kehrer y Biswal, 2000).

1.2.2.2 Proteínas

La modificación oxidativa de las proteínas por ROS y RNS está implicada en la patogénesis asociada al envejecimiento natural y al desarrollo y progresión de enfermedades neurodegenerativas.

El OH^\cdot es capaz de atacar residuos de aa en moléculas proteicas, estas reacciones inducen un extensivo entrecruzamiento proteína-proteína. El O_2^\cdot puede reaccionar con el NO para generar peroxinitrito. Este compuesto, aunque no es un radical libre, tiene la capacidad de comportarse como el OH^\cdot induciendo la oxidación de proteínas generando nitración de tirosinas, formando 3-NT. La formación de 3-NT está marcadamente favorecida en presencia de CO_2 . El peroxinitrito juega un papel fundamental en el daño asociado a la excitotoxicidad.

La oxidación proteica en muchos tejidos, incluido el cerebro, ha sido propuesto como un mecanismo que explica el déficit funcional asociado a la edad, particularmente la modificación e inactivación oxidativa de las proteínas mitocondriales asociadas a la cadena transportadora de electrones.

No existe un esquema de clasificación para las modificaciones oxidativas que las proteínas sufren, sin embargo generalmente se considera:

- El tamaño de los productos de dicha modificación oxidativa. La proteína puede ser fragmentada para formar productos de menor peso molecular o puede entrecruzarse para formar productos de mayor peso molecular.
- El sitio del daño oxidativo. El daño en la proteína se puede generar en el enlace peptídico o en la

cadena lateral.

-El agente oxidante. El daño en proteínas puede generarse por la acción directa de ROS o por medio de subproductos reactivos de las ROS con carbohidratos y lípidos.

El marcador más utilizado para evaluar la oxidación de proteínas es la presencia de grupos carbonilos, los cuales se forman por la oxidación de las cadenas laterales en residuos de lisina, prolina, arginina y treonina. Además de la oxidación directa en cadenas laterales, el grupo carbonilo se puede introducir en proteínas por la reacción de adición de Michael del 4-HNE.

1.2.2.3 DNA

La repercusión que el daño oxidativo de macromoléculas tiene en las funciones celulares depende en gran medida de los niveles de ROS involucrados, de los niveles de las defensas antioxidantes y también de la tasa de recambio de las macromoléculas afectadas. Si el recambio es continuo, el daño oxidativo no se acumula y puede no tener repercusiones críticas en el funcionamiento celular.

Este no es el caso del DNAn, el cual posee toda la información que la célula necesita para realizar sus funciones y la acompañará a lo largo de su vida, por lo tanto el daño al DNA representa una seria amenaza para la homeostasis celular. Si el daño al DNA es severo o si su acumulación excede la capacidad de los mecanismos de reparación, se induce senescencia o muerte celular programada como un mecanismo que asegure la homeostasis tisular y sistémica.

Se ha observado que dosis subletales de H₂O₂ pueden generar ruptura de la doble hélice del DNA y posteriormente una regulación a la alta de p53 y p21, lo que conlleva al arresto del ciclo celular (Chen et al., 2004, Chen et al., 2005). Cuando este daño es reparado por la maquinaria celular, algunas células pueden reingresar al ciclo celular; sin embargo, cuando el daño no es reparado se desencadenan procesos de senescencia o apoptosis. (Chen et al., 2004, Chen et al., 2007).

Las ROS son los principales agentes endógenos que generan daño al DNA, por lo tanto cualquier modificación en los niveles de oxidantes y antioxidante tendrán repercusiones sobre el estado del DNA. Se ha observado por ejemplo, que mutaciones en SOD1 se asocian a la forma familiar de ALS y a senescencia prematura en fibroblastos (Rosen et al., 1993; Blander, 2003). De igual forma, el daño oxidativo al DNAn por la acción de ROS ha sido propuesto como parte de uno de los mecanismos fundamentales que subyacen al daño cerebral posterior a un proceso isquémico permanente o transitorio (Chen et al., 1997; Nagayama et al., 2000).

La formación y acumulación de 8-hydroxyl-2'-deoxyguanosina (8-oxo-dG) es una de las

modificaciones oxidativas más comunes en las bases. Este daño es causado por el radical OH y puede afectar genes activos en las células que lo presenten (Cui et al., 1999). Por esta razón, los niveles de 8-oxo-dG han sido utilizado como un parámetro de lesiones oxidativas en el DNA en diversos estudios; sin embargo, los niveles exactos de daño oxidativo al DNA son difíciles de calcular porque la oxidación de la guanina puede deberse en parte a la preparación del DNA durante su análisis. Esto ha resultado en diferencias de hasta tres órdenes de magnitud en los resultados publicados sobre 8-oxo-dG (Collins, 2004; Gedik, Collins., 2005).

En respuesta a este daño oxidativo del DNA, muchos mecanismos de reparación ampliamente caracterizados se activan para mantener la integridad genómica y el funcionamiento de los genes afectados. Uno de éstos es la 8-oxoguanina glicosilasa del DNA, que es una enzima de reparación del DNA presente en el cerebro de mamíferos que funciona por medio de la vía de escisión de base y que elimina a la 8-oxo-dG del DNA oxidado (Araneda et al., 2005).

Las mitocondrias tienen un genoma propio, el cual es una doble hélice de DNA circular de aproximadamente 16kpb. El DNAm_t de los mamíferos contiene 37 genes, que codifican para 13 componentes polipeptídicos de la cadena respiratoria así como para RNAr y RNAt necesario para síntesis proteica intramitocondrial (Lin MT, Beal MF., 2006). El DNAm_t es extremadamente vulnerable al ataque por ROS debido a que se encuentra cerca de la membrana interna mitocondrial, sitio de producción máxima de ROS. El DNAm_t no posee histonas que lo protejan y la mitocondria no cuenta con las enzimas necesarias para la reparación por escisión de nucleótidos (Balaban et al., 2005). Así, Wallace et al. (1992) demostraron que el daño oxidativo al DNAm_t aislado de diversas regiones cerebrales es por lo menos 10 veces mayor a la del DNA nuclear.

Se cree que el daño al DNAm_t puede causar un desacoplamiento en la cadena transportadora de electrones incrementando aún más los niveles de ROS, se ha observado que mutaciones puntuales en DNAm_t incrementa los niveles de ROS intracelular. (Beal, 2005; Kujoth et al., 2007)

2. ANTECEDENTES

El cerebelo está compuesto por aproximadamente 80% de NGC, de las cuales casi el 50% serán eliminadas durante el desarrollo de dicha estructura (Hatten y Heintz, 1995). Los cultivos primarios de cerebelo son un excelente modelo para estudiar la apoptosis que ocurre durante el desarrollo debido a que éstos presentan muchas de los eventos del desarrollo *in vivo* de las NGC (Gallo et al. 1987). Estos cultivos son muy abundantes en neuronas (95%), de las cuales el 90% de ellas son NGC (Morán y Patel, 1988).

Cuando las NGC se cultivan en concentraciones fisiológicas de potasio (5mM; K5) por más de 5 DIV mueren presentando características apoptóticas. Así, las NGC deben ser cultivadas en condiciones despolarizantes (25 mM KCl; K25) para sobrevivir. Cuando NGC son cultivadas en K25 y transferidas a un medio sin suero con K5 la mayoría de las células mueren en un periodo comprendido entre 24 y 48 horas. La muerte inducida por K5 en NGC presenta características apoptóticas como la activación de caspasa-3 y condensación del DNA (D'Mello et al., 1993; Gallo et al., 1995; Schultz et al., 1996). Dicha muerte puede ser retardada o incluso evitada en presencia de inhibidores específicos para caspasas.

La supervivencia y diferenciación de estos cultivos se incrementa en presencia de altas concentraciones de potasio (25mM; K25), de agonistas a receptores glutamatérgicos como el NMDA (Morán y Patel 1989) o en presencia de agentes que aumentan la concentración intracelular de AMPc [14]. La despolarización de las NGC induce la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de calcio sensibles a voltaje (Suzuki et al. 2005). Esta entrada de Ca^{2+} activa a CaMK, lo cual se ha propuesto que es semejante a lo que ocurre *in vivo* cuando las fibras musgosas de los núcleos pontinos estimulan a las NGC durante el día postnatal 12.

Se ha demostrado que durante la muerte apoptótica inducida por falta de factores tróficos se genera una condición prooxidante y que si esta condición es inhibida por medio de antioxidantes, el proceso apoptótico puede ser evitado total o parcialmente (Atlante et al., 2000; Castilho et al., 1999; Itoh et al., 1999; Schulz et al., 1996). Cuando las NGC son transferidas a K5 existe un pico de producción de ROS alrededor de las 3-4 horas, antes de que aparezcan los parámetros característicos de muerte apoptótica como la actividad de caspasa-3 o la translocación de fosfatidilserina. Se sabe que hasta las primeras 4 horas, la administración de antioxidantes puede prevenir de la muerte a las NGC, pero después de este tiempo, probablemente una vez que el programa apoptótico ha sido inducido y se encuentra en marcha, los antioxidantes ya no pueden rescatar de la muerte (Valencia y Moran, 2001).

3. OBJETIVOS

1.1. Objetivo general

- Evaluar la presencia de productos de LPO en NGC durante la muerte apoptótica inducida por K5.
- Dilucidar si esta peroxidación es un proceso inespecífico o no. De no serlo, establecer si es parte ejecutora o iniciadora del proceso de muerte.

1.2. Objetivos particulares

- Observar el cambio en la viabilidad de las NGC al ser transferidas a un medio con bajo potasio.
- Evaluar la presencia de ROS a lo largo del proceso apoptótico de las NGC transferidas a un medio con bajo potasio.
- Evaluar el efecto que las ROS tienen sobre los fosfolípidos membranales a lo largo del proceso apoptótico de las NGC transferidas a bajo potasio.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Cultivo de Neuronas Granulares de Cerebelo

Los cultivos de Neuronas granulares de cerebelo (NGC) se realizaron de acuerdo a lo descrito por Morán y Patel en 1989. Brevemente. Se obtuvo una suspensión celular al disociar con tripsina y ADNasa los cerebelos provenientes del cerebelo de ratas Wistar neonatas de 7-8 días. Las neuronas fueron sembradas, en promedio, a una densidad de 265×10^3 células por mililitro de medio en cajas de cultivo (cajas Petri) tratadas con hidrobromuro de poli-L-lisina a una concentración de 5-25 $\mu\text{g/ml}$ durante 24 horas previas al sembrado de las neuronas. El medio de cultivo contuvo medio basal de Eagle suplementado con 10% v/v de suero fetal bovino inactivado por calor, 2 mM de glutamina, 25 mM de KCl, 50 u/ml de penicilina y 50 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomina. Las células sembradas en estas cajas fueron incubadas a 37 °C en una atmósfera saturada con vapor de agua, con una presión parcial de CO₂ de 5% (95% de aire). Para evitar la proliferación de otros linajes celulares no neuronales se añadió citosina arabinosa 10 μM , 24 horas después de sembrar. Análisis inmunocitoquímicos han revelado que estos cultivos están constituidos por 95% de neuronas granulares (Balázs., 1988). Las células se mantuvieron por 7 días in vitro (DIV)

4.2 Inducción de muerte celular

La muerte celular de las NGC se indujo por una reducción en la concentración del potasio extracelular de acuerdo a lo reportado previamente (Moran y Patel, 1989). Para ello, las NGC fueron sembradas en condiciones despolarizantes en un medio con 25 mM de KCl durante 7 DIV. Posteriormente, los cultivos se transfirieron a un medio de composición idéntica, pero con una concentración de potasio de 5mM. Bajo estas condiciones, las NGC mueren apoptóticamente después de 24-48 hs.

4.3 Viabilidad celular

La viabilidad se midió mediante la técnica de transformación de bromuro 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio (MTT) el cual se transforma en azul de formazán por la acción de deshidrogenasas. Para ello, los cultivos se incubaron durante 10 minutos con MTT (0.5 mg/ml) a 37°C; después de remover el medio se extrajo el azul de formazán con dimetil sulfóxido y se cuantificó

espectrofotométricamente a 570 nm. La absorbancia medida es directamente proporcional al número de células viables. Los resultados son expresados como valores relativos al control, que representa el 100%.

4.4 Determinación de Proteínas por el método de Bradford

La cuantificación de proteínas se realizó por medio del método colorimétrico de Bradford (1976). Brevemente, se preparó una curva estándar entre 0 y 17.5 µg de albúmina. Tanto a las muestras (3µL) como a la curva estándar se les agregaron 500µL de agua destilada y 1ml del reactivo de Bradford. La absorbancia se determinó a 595 nm.

4.5 TBARS

Los niveles de LPO se midieron en los homogenados por medio del método colorimétrico del ácido tiobarbitúrico de acuerdo al método establecido por Santamaría y colaboradores (2001). Brevemente, 500 µL del reactivo TBA (0.75 g TBA+ 15 g ácido tricloroacético + 2.54 mL HCl) se mezclaron con 250µL de los homogenados. Esta mezcla se calentó a 94°C durante 30 min. Posteriormente, las muestras se enfriaron durante 5 min en hielo y se centrifugaron a 4000×g durante 15 min. La densidad óptica del sobrenadante se midió en un espectrofotómetro Beckman DU640 a una longitud de onda de 532 nm. La concentración final de sustancias reactivas al TBA (TBARS) se calcula por la interpolación de una curva estándar de malondialdehído la cual es corregida por la cantidad de proteína empleada. Los resultados se expresan en nmoles de TBARS por mg de proteína.

4.6 Identificación de Dienes Conjugados

La identificación de dienos conjugados se realizó de acuerdo al método establecido por Raecknagel y Glende (Recknagel y Glende., 1984). Brevemente, el tejido se homogenizó en 1 ml de PBS (10mM, pH 7.4). Se realizó una extracción de los lípidos totales en el homogenado con cloroformo:metanol (2:1), las muestras se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos a 4°C y la fase orgánica se evaporó utilizando un baño seco con temperatura fija a 45°C. El residuo de la evaporación fue resuspendido en 1 ml de ciclohexano para el análisis espectrofotométrico a 233 nm. La cantidad de dienos conjugados se determinó utilizando un coeficiente de extinción molar de 25,200.

4.7 Detección de anión superóxido

La detección de anión superóxido se realizó utilizando dihidroetidio. Este compuesto, al oxidarse, se transforma en etidio, se intercala en las bases del DNA y emite fluorescencia roja. Los cultivos neuronales se incubaron durante 20 minutos con dihidroetidio (3.2 μM) en condiciones de oscuridad. Las células se lavaron 2 veces con PBS y se fijaron durante 7 minutos a 4°C con formaldehído al 3%. Los cultivos se observaron en un microscopio de epifluorescencia y se fotografiaron utilizando un filtro de rodamina (Ex 510-560 y Em 590) y un objetivo Nikon 20x. Se contó el número de células con núcleos rojos y se dividió esta cantidad entre el total de células presentes en el mismo campo.

4.8 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como las medias \pm SE. La significancia estadística de los resultados se determinó por medio de un análisis de variancia de una vía (ANOVA), seguido por el análisis post-hoc de Fisher's. La significancia utilizada fue de $P < .05$.

5. RESULTADOS

1.1. Efecto de K5 en la morfología y viabilidad de las NGC

Cuando las NGC son cultivadas en un medio con suero y una concentración despolarizante de potasio (K25), éstas sobreviven y maduran (Morán, 1989). Cuando estas células son transferidas a un medio con concentraciones bajas de potasio (5 mM, K5) ocurre una muerte masiva en un periodo de 24-48 horas. En la Fig. 6 se observa el efecto de la transferencia a un medio K5 en la morfología que de las NGC. Durante las primeras 6 horas del tratamiento con K5 no se aprecian cambios significativos en la morfología neuronal, los somas no presentan cambios evidentes en su forma y volumen y los procesos neuronales se encuentran íntegros y bien definidos (Fig. 6). Sin embargo, a partir de las 12 hs se pueden apreciar algunos cambios morfológicos asociados a un daño celular. Después de 18 horas, se aprecia un daño significativo claro consistente en una fragmentación de los procesos neuronales, encogimiento y pérdida de la integridad del soma, entre otras (Fig. 6)

Los resultados del análisis morfológico se corroboraron con la evaluación de la viabilidad celular utilizando la técnica de transformación de MTT. En la Fig. 7 se muestra la disminución de la viabilidad de NGC inducida por K5 medida por MTT. Los resultados muestran que durante las primeras 12 horas no existen cambios significativos en la viabilidad; sin embargo, a partir de este tiempo, la viabilidad comienza a disminuir alcanzando un valor aproximado de 50% a las 24 horas y de 80% a las 48 horas. Estos resultados coinciden también con lo reportado anteriormente (Valencia y Morán, 2001; Caballero-Benitez y Morán, 2003)

K25

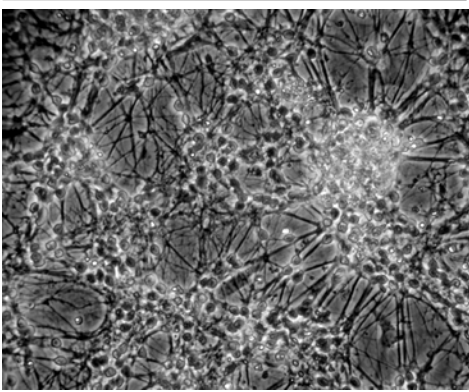
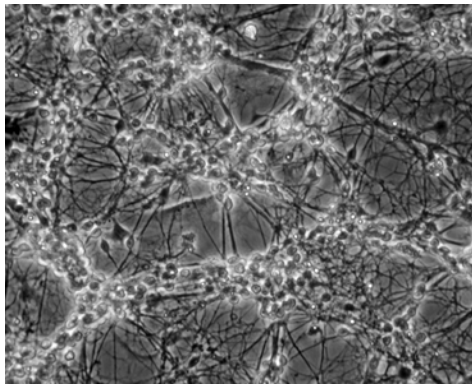


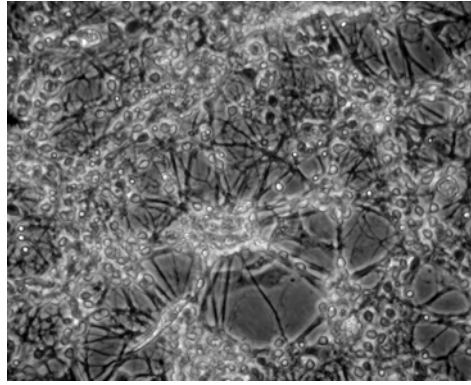
Fig.6. Efectos de la transferencia de las NGC de un medio K25 a uno con K5 en la morfología celular. Las células se cultivaron por 7 DIV y se transfirieron de un medio con K25 a uno con K5. Las células se observaron en un microscopio de contraste de fases a los tiempos

K5

4h

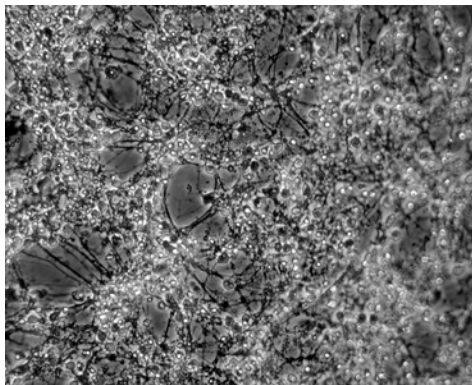


6h

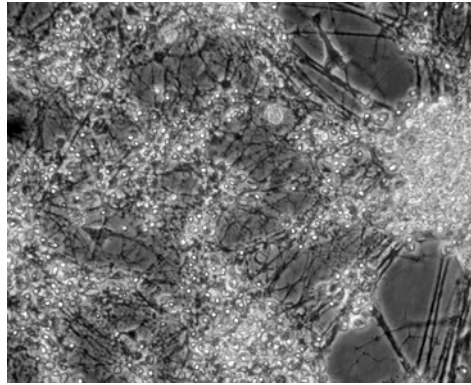


K5

12h



18h



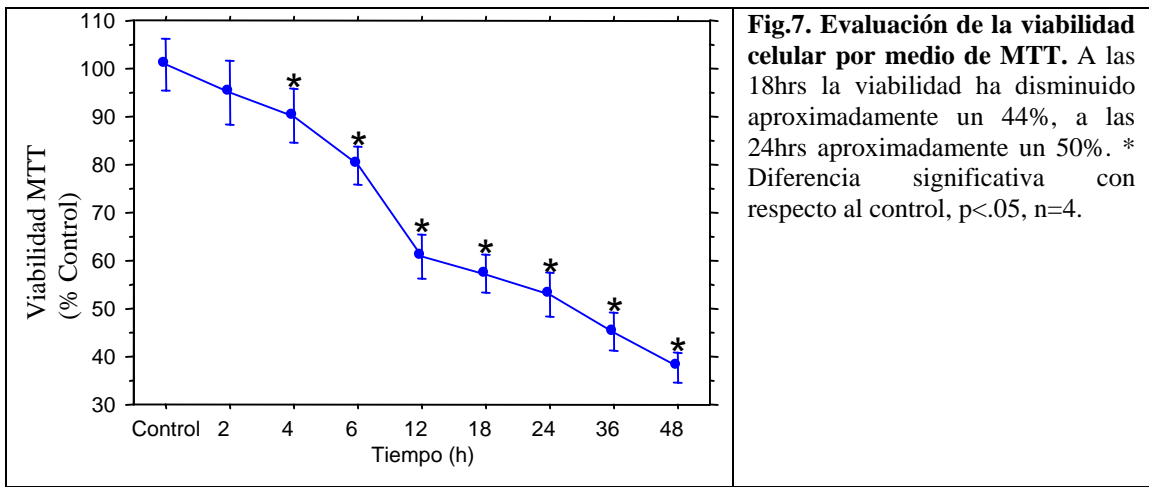
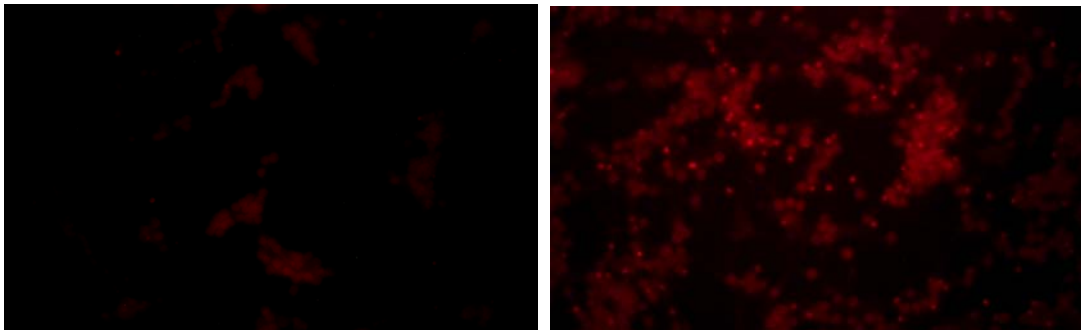


Fig.7. Evaluación de la viabilidad celular por medio de MTT. A las 18hrs la viabilidad ha disminuido aproximadamente un 44%, a las 24hrs aproximadamente un 50%. * Diferencia significativa con respecto al control, $p < .05$, $n=4$.

1.2. Efecto de K5 en la generación de ROS

Existen muchos reportes que demuestran la presencia y participación de ROS en el programa de muerte apoptótica (Buttke y Sandstrom, 1994; Hampton y Orrenius, 1997; Zamzani et al., 1995; Macho et al 1997). En nuestra preparación en particular, se ha reportado que posterior a la transferencia de K25 a K5 los niveles de ROS se incrementan a los 10 y 30 minutos, así como a las 3-4 horas. El uso de antioxidantes y prevención de la formación de ROS que ocurre a las 3-4 hrs evita la muerte de las NGC (Valencia y Morán, 2001).

La evaluación de la producción de $O_2^{\bullet-}$ se realizó por medio de la tinción con DHE de acuerdo al método descrito en “Materiales y métodos” a las 4 y a las 18 horas después de la transferencia a K5. Bajo estas condiciones encontramos que ocurre un incremento marcado en el número de células marcadas con etidio reflejando un aumento equivalente en los niveles de $O_2^{\bullet-}$ a las 4hrs después del tratamiento (Fig. 8). Después de 18 horas de tratamiento encontramos un segundo aumento en el número de células marcadas positivamente, el cual es significativamente mayor al encontrado a las 4 horas (Fig.8).



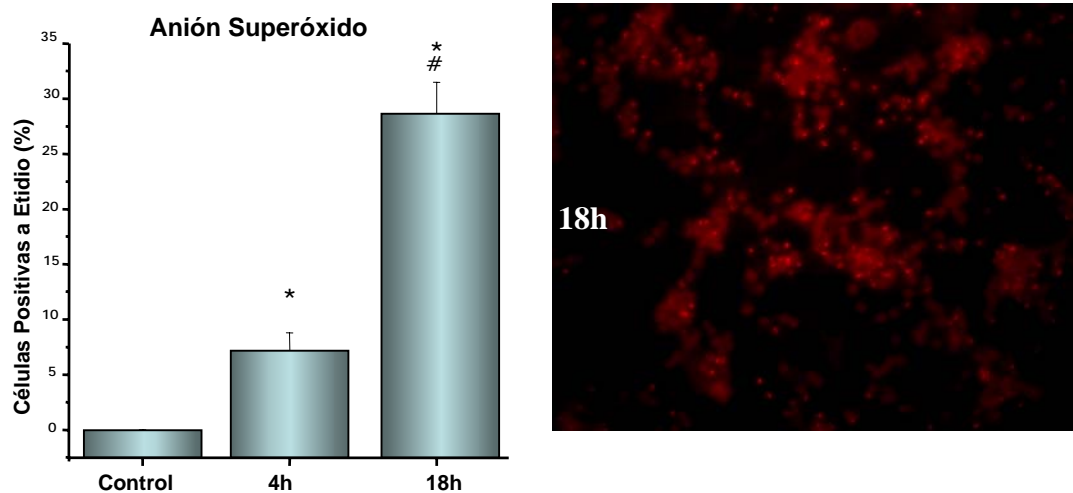


Fig.8. Efectos de la transferencia a un medio K5 en la producción de anión superóxido en las NGC. (A) Después del cambio al medio K5, las NGC se incubaron con DH después de 4hrs ó 18hrs. Las células se fijaron y la fluorescencia se midió inmediatamente después en un microscopio de epifluorescencia. Fotografías representativas de tres experimentos. (B) Cuantificación del número de células positivas a etidio. Los resultados se expresan como la media \pm S.E.M. para cuatro experimentos. * $P < 0.05$ en comparación con el control, # $P < 0.05$ en comparación con 4hrs

1.3. Dienes Conjugados (DC)

Para evaluar la peroxidación en las NGC tratadas con K5 se midieron los niveles de DC como parámetro de peroxidación lipídica. La evaluación se realizó a diferentes tiempos de acuerdo con lo establecido en “Materiales y Métodos”. La figura 8 muestra que los niveles de DC en los lípidos totales se incrementan aproximadamente un 47% después de 4hrs. Este incremento de los DC es transitorio y desde las 6hrs hasta las 12hrs los niveles no son estadísticamente diferentes a los presentes en los controles mantenidos en K25. A tiempos más largos encontramos un segundo incremento de dienos conjugados después de 18hrs, que se mantiene incluso hasta las 24hrs.

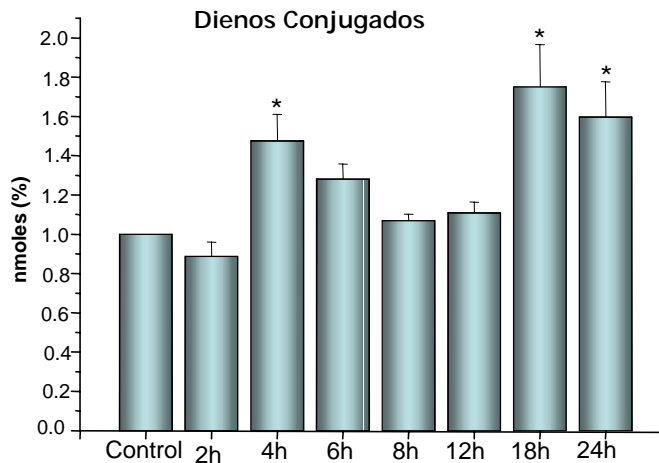
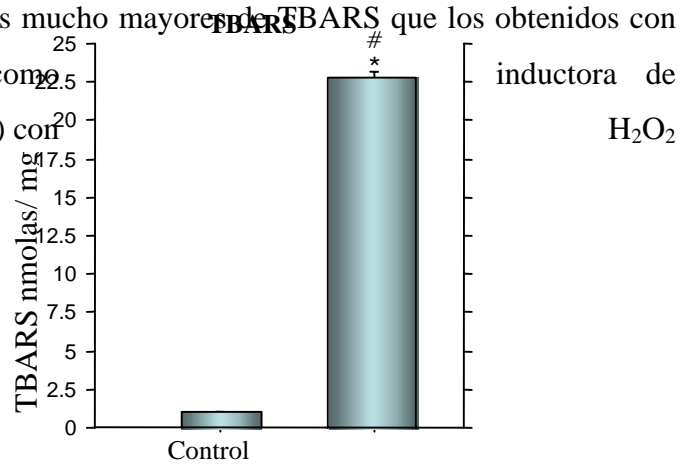


Fig.8. Cuantificación de los dienos conjugados después de la transferencia a K5. La cantidad de dienos conjugados se calculó utilizando el coeficiente de extinción molar de 25,200. Los resultados se expresan como porcentaje del control \pm S.E.M. de 8 diferentes experimentos. * $P < 0.05$ en comparación con el control.

1.4. Sustancias Reactivas al TBA (TBARS)

De manera complementaria evaluamos la presencia de TBARS como un indicador de los productos finales de la lipoperoxidación. Dado que los ensayos de DC y de TBARS se utilizan indistintamente como un índice de daño oxidativo en membranas, no esperábamos que los resultados difirieran entre sí. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre para los DC, no se encontraron cambios en los niveles de TBARS a las 4hrs con respecto al control, este punto es central para nuestra discusión. La Figura 9, muestra que las TBARS se incrementaron de manera significativa sólo hasta las 18 hrs del tratamiento con K5, manteniéndose los mismos niveles hasta después de 24hrs. En una serie de ensayos paralelos encontramos que las NGC pueden alcanzar niveles mucho mayores de TBARS que los obtenidos con K5. Para ello utilizamos una condición conocida como inductora de lipoperoxidación, la aplicación de Fe_2SO_4 ($200\mu\text{M}$) con H_2O_2 ($100\mu\text{M}$) (Fig. 9)



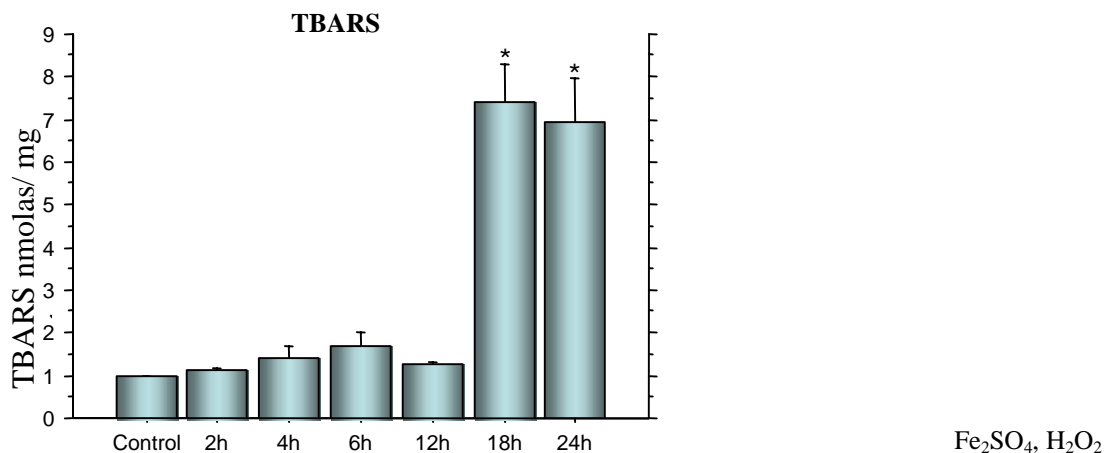


Fig.9. Curso temporal de TBARS después de la transferencia a medio K5. La cantidad de sustancias reactivas al TBA no cambia de manera significativa durante las primeras horas. Después de 18 y 24 horas se detectaron niveles significativamente mayores de TBARS en relación al control. Los resultados se expresan como la media \pm S.E.M. de nmolas/mg proteína para 8 diferentes experimentos. * $P < 0.05$ comparado contra el control. # $P < 0.05$ comparado contra 18hrs.

2. DISCUSIÓN

En este estudio encontramos que el tratamiento de las NGC con K5 induce la generación de ROS, probablemente $O_2^{\cdot-}$, a diferentes tiempos. En particular detectamos dos episodios de estrés oxidativo: uno a las 4 horas y un segundo, de mayor intensidad, a las 18 horas posterior al tratamiento con K5. La importancia del primer evento de generación de ROS (4 hrs) en el proceso de muerte ha quedado de manifiesto por una serie de ensayos en los que se demostró, con el uso de antioxidantes, que la eliminación de este evento temprano prácticamente elimina la muerte inducida por K5 (Valencia y Moran, 2001).

Dados los cursos temporales de la aparición de los primeros eventos de la muerte apoptótica, como translocación de fosfatidilserina y activación de caspasa, que ocurren alrededor de las 5-8 horas, sugerimos que este primer evento de estrés oxidativo podría tener un papel de señalización temprana. Esta idea está de acuerdo con nuestros resultados de viabilidad en los que encontramos que las células no sufren cambios, tanto a nivel morfológico metabólico, durante o alrededor del primer evento de estrés oxidativo (4hrs), sino hasta después de 12-18 horas.

Con la idea de correlacionar los cambios detectados en los niveles de ROS con el proceso lipoperoxidación (LPO), evaluamos los cambios temporales en los niveles de DC, un producto transitorio temprano en la LPO, y de MDA, un producto tardío en este proceso peroxidativo.

Generalmente el ensayo para la identificación de DC y el método de TBARS para detectar MDA son utilizados de manera indistinta como marcadores de daño oxidativo en lípidos membranales; sin embargo es importante recalcar que dichos ensayos evalúan el daño oxidativo en diferentes puntos de la reacción de LPO. El primer ensayo detecta la presencia de lípidos con conformación de DC incluyendo a los hidroxiperoxidienos, los cuales son los productos transitorios de la oxidación de lípidos (Hahm y Min 1994; Pike 2002). El segundo ensayo, detecta la formación de sustancias reactivas al tiobarbiturico (TBARS), la cual es una característica de las etapas finales de la reacción de LPO e indica la ruptura de lípidos peroxidados (como hidroxiperoxidienos conjugados) para generar aldehídos α,β -insaturados como el MDA (Adibhatla y Hatcher 2006).

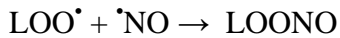
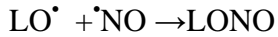
Considerando lo anterior encontramos una estrecha correlación temporal entre la generación de ROS y la formación de DC durante todos los tiempos evaluados. Como era de esperar, la formación de DC fue menor alrededor de las 4 horas y mayor alrededor de las 18-24 horas, coincidiendo con la cantidad de ROS generadas durante estos periodos de tiempo.

De forma muy interesante, a diferencia de lo que observamos para los DC, los resultados obtenidos con MDA, uno de los productos terminales de la reacción de LPO, no correlacionaron con los resultados sobre la generación de ROS ni de DC. En particular, no detectamos MDA a tiempos cortos (4hrs), un tiempo en el que, como mencionamos antes, ocurre el episodio temprano de estrés oxidativo que resulta necesario para que la muerte apoptótica se lleve a cabo. En otros estudios, utilizando diferentes modelos experimentales (Husain et al., 1987; Tkáč et al., 2006), se ha reportado una falta de correlación entre los niveles de DC y MDA. Lo que permite sugerir que la generación de uno de los productos no implica necesariamente la formación del otro en el proceso peroxidativo. En este sentido, se ha sido sugerido incluso que la generación de estos dos productos por separado puede servir para evaluar el grado de daño oxidativo en la membrana, así como para seguir la cinética de la reacción lipoperoxidativa (Blokhina et al., 2003).

Desconocemos los mecanismos que operan en nuestra preparación para que la reacción de LPO a tiempos cortos se detenga hasta la formación de DC. Una posibilidad es que los DC formados se mantuvieran estables y detuvieran su procesamiento hasta MDA. Esta situación, sin embargo, resulta poco probable pues se sabe que la estabilidad de los DC ocurre en ausencia de metales, lo cual no sucede en sistemas biológicos, particularmente en neuronas donde los complejos metálicos y las metaloproteínas son abundantes y son capaces de reducir rápidamente a los hidroxiperoxidienos favoreciendo el avance de la reacción hasta formar MDA (Dix y Aikens, 1993).

Una posibilidad alternativa para explicar la generación de DC, pero no de MDA a tiempos cortos es la presencia de algún componente capaz de detener la reacción de LPO. Tal es el caso del

óxido nítrico (NO) o el peroxinitrito cuya efectividad para detener la reacción de LPO ha sido demostrada ampliamente (Alessenko et al., 2005; Schafer et al., 2002) por medio de reacciones del tipo:



Es pertinente mencionar que se ha demostrado que la transferencia de las NGC a un medio K5 induce la generación de NO a tiempos cortos, a través de un mecanismo que involucra la elevación en los niveles de GMPc (Bobba et al., 2007). ES necesario, sin embargo, estudiar el efecto que inhibidores del NO tienen sobre los niveles en los diferentes productos de la LPO.

Como mencionamos arriba, a pesar de que a las 4hrs hay un incremento significativo de O_2^\bullet y de DC, no se encuentran cambios significativos en la viabilidad, lo cual nos indica que las ROS podrían tener inicialmente una función de señalización que causa un ligero daño membranal pero que en términos generales dicho daño no interfiere con las funciones celulares de manera perjudicial, permitiendo el progreso del programa de muerte apoptótico de las NGC. Se ha sugerido que si el proceso de LPO está regulado estrictamente por la cinética de la reacción, la peroxidación de PUFAs podría tener una función protectora que evita los efectos deletéreos que el ataque de las ROS tendría sobre las proteínas. (Shewfelt y Purvis 1995). Sin embargo, para poder evaluar el grado de repercusión que el daño oxidativo tiene sobre la membrana es necesario evaluar parámetros funcionales de la membrana como fluidez, permeabilidad y su composición.

Cada vez existen más evidencias en contra de la postura tradicional que ve a la LPO como un proceso inespecífico consecuencia de la pérdida homeostática celular. Por ejemplo, el uso de tioacetamida o la incubación de hígados de rata a 37°C post-mortem no generan eventos de LPO, sugiriendo que éste es un proceso inducido de manera activa (Wendel, 1987; Muriel, 1997). En nuestro modelo, observamos que otras condiciones como Fe_2SO_4 y H_2O_2 inducen un proceso de LPO mucho mayor que el generado por K5, lo cual indica que estas células tienen un potencial de peroxidación muy por arriba de los niveles detectados con el estímulo apoptótico de K5.

Nuestros resultados indicaron una recuperación en los niveles basales de DC a las 6hrs, que se mantiene hasta las 12hrs, lo cual nos sugiere que, además de la inhibición en el avance de la reacción de LPO, los lípidos oxidados podrían estar siendo removidos. Se ha reportado que, entre los fosfolípidos membranales, las fosfolipasas A₂ y C utilizan preferentemente aquellos fosfolípidos que están oxidados para su posterior hidrólisis (Sevanian and Kim, 1986), lo que evidentemente podría

considerarse como un mecanismo de detoxificación (van Kuijk et al., 1987).

Finalmente, bajo nuestras condiciones identificamos también un segundo incremento en los niveles de $O_2^{\bullet-}$ a las 18hrs. Este incremento fue de mucha mayor intensidad que el primero. Durante este tiempo encontramos niveles altos tanto de DC como MDA y solamente 58% de la población neuronal viva. La presencia de productos tardíos (MDA) de la reacción de LPO hasta las 18hrs, nos indica que las ROS podrían tener a tiempos largos una función efectora dentro del programa de muerte apoptótica.

7. CONCLUSIONES

En este estudio obtuvimos una serie de resultados que nos permiten concluir que ocurre un proceso de LPO asociado a la muerte apoptótica inducida por bajo potasio en NGC, lo que correlaciona temporalmente con la generación de ROS tanto a tiempos cortos (4hrs) como a tiempos largos (18hrs). Sin embargo, el hecho de que los DC, uno de los productos tempranos de la LPO, se encuentre tanto a las 4hrs como a las 18hrs después del cambio a K5, contrario a lo observado para el MDA, un producto final de la LPO, sugiere diferentes acciones de los ROS, incluido un posible papel como señal temprana en el proceso de muerte apoptótica.

REFERENCIAS

- Abraham MC, Shaham S (2004) Death without caspases, caspases without death; *Trends Cell Biol* 14(4):184-193.
- Abuja PM, Esterbauer H. (1995) Simulation of lipid peroxidation in low-density lipoprotein by a basic "skeleton" of reactions. *Chem Res Toxicol.* 8(5):753-63.
- Adams JM, Cory S (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival; *Science* 281:1322-1326.
- Adibhatla R.M., Hatcher J.F. (2006) Phospholipase A2, reactive oxygen species, and lipid peroxidation in cerebral ischemia. *Free Radical Biology and Medicine*, 40 (3), pp. 376-387.
- Adibhatla RM, Hatcher JF, Dempsey RJ. (2003) Phospholipase A2, hydroxyl radicals, and lipid peroxidation in transient cerebral ischemia. *Antioxid Redox Signal.* 5(5):647-54.
- Akhlaq A. Farooqui, Lloyd A. Horrocks(1998) Lipid Peroxides in the Free Radical Pathophysiology of Brain Diseases. *Cellular and Molecular Neurobiology*, Vol. 18, No. 6.
- Alavez S, Pedroza D, Moran J (2003) Mechanisms of cell death by deprivation of depolarizing conditions during cerebellar granule neurons maturation; *Neurochem Int* 43(6):581-90.
- Alessenko AV, Bugrova AE, Dudnik LB. (2004) Connection of lipid peroxide oxidation with the sphingomyelin pathway in the development of Alzheimer's disease. *Biochem Soc Trans.* 32(1):144-6.
- Alessenko AV, Shupik MA, Bugrova AE, Dudnik LB, Shingarova LN, Mikoyan A, Vanin AF (2005) The relation between sphingomyelinase activity, lipid peroxide oxidation and NO-releasing in mice liver and brain. *FEBS Lett.* 579(25):5571-6.
- Arakawa M, Ishimura A, Arai Y, Kawabe K, Suzuki S, Ishige K, Ito Y.(2007) N-Acetylcysteine and ebselen but not nifedipine protected cerebellar granule neurons against 4-hydroxynonenal-induced neuronal death. *Neurosci Res.* 57(2):220-9.
- Araneda, S., Pelloux, S., Radicella, J.P., Angulo, J., Kitahama, K., Gysling, K., Forray, M.I.,(2005) 8-oxoguanine DNA glycosylase, but not Kin17 protein, is translocated and differentially regulated by estrogens in rat brain cells. *Neuroscience* 136, 135-146.
- Balaban,R.S., Nemoto,S. and Finkel,T. (2005) Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*, 120, 483–495.
- Barry Halliwell (2006) Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *Journal of Neurochemistry* 97 (6), 1634–1658.
- Beal,M.F. (2005) Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. *Ann. Neurol.*, 58, 495–505.
- Benedict CA, Norris PS, Ware CF (2002) To kill or be killed: viral evasion of apoptosis; *Nat. Immunol.* 3:1013-1018.
- Bezvenyuk Z, Salminen A, Solovyan V. (2000) Excision of DNA loop domains as a common step in caspase dependent and -independent types of neuronal cell death. *Brain Res Mol Brain*

Res.81:191-6.

- Bibel M, Barde YA. (2000) Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev.* 14:2919-37.
- Blander G., de Oliveira R.M., Conboy CM, Haigis M. Guarente L. (2003) Superoxide dismutase 1 knock-down induces senescence in human fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 278, 38966–38969.
- Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot (Lond)*. Jan;91 Spec No:179-94.
- Bobba A, Atlante A, Moro L, Calissano P, Marra E (2007) Nitric oxide has dual opposite roles during early and late phases of apoptosis in cerebellar granule neurons; *Apoptosis* 12(9):1597-610.
- Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 7;72:248-54.
- Burgoyne RD, Cambray-Deakin MA (1988) The cellular neurobiology of neuronal development: the cerebellar granule cell; *Brain Res* 472(1):77-101. Revisión.
- Buttke TM, Sandstrom PA. (1994) Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol. Today* 15:7–10.
- Caballero-Benitez A and Moran, J. (2003) Caspase activation pathways induced by staurosporine and low potassium: Role of caspase-2 *J. Neurosci. Res.* 71: 383.
- Cagnoli CM, Kharlamov E, Atabay C, Uz T, Manev H (1996) Apoptosis induced in neuronal cultures by either the phosphatase inhibitor okadaic acid or the kinase inhibitor staurosporine is attenuated by isoquinolinesulfonamides H-7, H-8, and H-9; *J Mol Neurosci* 7(1):65-76.
- Chandra J, Samali A, Orrenius S. (2000) Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 29(3-4):323-33.
- Chang HY, Yang X (2000) Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases; *Microbiol Mol Biol Rev* 64(4):821-846.
- Chen JH, Stoeber K, Kingsbury S, Ozanne SE, Williams GH, Hales CN. (2004) Loss of proliferative capacity and induction of senescence in oxidatively stressed human fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 279, 49439–49446.
- Chen, J., Jin, K., Chen, M., Pei, W., Kawaguchi, K., Greenberg, D.A., Simon, R.P., 1997. Early detection of DNA strand breaks in the brain after transient focal ischemia: implications for the role of DNA damage in apoptosis and neuronal cell death. *J. Neurochem.* 69, 232–245.
- Chen, J.H., Ozanne,S.E. and Hales,C.N. (2005) Heterogeneity in premature senescence by oxidative stress correlates with differential DNA damage during the cell cycle. *DNA Repair (Amst.)*, 4, 1140–1148.
- Chen, J.H., Ozanne,S.E. and Hales,C.N. (2007) Methods of induction of cellular senescence using oxidative stress. In Tollefsbol,T.O. (ed.), *Methods in Molecular Biology: Biological Aging: Methods and Protocols*, Vol. 371. Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp. 179–189.
- Choe E, Min DB (2006) Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 46(1):1-22.

- Cimino F, Esposito F, Ammendola R, Russo T (1997) Gene regulation by reactive oxygen species; *Curr Top Cell Regul* 35:123-48. Revisión.
- Clarke PGH (1999) Developmental cell death: Morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embriol* 181:195-213.
- Collins, A.R., Cadet, J., Moller, L., Poulsen, H.E. and Vina, J. (2004) Are we sure we know how to measure 8-oxo-7,8-dihydroguanine in DNA from human cells? *Arch. Biochem. Biophys.*, 423, 57–65.
- Cui, J., Holmes, E.H., Liu, P.K., 1999. Oxidative damage to the c-fos gene and reduction of its transcription after focal cerebral ischemia. *J. Neurochem.* 73, 1164-1174.
- Danial NN, Korsmeyer SJ (2004) Cell death: critical control points; *Cell*, 116:205-219.
- Dix TA, Aikens J. (1993) Mechanisms and biological relevance of lipid peroxidation initiation, *Chem. Res. Toxicol.* 6:2–18.
- D'Mello SR, Galli C, Ciotti T, Calissano P. (1993) Induction of apoptosis in cerebellar granule neurons by low potassium: inhibition of death by insulin-like growth factor I and cAMP. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(23):10989-93.
- Eckhart L, Ballaun C, Uthman A, Kittel C, Stichenwirth M, Buchberger M, Fischer H, Sipos W, Tschachler E. Identification and Characterization of a Novel Mammalian Caspase with Proapoptotic Activity. *J. Biol. Chem.* 280: 35077-35080.
- Edinger AL, Thompson CB (2004) Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy; *Curr. Opinion in Cell Bio* 16:663-669
- Edinger AL, Thompson CB (2004) Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy; *Curr. Opinion in Cell Bio* 16:663-669.
- Esterbauer H., Schaur R.J. and H. Zollner (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes, *Free Radic Biol. Med.* 11, pp. 81–128.
- Farooqui AA, Horrocks LA, Farooqui T. (2007) Interactions between neural membrane glycerophospholipid and sphingolipid mediators: a recipe for neural cell survival or suicide. *J Neurosci Res.* 85(9):1834-50.
- Gallo V, Kingsbury A, Balazs R, Jorgensen OS (1987) The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture; *J Neurosci* 7(7):2203-13.
- Gedik, C.M. and Collins, A. (2005) Establishing the background level of base oxidation in human lymphocyte DNA: results of an interlaboratory validation study. *FASEB J.*, 19, 82–84.
- Green D.R., J.C. Reed, (1998) Mitochondria and apoptosis, *Science* 281, pp. 1309–1312.
- Hahm TS, Min DB. 1994. Analyses of peroxide values and headspace oxygen. En: Warner K, Eskin NAM, editors. *Methods to assess quality and stability of oils and fat-containing food.* Champaign, Ill.: AOCS Press. p 144–8.
- Halliwell B, Gutteridge JM (1992) Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update; *FEBS Lett* 307(1):108-12. Revisión.

- Hampton, M. B.; Orrenius, S. (1997) Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. *FEBS Lett.* 414:552–556.
- Hatten ME, Heintz N (1995) Mechanisms of neural patterning and specification in the developing cerebellum; *Annu Rev Neurosci* 18:385-408.
- Hengartner MO (2000) The biochemistry of apoptosis; *Nature* 407(6805):770-776.
- Husain SR, Cillard J, Cillard P. (1987) α -Tocopherol prooxidant effect and malondialdehyde production. *J Am Oil Chem Soc* 64:109–11.
- Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW (2002) Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy; *Cell* 108:153-164.
- Kehrer J.P, Biswal S.S.. (2000) The molecular effects of acrolein, *Toxicol. Sci.* 57, pp. 6–15
- Kerr J.F.R (2002) History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology* 181-182, 471-474.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 26:239-257.
- Koppenol WH (2001) The Haber-Weiss cycle - 70 years later; *Redox Rep* 6(4):229-34. Revisión.
- Kuida, K., Haydar, T.F., Kuan, C.Y., Gu, Y., Taya, C., Karasuyama, H., Su, M.S., Rakic, P., Flavell, R.A., 1998. Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell* 94, 325–337.
- Kuida, K., Zheng, T.S., Na, S., Kuan, C., Yang, D., Karasuyama, H., Rakic, P., Flavell, R.A., 1996. Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature* 384, 368–372.
- Kujoth,G.C., Bradshaw,P.C., Haroon,S. and Prolla,T.A. (2007) The role of mitochondrial DNA mutations in mammalian aging. *PLoS Genet.*, 3, e24.
- LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG, MacKenzie AE. (1998). The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* 17: 3247-3259.
- Levi-Montalcini R. (1966) The nerve growth factor: Its mode of action on sensory and sympathetic nerve cells. *Harvey Lect.* 60: 217-259.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, et al. (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade; *Cell* 91:479-489.
- Lin,MT. and Beal,M.F. (2006) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, 443, 787–795.
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c; *Cell* 86:147-157.
- Macho, A.; Hirsch, T.; Marzo, I.; Marchetti, P.; Dallaporta, B.; Susin, S. A.; Zamzami, N.; Kroemer, G. (1997) Glutathione depletion is an early and calcium elevation is a late event of thymocyte apoptosis. *J. Immunol.* 158:4612–4619.

- Mattson MP. (2000) Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nature Reviews of Molecular Cell Biology* 1: 120–130.
- Mattson MP. (2007) Calcium and neurodegeneration. *Aging Cell* 6 (3), 337–350.
- McCord JM (1994) Mutant mice, Cu,Zn superoxide dismutase, and motor neuron degeneration; *Science* 266(5190):1586-7.
- Medema JP, Scaffidi C, Kischkel FC, Shevchenko A, Mann M, Krammer PH, Peter ME. (1997) FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J.* 16:2794-804.
- Meier P, Finch A, Evan G (2000) Apoptosis in development; *Nature* 407, 796–801.
- Moran J, Itoh T, Reddy UR, Chen M, Alnemri ES, Pleasure D (1999) Caspase-3 expression by cerebellar granule neurons is regulated by calcium and cyclic AMP; *J Neurochem* 73(2):568-77.
- Moran J, Patel AJ. (1989) Effect of potassium depolarization on phosphate-activated glutaminase activity in primary cultures of cerebellar granule neurons and astroglial cells during development. *Developmental Brain Research* 46(1), 97-105.
- Mossman T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays; *J Immunol Methods* 65:55-63.
- Muriel P. 1997. Peroxidation of lipids and liver damage In “Oxidants, Antioxidants and Free Radicals”, (Baskin S.I. and Salem H. Ed.), Taylor & Francis Press Washington, D.C., pp 237-257.
- Nagayama T, Lan J, Henshall DC, Chen D, O'Horo C, Simon RP, Chen J. (2000) Induction of oxidative DNA damage in the peri-infarct region after permanent focal cerebral ischemia. *J Neurochem.* 75(4):1716-28.
- Nigam S, Schewe T. (2000) Phospholipase A2s and lipid peroxidation, *Biochim. Biophys. Acta* 1488, pp. 167–181.
- Nijhawan D, Honarpour N, Wang X (2000) Apoptosis in neural development and disease; *Annu Rev Neurosci* 23:73-87. Revisión.
- Oppenheim RW, Flavell RA, Vinsant S, Prevette D, Kuan CY, Rakic P. (2001) Programmed cell death of developing mammalian neurons after genetic deletion of caspases. *J Neurosci.* 21:4752-60.
- Oppenheim RW, Prevette D, Tytell M, Homma S (1990) Naturally occurring and induced neuronal death in the chick embryo in vivo requires protein and RNA synthesis: evidence for the role of cell death genes; *Dev Biol.* 138(1):104-113.
- Oppenheim RW. (1991) Cell death during development of the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 14:453-501.
- Parola M, Bellomo G, Robino G, Barrera G, Dianzani M.U. (1999) 4-Hydroxynonenal as a biological signal: molecular basis and pathophysiological implications, *Antioxid. Redox. Signal.* 1, pp. 255–284.
- Pericak-Vance MA, Haines J, Rouleau GA, Gusella JS, Horvitz HR, Brown RH. (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis.

Nature. 362, 59–62.

- Pike OA. 2002. Fat characterization. en: NielsenSS, editor. Food Analysis. 3rd ed. New York. Kluwer Academic Plenum Publishers. p 227–46.
- Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG (2003) Necrosis: A specific form of programmed cell death; Exp. Cell Res. 283:1-16.
- Raff MC, Barres BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD (1993) Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system; Science 29;262(5134):695-700 Revisión.
- Rathmel JC, Thompson CB (2002) Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease; Cell 109:S97-S107.
- Recknagel RO, Glende EA Jr. (1984) Spectrophotometric detection of lipid conjugated dienes. Methods in enzymology. 105, 331-7.
- Reed JC (1997) Cytochrome c: Can't live with it--can't live without it; Cell 91:559-562.
- Remacle J, Raes M, Toussaint O, Renard P, Rao G (1995) Low levels of reactive oxygen species as modulators of cell function; Mutat Res 316(3):103-22. Revisión.
- Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng Han-Xiang, Rahmani Z, Krizus A, McKenna-Yasek D, Cayabyab A, Gaston SM, Berger R, Tanzi RE, Halperin JJ, Herzfeldt B, den Bergh RV, Hung Wu-Yen, Bird T, Deng G, Mulder DW, Smyth C, Laing NG, Soriano E, Rotonda J, Nicholson DW, Fazil KM, Gallant M, Gareau Y, Labelle M, Peterson EP, Rasper DM, Ruel R, Vaillancourt JP, Thornberry NA, Becker JW. (1996) The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. Nat Struct Biol. 3:619-625.
- Samejima K & Earnshaw WC (2005) Trashing the genome: the role of nucleases during apoptosis Nature Reviews Molecular Cell Biology 6, 677-688.
- Santamaría A, Galván-Arzate S, Lisý V, Ali SF, Duhart HM, Osorio-Rico L, Ríos C, St'astný F. (2001) Quinolinic acid induces oxidative stress in rat brain synaptosomes. Neuroreport 12(4), 871-874.
- Sastry PS, Rao KS (2000) Apoptosis and the nervous system; J Neurochem 74(1):1-20. Revisión. Zou H, Li Y, Liu X, Wang X (1999) An APAF-1 cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9; J. Biol. Chem. 274(17):11549-11556.
- Schafer FQ, Wang HP, Kelley EE, Cueno KL, Martin SM, Buettner GR (2002) Comparing b-carotene, vitamin E and nitric oxide as membrane antioxidants. Biol. Chem. 383: 671– 681.
- Schieberle P, Grosch W, Kexel H, Schmidt HL (1981) A study of oxygen isotope scrambling in the enzymic and non-enzymic oxidation of linoleic acid. Biochim Biophys Acta. 666(3):322-6
- Sevanian, A., Kim, E. (1986). Phospholipase A2 dependent release of fatty acids from peroxidized membrane. J. Free Radicals Biol. Med. 1:263–271.
- Shewfelt R.L. and Purvis A.C. (1995). Toward a comprehensive model for lipid peroxidation in plant tissue disorders. Hort. Science 30(2): 213-218.

- Stark G. (2005) Functional Consequences of Oxidative Membrane Damage . *Journal of Membrane Biology* 205 (1), 1-16.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. (1999) *Nature* 397:441-6.
- Thornberry N, Lazebnik Y (1998) Caspases: enemies within; *Science* 281:1312-1316.
- Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP, Rasper DM, Timkey T, Garcia-Calvo M, Houtzager VM, Nordstrom PA, Roy S, Vaillancourt JP, Chapman KT, Nicholson DW. (1997) A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem.* 272:17907-17911.
- Tkáč I, Molčányiová A, Javorský M, Kozárová M. (2006) Fenofibrate treatment reduces circulating conjugated diene level and increases glutathione peroxidase activity. *Pharmacological Research*, 53(3): 261-264
- Uchida K. (1999) Current status of acrolein as a lipid peroxidation product, *Trends Cardiovasc. Med.* 9, pp. 109–113.
- Valencia A., Moran J. (2001) Role of oxidative stress in the apoptotic cell death of cultured cerebellar granule neurons. *Neuroscience Research.* 1;64(3):284-97.
- Van Kuijk, F. J. G. M., Sevanian, A., Handelman, G. J., and Dratz, E. A. (1987). A new role for phospholipase A2: Protection of membranes from lipid peroxidation damage. *Trends Biochem. Sci.* 12:31–34.
- Wallace DC. (1992) Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases? *Science.* 1;256(5057):628-32.
- Wang VY, Zoghbi HY (2001) Genetic regulation of cerebellar development; *Nat Rev Neurosci* 2(7):484-91 Revisión.
- Wendel A. (1987) Measurement of in vivo lipid peroxidation and toxicological significance. *Free Radic Biol Med.* 3(5):355-8.
- Young IS, McEneny J. (2001) Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochem. Soc. Trans.* 29; 358–362.
- Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Decaudin D, Macho A, Hirsch T, Susin SA, Petit PX, Mignotte B, Kroemer G. (1995) Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J. Exp. Med.* 182:367–377.
- Zheng TS, Hunot S, Kuida K, Flavell RA. (1999) Caspase knockouts: matters of life and death. *Cell Death Differ.* 6:1043-53.