



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**CAMBIOS EN EL CITOESQUELETO
DE ASTROCITOS DE CEREBELO
BAJO CONDICIONES DE MUERTE CELULAR**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G O
P R E S E N T A :
MAURICIO ALEJANDRO OLGUÍN ALBUERNE



**FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM**

TUTOR: DR. JULIO MORÁN ANDRADE

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

A mi familia y compañeros de laboratorio por su apoyo enseñanzas.

A los miembros de mi jurado por sus valiosas sugerencias para la realización de este trabajo.

Este trabajo se llevó a cabo bajo la dirección del Dr. Julio Morán Andrade en el Departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología celular, UNAM, con el apoyo de los donativos correspondientes a los proyectos IN-222303 de PAPIIT y 47158-Q de CONACyT.

ÍNDICE

I. Introducción	4
1.1 Muerte celular	4
1.2 Tipos de muerte celular	4
1.21 Muerte células apoptótica	6
1.22 Muerte celular Necrótica	7
1.3 Células Gliales	9
1.4 Astrocitos	10
1.5 Citoesqueléto	12
1.51 Filamentos de actina	12
1.52 Microtúbulos	15
1.53 Filamentos intermedios	16
II. Antecedentes	18
III. Objetivos	20
IV. Materiales y métodos	21
5.1 Reactivos	
5.2 Cultivo celular	
5.3 Tratamientos	
5.4 Viabilidad celular	
5.5 Western blot	
5.6 Inmunohistoquímica	
5.6 Estadística	
V. Resultados	24
VI. Discusión	34
VII. Conclusiones	38
VIII. Referencias	39

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxiribonucléico
TNFα	Factor de necrosis tumoral α
ADP	Adenosín difosfato
AIF	Factor inductor de la apoptosis, por sus siglas en inglés
TM4SF	Tetraspaninas
IAP	Proteínas asociadas a integrinas
FAK	Cinasa de proteínas asociadas a adhesiones focales
Apaf1	Factor activador de proteasas apoptóticas
ATP	Adenosín trifosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
GABA	Ácido gama-aminobutírico, por sus siglas en inglés
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GTP	Guanosín trifosfato
MTOC	Centro organizador de microtúbulos
MAP	Proteínas asociadas a microtúbulos
HMW	Proteínas de alto peso molecular
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dipheniltetrazoliumbromide
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
SNC	Sistema nervioso central
St	Estaurosporina
ZSV	Zona sub-ventricular
VIH-SIDA	Virus de inmunodeficiencia humana- síndrome de inmunodeficiencia adquirida
ZBAD	Inhibidor general de caspasas
TBS	Amortiguador de sales Tris
BSA	Albúmina sérica bovina
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
DAPI	Tinción de cromatina
SDS-PAGE	Electroforésis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Muerte celular

El proceso de muerte celular es un evento con características muy variadas y consecuencias diferentes; este puede ocurrir fisiológicamente durante el desarrollo embrionario de un organismo pluricelular, donde la combinación entre proliferación y apoptosis es la responsable de moldear estructuras. En el estado adulto contribuye a la eliminación de células dañadas para mantener la homeostasis celular (Yuan J 2003)

Sin embargo la muerte celular también ocurre en condiciones patológicas, un ejemplo son las enfermedades neurodegenerativas como Parkinson y Alzheimer, donde se presenta una excesiva muerte celular (Thompson C 1995 ; Nijhawan D 2000). Contrario a esto, en el cáncer, el cual se caracteriza por bajos niveles de apoptosis, las células poseen una variedad de mutaciones que permiten a la célula ignorar las señales de regulación del crecimiento y proliferan más de lo normal (Hanahan D 2000).

1.2 Tipos de Muerte Celular

Tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, la muerte puede ocurrir de forma descontrolada como la muerte necrótica, o bien de forma programada. Uno de los tipos de muerte programada más común y estudiada es la muerte apoptótica. Los distintos tipos de muerte celular han sido definidos por criterios morfológicos y bioquímicos (Schweichel J 1973).

En estudios de muerte celular durante el desarrollo embrionario se identificaron diferentes tipos de muerte celular; el primer tipo, denominado "apoptosis" (Kerr J 1972) se caracteriza por condensación del citoplasma y de la cromatina, fragmentación del ADN y como formación de cuerpos apoptóticos, entre otros. El segundo tipo presenta como característica distintiva la formación de vacuolas autofágicas de origen lisosomal en el interior celular, engrosamiento del retículo endoplásmico y aparato de Golgi, así como ruptura de la membrana celular y nuclear, este tipo de muerte es definida como muerte "autofágica". Por su parte un último tipo de muerte celular definido como "necrosis" presenta hinchamiento de orgánulos lisosomales, formación de vacuolas no lisosomales y ruptura de la membrana (Kroemer G 2005).

En este trabajo se abordarán dos tipos de muerte celular: la muerte celular apoptótica y la muerte celular necrótica. A pesar de que estos dos tipos de muerte celular se definen claramente por distintos parámetros, esto no significa que un proceso u otro no presenten interconexiones o que puedan compartir características (Artal-Sanz M 2005). Cada vez se cuenta con un mayor número de evidencias que apoyan la existencia de un amplio rango de tipos de muerte celular donde apoptosis y necrosis representarían únicamente los extremos (Leist M 1998).

1.21 Muerte Celular Apoptótica

La apoptosis es un tipo de muerte celular controlada genéticamente que ha sido altamente conservada a lo largo de la evolución; proviene del término griego “*apoptoe-sis*” que indica la caída de las hojas de un árbol y hace referencia a la similitud morfológica entre ambos procesos (Granville D 1998). Se distingue de otros tipos de muerte por características morfológicas y bioquímicas. Entre los cambios morfológicos destacan: condensación de la cromatina, fragmentación del núcleo (karyorrhexis), encogimiento del soma celular (pyknosis), formación de cuerpos apoptóticos, dilatación del retículo endoplásmico y alteraciones en la membrana celular (Korsmeyer S 1995). Entre las características bioquímicas se encuentran; fragmentación del ADN, internalización de fosfatidil serina y activación de proteasas (Hengartner M 2000). Cabe destacar que no todas las características morfológicas ni bioquímicas aparecen forzosamente durante el proceso apoptótico (Kroemer G 1997; Kroemer G 2005).

La apoptosis puede ser inducida por distintos mecanismos y la sensibilidad de la célula a los estímulos de muerte depende de varios factores como la expresión de proteínas pro y anti-apoptóticas, la etapa del ciclo celular en la que se encuentre y la intensidad del estímulo inductor. Puede ser promovida por señales extracelulares (cuando un ligando inductor se une a receptores de muerte) y por señales intracelulares que generen un estrés celular (proteínas supresoras de tumores, oncogenes, privación de condiciones tróficas, estrés oxidativo e infecciones virales). Todas las señales convergen en una familia de proteasas de cisteína que degradan sus sustratos en residuos aspartato y que se conocen como caspasas. Estas proteasas se encuentran en el citoplasma como zimógenos y para activarse necesitan ser procesadas proteolíticamente por otras caspasas o autoprocesarse catalíticamente (Nicholson D 1997). Las caspasas son capaces de generar cascadas proteolíticas, donde unas funcionan como iniciadoras y otras como efectoras (Siegel R 1998; Thornberry N 1998).

Vía extrínseca

La apoptosis puede ser inducida por señales extracelulares como ligandos de receptores de muerte que pueden presentarse como factores solubles o expresados en la superficie de otra célula. Los receptores de muerte transmiten la señal apoptótica iniciada por ligandos específicos como son TNF α , Fas y TRAIL. Cuando la muerte se desencadena por esta vía el proceso es muy rápido (Ashkenazi A 1998). Una vez que se une el ligando al receptor existe un cambio conformacional en los dominios intracelulares del receptor de muerte, estos cambios activan el dominio de muerte, el cual permite la unión de proteínas adaptadoras, algunas podrán interactuar con caspasa 8 y de esta forma desencadenar la apoptosis (Muzio M 1998; Slee E 1999; Berglund H 2000; Thorburn A 2004).

Vía intrínseca

La apoptosis también se puede iniciar por un estrés celular que induce la liberación de proteínas mitocondriales. La mitocondria tiene un papel importante en la regulación de la muerte celular liberando algunas proteínas pro-apoptóticas como AIF (factor de inducción de apoptosis), Smac/DIABLO y Citocromo C (Kroemer G 1997), por acción de los miembros de la familia Bcl-2 (proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 y Bcl-LX y proapoptóticas como Bad, Bid o Bax) (Adams J 1998). Algunos estímulos apoptóticos generan un cambio en la interacción entre algunos miembros de la familia Bcl2 que lleva a la formación de poros mitocondriales y a la liberación de otras moléculas pro-apoptóticas del espacio intermembranal como citocromo C que se une con la proteína Apaf-1, ATP y la procaspasa 9, lo cual lleva a la activación de caspasa 9 y a la apoptosis celular (Liu X 1996; Li P 1997; Zou H 1999).

La activación de caspasas produce la proteólisis de una serie de componentes celulares como enzimas que reparan DNA o que regulan la actividad de DNAsas y otras moléculas como constituyentes del citoesqueleto (Cohen G 1997)

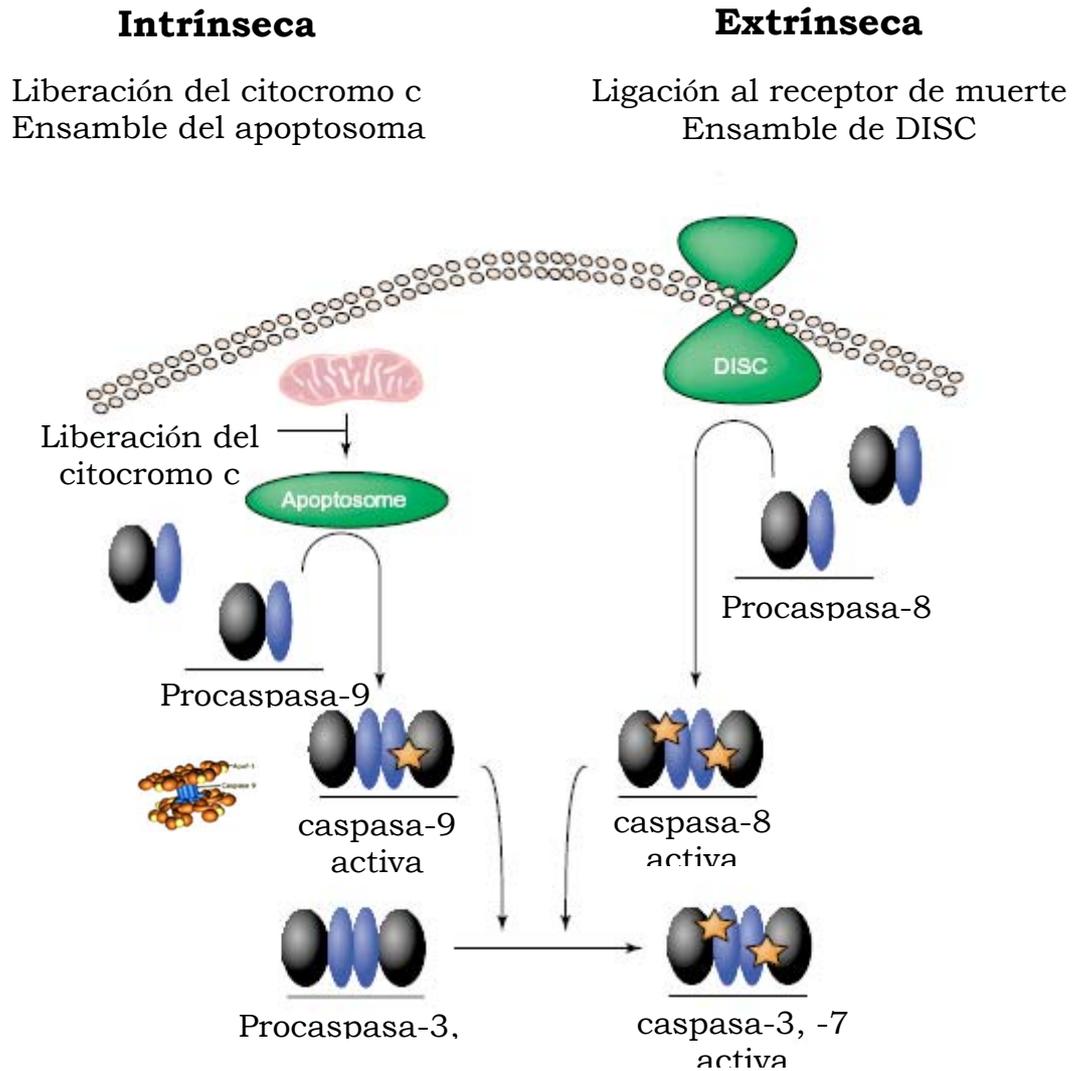


Figura A. **Esquemización de las vías de activación de la muerte apoptótica.** En la vía intrínseca moléculas proapoptóticas son liberadas de la mitocondria, se forma un complejo en el cual se activa procaspasa 9 que activa a procaspasa 3. Los receptores al unir su ligando reclutan proteínas adaptadoras que posteriormente activar a procaspasa 8 que a su vez activara a procaspasa 3. Adaptado de Boatright 2003.

1.22 Muerte Celular Necrótica

La necrosis ocurre como una desregulación de las actividades normales de la célula cuando estas son expuestas a condiciones extremas de estrés. Morfológicamente puede caracterizarse por una vacuolización extensa en el citoplasma, hinchamiento mitocondrial, dilatación del retículo endoplásmico y ruptura de la membrana plasmática. Como consecuencia de esto, la célula vierte su contenido al espacio extracelular, llevando al daño de células vecinas y provocando un proceso

inflamatorio. Los mecanismos moleculares que participan en la necrosis aun no han sido completamente esclarecidos; sin embargo, se sabe que en las neuronas la necrosis es mediada por un incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} , que es independiente de caspasas, pero dependiente de proteasas como calpaínas y catepsinas. Las calpaínas son una familia de proteasas de cisteína dependientes de calcio, que degradan componentes del citoesqueleto e inducen la liberación de proteasas lisosomales (Roberts-Lewis J 1994; Squier M 1994). La necrosis típicamente ocurre después de hipoxia, trauma y en enfermedades neurodegenerativas como son Huntington, Alzheimer, Parkinson y esclerosis lateral amiotrofica (Zong W 2006; Festjens N 2006 ; Golstein P 2007).

Clásicamente la necrosis es considerada como un proceso no regulado, fuera de este contexto la necrosis también tiene elementos de muerte celular programada en el sentido de su ocurrencia y el curso de eventos que la componen. Ocurre en condiciones fisiológicas, puede inducirse por ocupación de receptores específicos e inhibirse bloqueando algunas enzimas y procesos (Kalai M 2002).

Como ya se mencionó anteriormente, esta tesis se enfocará en los procesos de muerte celular necrótica y apoptótica particularmente dentro del Sistema Nervioso.

1.3 Células Gliales

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

Existen distintos tipos de células gliales en el SNC: los astrocitos, los oligodendrocitos, células de Schwann y la microglia. Cada tipo glial desempeña funciones diferentes y presenta características únicas. Los astrocitos son las células gliales más abundantes, poseen numerosos procesos que emergen radialmente y entretienen una compleja comunicación con los somas y procesos neuronales. Los astrocitos proveen un importante soporte estructural y metabólico. Los oligodendrocitos y células de Schwann son células con poco citoplasma alrededor del núcleo, con procesos que se envuelven en si mismos alrededor de los axones de las neuronas y forman las cubiertas

mielinizantes que permiten la propagación de los impulsos nerviosos (Jessen K 2004; Ness J 2005). La microglia son células con soma pequeño y varios procesos bifurcados que tienen alta movilidad (Hea F 2007; Pocock J 2007); su origen embrionario es distinto a las demás células gliales, derivan de progenitores extravasculares (mieloide/mesenquimal) y de progenitores circulantes (monocitos y macrófagos); la microglia constituye el sistema inmune del SNC (Chan W 2007).

Las primeras células gliales que surgen durante el desarrollo corresponden a la glia radiada, llamadas así por su forma bipolar alargada, estas células desempeñan un papel importante en la migración neuronal y en la producción de células neuronales y no neuronales, incluidos los astrocitos y oligodendrocitos. La mayor parte de los astrocitos y oligodendrocitos se generan en la zona subventricular (ZSV) la cual es la mayor zona germinal gliogénica, aquí distintas citosinas desempeñan un papel crítico en la diferenciación celular. (Young G 1996; Ihrie R 2008).

1.4 Astrocitos

Los astrocitos son células capaces de realizar múltiples funciones bajo condiciones muy variadas, se distribuyen en todo el SNC y las funciones que realizan dependen de su localización e interacción con distintos tejidos y / o tipos celulares. Por ejemplo, los astrocitos participan en la formación de las sinapsis (sinaptogénesis), modulan su eficacia y mantenimiento mediante la liberación de distintas señales (Barres B 2001). Además, estas células poseen receptores a distintos neurotransmisores que pueden ser activados durante la actividad sináptica, llevando a la elevación de Ca^{2+} y a la liberación de glutamato que actúa modulando la transmisión sináptica y la excitabilidad neuronal (Haydon P 2001). Esta elevación en el calcio puede propagarse entre los astrocitos (enlazados mediante uniones estrechas), pudiendo modular la actividad neuronal en una zona distinta a la cual se originó el estímulo (Rochon D 2001). Por otro lado, los astrocitos son capaces de regular la homeostasis extracelular mediante mecanismos moleculares que permiten remover y metabolizar neurotransmisores como glutamato (previniendo la neurotoxicidad mediada por glutamato) y GABA (Chen Y 2003). Otra de las funciones que desempeñan los astrocitos y que resulta de gran importancia es la remoción de K^+ extracelular que se acumula durante largos periodos de actividad neuronal, evitando así la alteración de la excitabilidad eléctrica de las neuronas (Walz W 2000 ; Gee J 2005).

Astroцитos y protección neuronal

Aparte de su papel en el mantenimiento fisiológico, los astroцитos tienen una importante respuesta al daño y enfermedad. Las reacciones más comunes de los astroцитos en condiciones patológicas son el hinchamiento celular, la hipertrofia-hiperplasia (astrogliosis) y la proliferación (astrocitosis), pueden ocurrir en respuesta a infecciones virales como en la demencia inducida por VIH-SIDA y por daño traumático al cerebro, isquemia/hipoxia, esclerosis múltiple, síndrome de Down y enfermedad de Alzheimer (Pekny M 2007). En las primeras etapas del daño al SNC, los astroцитos reactivos tienen un efecto benéfico sobre las neuronas participando en distintos procesos biológicos como la regulación de iones extracelulares y niveles de neurotransmisores, reparando la matriz extracelular, dando un soporte trófico a la neurona y protegiendo a las células de un estrés oxidativo, sin embargo una respuesta prolongada de los astroцитos reactivos puede interferir en otros procesos como son la regeneración de nervios y algunos productos producidos por los astroцитos pueden resultar tóxicos y estar involucrados en algunas patogénesis como ocurren en algunas enfermedades neurodegenerativas (Mahesh V 2006).

Durante la gliosis reactiva ocurre una muerte considerable de astroцитos, ésta puede prolongarse a las células vecinas e incrementar la muerte de los astroцитos. Tradicionalmente se ha aceptado que en astroцитos la muerte necrótica es predominante en los modelos de daño al SNC; sin embargo, recientemente se ha acumulado evidencia que sugiere que la muerte apoptótica tiene una mayor trascendencia en procesos fisiológicos y patológicos en el SNC (Croisier E 2006).

Cambios morfológicos

Los astroцитos son células capaces de adquirir distintas morfologías dependiendo del lugar donde se localicen y su interacción con distintos tipos celulares. *In vivo* se han descrito morfológicamente 2 tipos de astroцитos: 1. los que poseen forma de estrella con procesos largos que sobresalen alrededor del soma, también llamados astroцитos fibrosos y 2. los astroцитos aplanados con una morfología amorfa y semejantes a fibroblastos, también llamados astroцитos poligonales o protoplásmicos. Los astroцитos estrellados se localizan en la materia blanca, mientras que los astroцитos aplanados se localizan tanto en la materia blanca como en la materia gris. Ambos tipos de astroцитos son positivos a la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y muestran una serie de características bioquímicas distintas, sin embargo es común encontrar astroцитos con

características intermedias entre los dos tipos, lo que sugiere que posiblemente ambas morfologías son interconectables (Safavi-Abbasi S 2001; Karasek M 2004).

1.5 Citoesqueléto

El citoesqueleto es una red de filamentos que se extienden en toda la célula, conformando una estructura compleja y dinámica que se reorganiza continuamente y constituye el armazón estructural de la célula, determinando la morfología y organización intracelular. El citoesqueleto es responsable de los movimientos de la célula sobre diversos sustratos así como de los cambios de forma durante el desarrollo embrionario de los vertebrados (Pantaloni D 2001; Linck R 2007). Por otro lado, se encarga de los movimientos internos que lleva a cabo la célula, como son, el transporte de organelos a través del citoplasma y la segregación de cromosomas durante la mitosis. La polaridad y la orientación celular son otras de las características relacionadas con las funciones del citoesqueleto. (Drubin D 1996; Madden K 1998).

El citoesqueleto está constituido por tres tipos de filamentos proteicos: los filamentos de actina, filamentos intermedios y microtúbulos. Su dinámica está regulada por la interacción con diversas proteínas accesorias características en cada uno de los grupos de citoesqueleto que regulan la disposición de los filamentos, la interacción con otras estructuras, estabilidad y le confiere distintas funciones dependiendo del tipo celular (Janmey P 1998).

Cada tipo de filamento está formado por una proteína distinta; la actina en los filamentos de actina, la tubulina en los microtúbulos y una familia de proteínas relacionadas en su estructura en los filamentos intermedios. Cada filamento se forma por la polimerización de estas proteínas, teniendo una dinámica distinta con diferentes proteínas accesorias en cada tipo de filamento.

1.51 Filamentos de actina

La actina es una de las proteínas más abundantes y conservadas en la célula eucarionte. Los filamentos que forma son fibras delgadas y flexibles de aproximadamente 8 nm de diámetro y hasta varios micrómetros de longitud. La subunidad monomérica G de actina es una proteína globular de 375 aminoácidos (43 kDa). La orientación de los monómeros G dentro de los filamentos proporciona la

polaridad y función. Esta polaridad es importante para definir la dirección del movimiento a lo largo de los filamentos de actina (Rivero F 2007).

La polimerización de la actina comprende tres fases, una lenta en la cual dos monómeros de actina se unen formando un dímero, que se estabiliza con la adición de un tercer monómero que servirá como lugar de nucleación, a partir de este se adicionan monómeros rápidamente a ambos extremos, alargando el filamento en una fase rápida; finalmente en la fase de equilibrio, el polímero adiciona monómeros con la misma velocidad que los pierde (Furukawa R 1997).

La velocidad de polimerización depende directamente de la concentración de monómeros libres, pero la pérdida de monómeros se da a una velocidad constante que no depende de dicha concentración. La concentración en la cual la velocidad de adición de monómeros es igual a la velocidad de pérdida de monómeros se llama concentración crítica. Sin embargo, la concentración crítica difiere en ambos extremos. En uno de los dos, la velocidad de crecimiento del polímero es de 5 a 10 veces más rápida respecto al otro extremo; al extremo de crecimiento más rápido se le llama extremo + y al otro se le llama extremo -. Por otro lado, los monómeros de actina unen fuertemente ATP, el cual es hidrolizado después de que el monómero ha sido añadido al polímero, la hidrólisis no es necesaria para la polimerización, aunque los monómeros unidos a ATP se polimerizan más rápido que aquellos que están unidos a ADP. Además, los monómeros unidos a ADP poseen menor afinidad en la unión con los otros monómeros. En estado de equilibrio, la concentración de monómeros es intermedia entre la concentración crítica requerida para el extremo + y -. En estas condiciones existe una pérdida de monómeros en el extremo - que se compensa con una ganancia de monómeros en el extremo +, a este proceso se le llama intercambio rotatorio (Hill T 1982).

Los filamentos de actina se arreglan formando haces y redes. Los haces son filamentos unidos paralelamente, cuando los filamentos están orientados con la misma polaridad se forman los haces paralelos, los filamentos se unen por la proteína fimbrina; por el contrario si los haces se forman con polaridades opuestas y están mucho más espaciados, se forman los haces contráctiles, aquí los filamentos se unen por la proteína α -actinina, la cual separa más a los filamentos que la fimbrina y esta separación permite la unión de la proteína miosina-II, la cual provee a los filamentos la característica motora y contráctil, esta proteína está compuesta por una larga cola y dos cadenas pesadas, cada una con 2 cadenas ligeras, cuando una de las dos

cadena ligera se fosforila, provoca un cambio conformacional que expone el sitio de unión a la actina y se hidroliza ATP. Existe una proteína que facilita la unión de la α -actinina y la miosina-II a los filamentos de actina, esta es la tropomiosina, la cual estabiliza a los filamentos de actina. Por otro lado, las redes son filamentos con interconexiones ortogonales que forman una malla tridimensional holgada, aquí los filamentos se entrecruzan por la proteína filamina (Revenu C 2004; Craig R 2006).

Las fibras de estrés, son un tipo de haz contráctil de actina característico de tipos celulares cuya morfología y movimiento son importantes para sus múltiples funciones. Estas se unen en un extremo a la membrana plasmática mediante estructuras de adhesión, las cuales son sitios de unión de la membrana plasmática con la matriz extracelular; el otro extremo se une a otra estructura de adhesión o a una red de filamentos intermedios que rodea al núcleo celular. Estas fibras de estrés son capaces de generar tensión en la célula y sobre la matriz extracelular. (Byers H 1984). Posiblemente las proteínas de unión de los filamentos de actina con los filamentos intermedios y la interacción entre estos dos componentes del citoesqueleto regulan la forma del núcleo celular durante la muerte celular apoptótica (Croft D 2005).

El anclaje de las fibras de estrés y la matriz extracelular está mediado por proteínas transmembranales, siendo el principal componente las integrinas, aunque también participan otras proteínas como TM4SF (tetraspaninas) o las IAP (proteínas asociadas a integrinas) entre otras (Schoenwaelder S 1999; Blystone S 2004). La unión de las fibras de estrés con el dominio citoplasmático de las integrinas se da indirectamente a través de interacciones entre diversas proteínas como la talina, paxilina, tensina, vinculina y α -actinina. La afinidad de las tres primeras proteínas está regulada por FAK (cinasa de proteínas asociadas a adhesiones focales), la cual se activa cuando el dominio β citoplasmático de las integrinas es expuesto; entonces FAK es reclutado y se autofosforila. La dinámica de las adhesiones focales puede transmitir señales desde la matriz extracelular al citoesqueleto y así regular distintos procesos celulares como son la supervivencia, la morfología, el crecimiento y el movimiento de la célula (Defilippi P 1999; Parsons J 2000).

De esta forma, los componentes del citoesqueleto de actina participan de manera importante en una gran diversidad de funciones celulares, en este contexto la familia de GTPasas pequeñas (Rho) parece formar parte de la compleja red de señalización que traduce la información de estímulos externos mediando la reorganización del citoesqueleto (Schmitz A 2000; Etienne-Manneville S 2002).

Rho es una familia de proteínas que pertenece a la superfamilia Ras; son proteínas G monoméricas con un peso molecular entre 20 y 30 KD, se activan mediante su unión a GTP e inactivan por su asociación con GDP. Presentan un dominio de inserción que está implicado en la unión a determinados efectores y es responsable de unir las proteínas reguladoras de Rho para producir una respuesta biológica (Wu W 1997). Mediante distintos complejos de adhesión formados por integrinas participan en procesos como la regulación de las fuerzas de contracción y retracción durante la migración celular, establecimiento de polaridad de la célula, así como en el tráfico intracelular (Raftopoulou M 2004). El efecto de Rho sobre el citoesqueleto implica la participación de cinasa como: ROK (*Rho associated kinasa*), mDia, LIMK y fosfatidil inositol-4-fosfato 5-cinasa (PI-4P5K), ERM, etc. (Janmey P 1987).

1.52 Microtúbulos

Los microtúbulos son estructuras cilíndricas de aproximadamente 25 nm de diámetro que están formados por protofilamentos (generalmente 13) que se ordenan paralelamente alrededor de un centro hueco. Cada protofilamento está formado por la proteína tubulina, la cual es un heterodímero integrado por dos subunidades de 55 kDa, la α -tubulina y la β -tubulina. Cada dímero de tubulina se une cabeza con cola (polaridad intrínseca) y al igual que los filamentos de actina los microtúbulos son estructuras polares que poseen un extremo +, de crecimiento rápido y un extremo – de crecimiento lento. Esta polaridad es importante para definir la dirección del movimiento a lo largo de los microtúbulos (Desai A 1997; Wade R 2007).

Tanto la α -tubulina como la β -tubulina están unidas a GTP, aunque solo la β -tubulina hidroliza GTP de forma análoga a la actina-ATP. Al igual que la actina, la hidrólisis en este caso de GTP, disminuye la afinidad por las moléculas adyacentes. La polimerización de los microtúbulos es muy parecida a la de los filamentos de actina, esta se divide en tres fases (lenta, rápida y de equilibrio). La diferencia radica en la nucleación, para los microtúbulos se da generalmente en una estructura plástica y a menudo transitoria llamada MTOC (centro organizador de microtúbulos), la cual cataliza la nucleación dependientemente de la γ -tubulina y ancla a los microtúbulos interactuando con los extremos + ó – y por los lados. El MTOC también puede controlar el largo, numero, distribución y polaridad de los microtúbulos. El arreglo de los MTOC difiere en los distintos tipos celulares, así como en la fase del ciclo celular en la que se encuentren. En la mayoría de las células animales el MTOC es el

centrosoma, el extremo – de los microtúbulos se ancla al centrosoma y a partir de este irradian los microtúbulos hacia regiones específicas (Lüders J 2007; Raynaud-Messina B 2007).

La velocidad de polimerización de los microtúbulos es directamente dependiente de la concentración de tubulina libre y su dinámica presenta una concentración crítica. Aparte existe un evento llamado inestabilidad dinámica, que es una transición entre periodos de polimerización y despolimerización. En los periodos de polimerización, se añade tubulina libre unida a GTP, mientras haya una elevada concentración de tubulina unida a GTP, continuara el crecimiento de los microtúbulos, pero cuando el GTP se hidroliza más rápido que la adición de tubulina, se dará un periodo de acortamiento de los microtúbulos (Howard J 2007).

La inestabilidad dinámica de los microtúbulos se modifica por la interacción continua con diversas proteínas llamadas MAP (proteínas asociadas a microtúbulos), las cuales se dividen en HMW (proteínas de alto peso molecular) y tau, ambas poseen dos dominios de unión, uno de los cuales es específico para los microtúbulos. Las MAP actúan estabilizando a los microtúbulos y mediando su interacción con distintos componentes de la célula, de esta forma los microtúbulos participan en la organización y polaridad celular (Ferreira A 1989; Wade R 2007).

Los microtúbulos participan en el transporte intracelular por proteínas motoras que utilizan la energía del ATP para moverse sobre los microtúbulos en una sola dirección. Existen 2 grandes familias, las cinesinas y las dineínas. Estas proteínas son también responsables de la organización celular (Burakov A 2006; Skowronek K 2007).

1.53 Filamentos intermedios

Los filamentos intermedios son menos dinámicos que los filamentos de actina y los microtúbulos, sin embargo son considerados estructuras subcelulares de fundamental importancia, particularmente durante fenómenos de estrés regulando el estado funcional de los astrocitos (Wilhelmsson U 2004). Están codificados por más de 60 genes diferentes y son el grupo proteico de citoesqueleto más heterogéneo en los diferentes tejidos. Existen un gran número de clasificaciones basadas en el tipo celular en el que se expresen. Se organizan de manera general en 5 grupos de los cuales las vimentinas, periferinas, acídica fibrilar glial (GFAP), laminas y principalmente los

neurofilamentos son los que se encuentran presentes en el sistema nervioso central y periférico además de otros tejidos extraneurales (Lee M 1996; Herrmann H 1998).

La producción de filamentos intermedios se ve incrementada durante la gliosis reactiva, acompañada de la sobreexpresión de GFAP, vimentina y nestina; estas dos últimas se encuentran expresadas de manera abundante en astrocitos inmaduros (Pekny M 2001); y su importancia en la dinámica de los filamentos intermedios ha sido monitoreada mediante ensayos en los que se hacen deleciones de dichas proteínas. En ratones deficientes de GFAP o vimentina se ha visto una marcada reducción del contenido de filamentos intermedios, mientras que ratones que son deficientes de ambas proteínas carecen completamente de este tipo de filamentos (Eliasson C 1999). Por otra parte, recientemente se ha reportado la participación de los filamentos intermedios en la determinación de la morfología de los astrocitos indicando que la carencia de GFAP y vimentina produce astrocitos de menor tamaño y con procesos más cortos con respecto al control durante lesiones en el SNC (Wilhelmsson U 2004).

II. ANTECEDENTES

Como se mencionó antes, existe una relación entre los elementos del citoesqueleto y el proceso de muerte celular. Por un lado, la muerte puede inducirse por modificaciones de los elementos del citoesqueleto, tal es el caso de la inducción de la muerte celular apoptótica cuando las células son privadas de su unión con la matriz extracelular (anoikis), la cual se sabe que está determinada por elementos del citoesqueleto (Pawlak 2001). Se sabe además que Bim y Bmf, moléculas proapoptóticas de la familia Bcl-2, están íntimamente asociados a los componentes del citoesqueleto tubulina y actina, respectivamente; la liberación de estos dos elementos proapoptóticos es independiente de la actividad de caspasas (Puthalakath 1999; Puthalakath 2001). Por otro lado, los elementos del citoesqueleto se modifican durante el proceso de muerte celular ocasionando alteraciones en la morfología celular. Se sabe que durante el proceso apoptótico la actina es cortada primeramente por calpaínas o proteasas similares a calpaínas y caspasas (Villa P 1998). La inhibición de estas proteasas puede evitar las características del proceso apoptótico y retrasar o incluso inhibir el proceso (Verdaguer E 2005).

Los astrocitos son un tipo celular fundamental en el funcionamiento del SNC tanto en situaciones fisiológicas como en situaciones anómalas y patológicas. Estas células experimentan muerte apoptótica tanto en el desarrollo como en el estado adulto en respuesta a ciertos estímulos patológicos. De la misma forma, la muerte necrótica se presenta bajo estas condiciones y posiblemente durante el desarrollo. Una característica importante que presentan los astrocitos es su plasticidad morfológica (Safavi-Abbasi S 2001). Estas células pueden adquirir distintas morfologías dependiendo de su ubicación e interacción con los distintos tipos celulares. *In vitro*, se puede inducir un cambio morfológico por distintas condiciones como son la exposición a AMP cíclico, inhibidores de cinasas, agentes que alteren la dinámica de los filamentos de actina, péptido amiloide, adenosina, Y27632, PACAP, manganeso, y acumulación de aminoácidos (Leu, Ile y Val) (Ramakers 1998; Goldman 1990; Rosso 2002; Abe 2003; Funchal C 2004; Perez V 2005; Chen C 2006). La mayoría de estos cambios morfológicos que ocurren en los astrocitos pueden estar relacionados con el proceso de la gliosis reactiva, el cual se caracteriza por un cambio morfológico y un aumento en la inmunoreactividad de GFAP. (Young B. Lee 2000).

Así, los astrocitos son capaces de adquirir distintas morfologías bajo condiciones patológicas y de neuroprotección como eventos donde los astrocitos experimentan

procesos de muerte celular apoptótica y necrótica. En ambos casos uno de los blancos primarios de la maquinaria apoptótica y necrótica son los elementos del citoesqueleto. Basados en lo anterior, en este trabajo se estudiarán los cambios morfológicos que se presentan en los astrocitos bajo condiciones de muerte celular apoptótica y necrótica. Para esto, se evaluarán las modificaciones del citoesqueleto inducidas por estas condiciones y se explorará las moléculas del citoesqueleto afectadas por elementos de cada uno de estos dos tipos de muerte en astrocitos de cerebelo de rata.

III. OBJETIVOS

Objetivo general

Conocer el papel del citoesqueleto en los cambios morfológicos de los cultivos primarios de astrocitos de cerebelo inducidos por condiciones que promueven muerte celular.

Objetivos Particulares

Determinar la viabilidad de los astrocitos en las distintas condiciones que promueven muerte celular.

Caracterizar los cambios morfológicos de los astrocitos asociados a las condiciones que promueven muerte celular.

Determinar si los cambios morfológicos de los astrocitos están sustentados en el arreglo del citoesqueleto.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Reactivos

Suero fetal bovino penicilina/estreptomicina GIBCO (Grand Island, NY) Hoechst 33258, Poly-L-lisina, Tripsina, DNAsa, MTT, [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dipheniltetrazoliumbromide], estaurosporina, SIGMA (St. Louis, MO). Membranas PVDF (Bedford, MA). Anti- β -actina, anti- α -tubulina, inhibidor de calpaína I, (Z-VAD) (Sigma-Aldrich).

5.2 Cultivo celular

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

5.3 Tratamientos

Dos semanas después de haberse sembrado, los cultivos primarios de astrocitos recibieron distintos tratamientos que inducen muerte celular y cambios morfológicos. Un grupo de células fueron expuestas a estaurosporina 0.5 μM , mientras que otro grupo fue expuesto a ionomicina 1 μM . Un último grupo fue sometido a un cambio de medio suplementado con suero a un medio libre de suero. En los tres grupos se analizó el efecto de dos inhibidores de proteasas; ZVAD 150 mM, un inhibidor general de caspasas y IC 1 μM , un inhibidor de calpaína I.

5.4 Viabilidad celular

Se realizó el ensayo MTT para determinar la viabilidad de los cultivos primarios de astrocitos. En las mitocondrias activas el MTT es transformado a azul de formazán cuya absorbancia es directamente proporcional al número de células viables. Después

5 a de ser tratados los cultivos fueron incubados con MTT (0.5 mg/m) a 37°C por 15 min, posteriormente se extrajo el medio. Para solubilizar los cristales de formazán se adicionó 0.5 ml de DMSO por 15 min a temperatura ambiente en oscuridad. Se analizó por espectrofotometría con una absorbancia a 570 nm.

5.5 Western blot

Las células fueron lavadas con PBS a 37°C, posteriormente fueron homogenizadas y sonicadas con buffer de lisis (Tris 25 mM, NaCl 25 mM, Igepal 2%, SDS 0.2%, pH 7.4) a 4°C. La concentración de proteína en los homogenados se determinó por el método de Bradford. Se utilizó 20 µg de proteína. Los homogenados fueron fraccionados por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10% para después ser transferidos a membranas PVDF. Las membranas fueron bloqueadas con leche descremada o libre de ácidos grasos al 5% en TBS-T (Tris 100 mM, NaCl 50 mM, Tween 0.1%, pH 7.5) por toda la noche. Después se incubaron con los anticuerpos primarios anti-β-actina y anti-α-tubulina (ambos 1:1000) 4°C por toda la noche. Posteriormente las membranas se lavaron 5 veces (10 min cada una) con TBS-T y luego fueron incubadas con un anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina a una dilución de 1:30 000 por 45 min a temperatura ambiente. Se lavaron las membranas y fueron procesadas para visualizarse por quimioluminiscencia y expuestas en placas kodak. La cuantificación de las bandas reactivas del inmunoblot se llevó a cabo escaneando las fluorografías de 3 experimentos independientes del mismo tipo. La integración de las áreas bajo la curva fueron obtenidas por un software de análisis de imágenes (ImageJ 1.36b NIH, USA).

5.6 Inmunocitoquímica

Las células fueron lavadas con PBS a 37°C, posteriormente fueron fijadas con paraformaldehído 3.7% a temperatura ambiente por 20 min. Se lavaron con PBS y fueron permeabilizadas por 8 min con triton X-100 0.5% y lavadas nuevamente. Para la tinción con rodamina/faloidina (2 mM) y se incubó por 45 min. Para el caso de la inmunocitoquímica, las células fueron bloqueadas con albúmina sérica bovina en PBS (PBS/BSA) 0.5% por 30 min, posteriormente fueron incubadas con el anticuerpo primario correspondiente a una dilución de 1:1000 en PBS/BSA 0.5% por 1 hora, después de la incubación, las células fueron lavadas con PBS e incubadas con el anticuerpo secundario goat anti-mouse IgG marcado con FITC por 45 min (dilución

1:50 PBS/BSA). Las células se lavaron con PBS y los cubreobjetos fueron montados en portaobjetos con 10 μ l de medio de montaje DAPI.

5.7 Microfotografías

Las preparaciones fueron observadas con un microscopio de epifluorescencia Nikon, utilizando distintos filtros. Se tomaron fotografías de 5 campos aleatoriamente por cada preparación.

5.8 Estadística

Los resultados se analizaron con un análisis de varianza de diseño aleatorio (ANOVA) de una serie de experimentos independientes. Se consideraron significativas las diferencias entre promedios considerando una $p < 0.05$ y $p < 0.01$. Los resultados se expresaron como las medias.

V. RESULTADOS

Viabilidad Celular

Los cultivos de astrocitos son capaces de experimentar cambios morfológicos por distintas condiciones experimentales que pueden simular situaciones fisiológicas o patológicas. Esto incluye la exposición a AMP cíclico o a inhibidores de proteínas cinasas que inducen cambios que consisten básicamente en la adquisición de una morfología tipo estrella o con procesos orientados alrededor del soma. Por otro lado, existen distintas formas de inducir los procesos apoptótico y necrótico. Un ejemplo es mediante ionoforos de calcio como la ionomicina (I), que puede inducir necrosis o apoptosis dependiendo de la magnitud del estímulo (B. J. Gwag 1999). Otro inductor de muerte frecuentemente utilizado es el inhibidor de cinasas, estaurosporina, el cual induce apoptosis en distintos tipos celulares en un proceso dependiente e independiente de caspasas (Chafké A. 2001; Caballero-Benítez 2003; Min 2006; D'Alimonte and Patrizia Di Iorio 2007). Además de estos inductores, la privación de condiciones tróficas puede inducir también muerte celular.

En este trabajo se emplearon 3 condiciones que inducen tanto muerte celular como cambios morfológicos y una condición que sólo induce cambios morfológicos. Las condiciones empleadas son: 1. el cambio a un medio sin suero (-S), 2. incubación con el inhibidor de proteínas cinasas estaurosporina (St), 3. tratamiento con el iónoforo de calcio ionomicina (I) y 4 tratamiento con un inhibidor de calpaína (IC).

Con el fin de conocer los efectos de las distintas condiciones experimentales en la viabilidad de los astrocitos, se midió la transformación de MTT en astrocitos tratados durante diferentes tiempos con estas condiciones. En la figura 1 se muestra la viabilidad en un curso temporal de 0 a 24 horas bajos los distintos tratamientos. Los datos están expresados como porcentajes de la transformación de MTT. Bajo estas condiciones encontramos que la muerte celular ocurre después de las 14 horas en presencia de estaurosporina (0.5 uM), ionomicina (1 uM) o sin suero, mientras que el IC (1 uM) no induce muerte celular. De las 3 condiciones que inducen muerte celular, solo I y St lo hacen desde las 14 horas, mientras que la condición -S causa muerte hasta las 24 horas (Fig. 1).

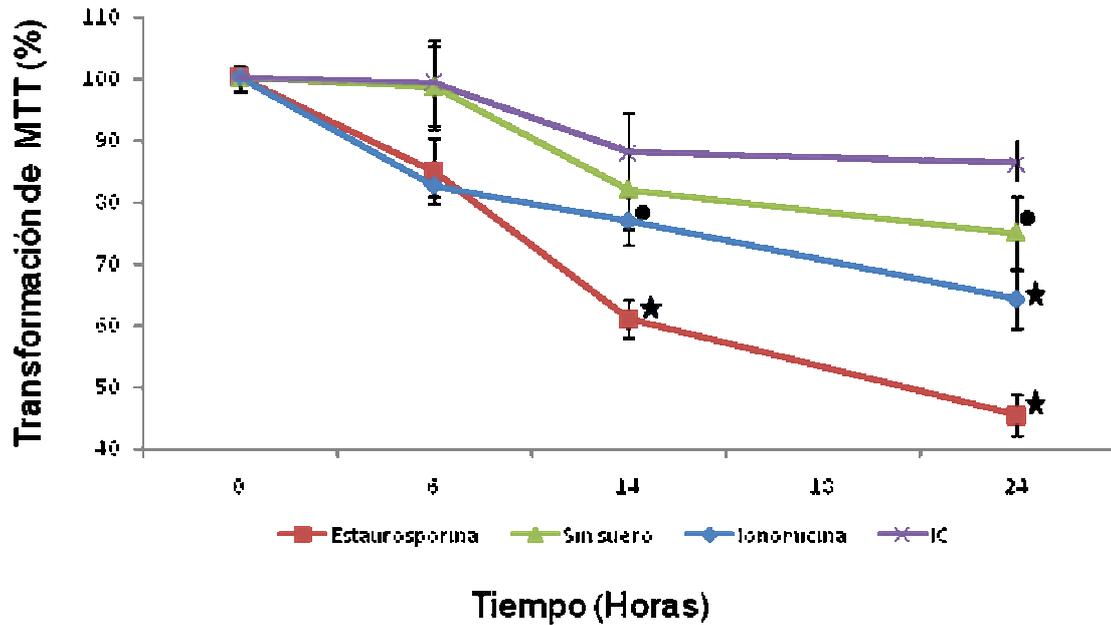


Figura 1. Efecto de estaurosporina, ionomicina, inhibidor de calpaína y privación de suero en la viabilidad de astrocitos en cultivo. Se determinó el efecto de St (0.5 uM), I (1 uM), IC (1uM) y un medio sin suero (-S) en la viabilidad de astrocitos a las 6, 14 y 24 horas de tratamiento. La viabilidad se midió como transformación de MTT, de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los datos están expresados como porcentajes de la transformación de MTT en relación al control (100%) para cada tiempo. Los datos son promedios de 4-6 experimentos por separado \pm error estándar; ● $p < 0.05$ vs control, ★ $p < 0.01$ vs control.

Cambios morfológicos en cultivos primarios de astrocitos de cerebelo

Los cambios morfológicos presentes en las distintas condiciones consisten, en general, en la formación de procesos o extensiones de la membrana bajo todas las condiciones experimentales, con excepción de ionomicina (Fig. 2). El cambio morfológico consiste en la adquisición de una morfología estrellada. En ionomicina, las células adquieren una morfología alargada (Fig. 2). Los cambios morfológicos ocurren en diferentes tiempos en las distintas condiciones, ocurriendo de manera muy rápida, durante los primeros minutos, cuando se tratan con -S y St, mientras que en caso de IC y la ionomicina los cambios se observan después de las primeras 8 horas (dato no mostrado).

La figura 2 muestra que en la condición control los astrocitos muestran dos tipos de morfología: el tipo aplanado (A) que presenta una morfología poligonal irregular que en ocasiones no está bien definida y el tipo estrellado con una morfología semejante a una estrella con procesos largos que se disponen alrededor del soma (B). En condiciones control, la gran mayoría de los astrocitos son del tipo aplanado (Figura 2a).

Cuando a los astrocitos se les adiciona IC, estos adquieren una morfología tipo estrellado con procesos definidos y alargados. Estos procesos pueden ramificarse en distintos puntos, algunos de estos presentan pequeñas protuberancias. En esta condición la morfología puede ser heterogénea, pudiéndose encontrar astrocitos con morfología tipo estrellado (B) y astrocitos aplanados que extienden procesos delgados a lo largo de toda su superficie (A) (Figura 2b).

En la condición -S los astrocitos también adquieren una morfología tipo estrellado, con somas grandes y procesos gruesos y muy ramificados. La gran mayoría de los astrocitos adquieren esta morfología durante la primera hora del tratamiento. Algunos astrocitos presentan somas condensados (Figura 2c).

Los astrocitos tratados con St generan procesos muy largos y somas redondos y pequeños. A partir de los grupos de somas, se extienden procesos que inciden en otros grupos de células. Algunos procesos forman pequeñas protuberancias. También se observan algunas células con somas muy condensados (Figura 2d, flecha).

El tratamiento de los astrocitos con ionomicina induce una morfología alargada. A partir de los somas alargados puede haber pequeños procesos. Algunas células se deforman completamente y a menudo estas células se desprenden (Figura 2e).

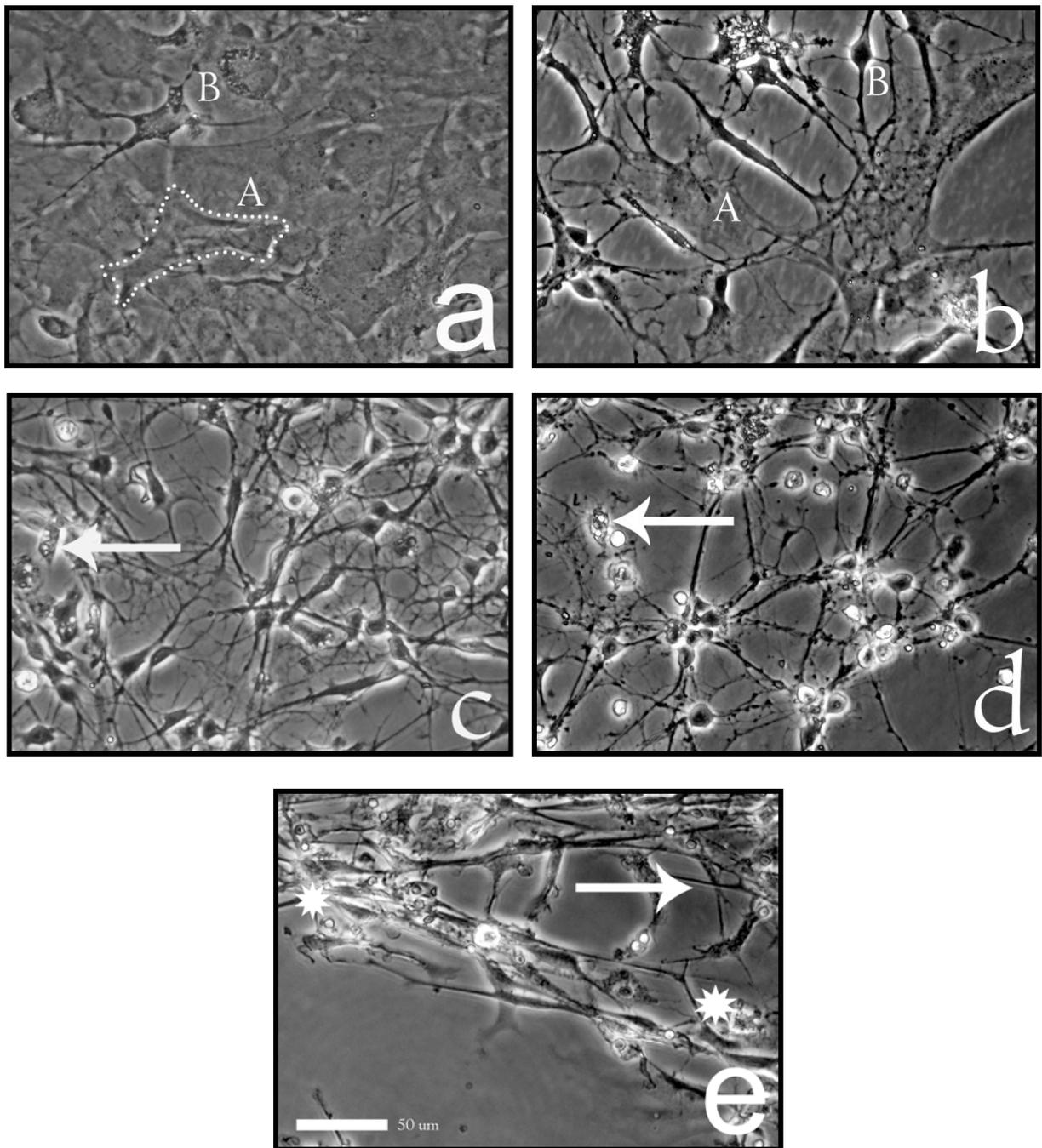


Figura 2. Efecto de estaurosporina, ionomicina, inhibidor de calpaína y privación de suero en la morfología de los astrocitos. Los cultivos se trataron con las diferentes condiciones y después de 12 horas se fotografiaron con un objetivo de 20X. (a) En condiciones control se muestra un astrocito del tipo aplanado (A) y un astrocito tipo estrella (B). (b) En IC (1 μ M) los astrocitos presentan dos morfologías, una con procesos alargados (B) y otros aplanados con pequeños procesos (A). (c) En

condiciones de un medio sin suero (-S) los astrocitos presentan una morfología con procesos alargados y algunos somas están condensados (flecha). (d) El tratamiento con St (0.5 uM) los procesos son alargados y los somas se juntan y forman grupos, algunos somas están muy condensados (flecha). (e) En el tratamiento con ionomicina (I) (1uM) los astrocitos se alargan y adelgazan (flecha) y algunos muestran un aspecto deforme (asteriscos). La barra equivale a 50 um.

Arreglo del citoesqueleto de actina durante los cambios morfológicos

Para determinar si los cambios morfológicos asociados a los inductores de muerte celular y al inhibidor de calpaína están sustentados en el arreglo de algún elemento del citoesqueleto, se realizaron ensayos de inmunocitoquímica y rodamina-faloidina para visualizar el arreglo del citoesqueleto de tubulina y actina, respectivamente.

En condiciones control el citoesqueleto de actina presenta un arreglo en fibras de estrés mostrando núcleos ovalados o alargados (Figura 3a). Cuando las células experimentan cambios morfológicos, en una primera etapa las fibras de estrés comienzan a perderse y se forman cúmulos o agregados (Figura 3b, flechas). Posteriormente el citoesqueleto de actina se organiza en haces de filamentos que sustentan la morfología de la célula (Figuras 3c-e, puntas de flecha). En la condición IC algunas células parecen mantener la morfología poligonal (A) (Figura 3c). En la condición St, los núcleos están más condensados respecto al control (Figura 3e, flechas). Con ionomicina, las fibras de estrés no forman haces tan compactos comparado con las otras condiciones (Figura 3f).

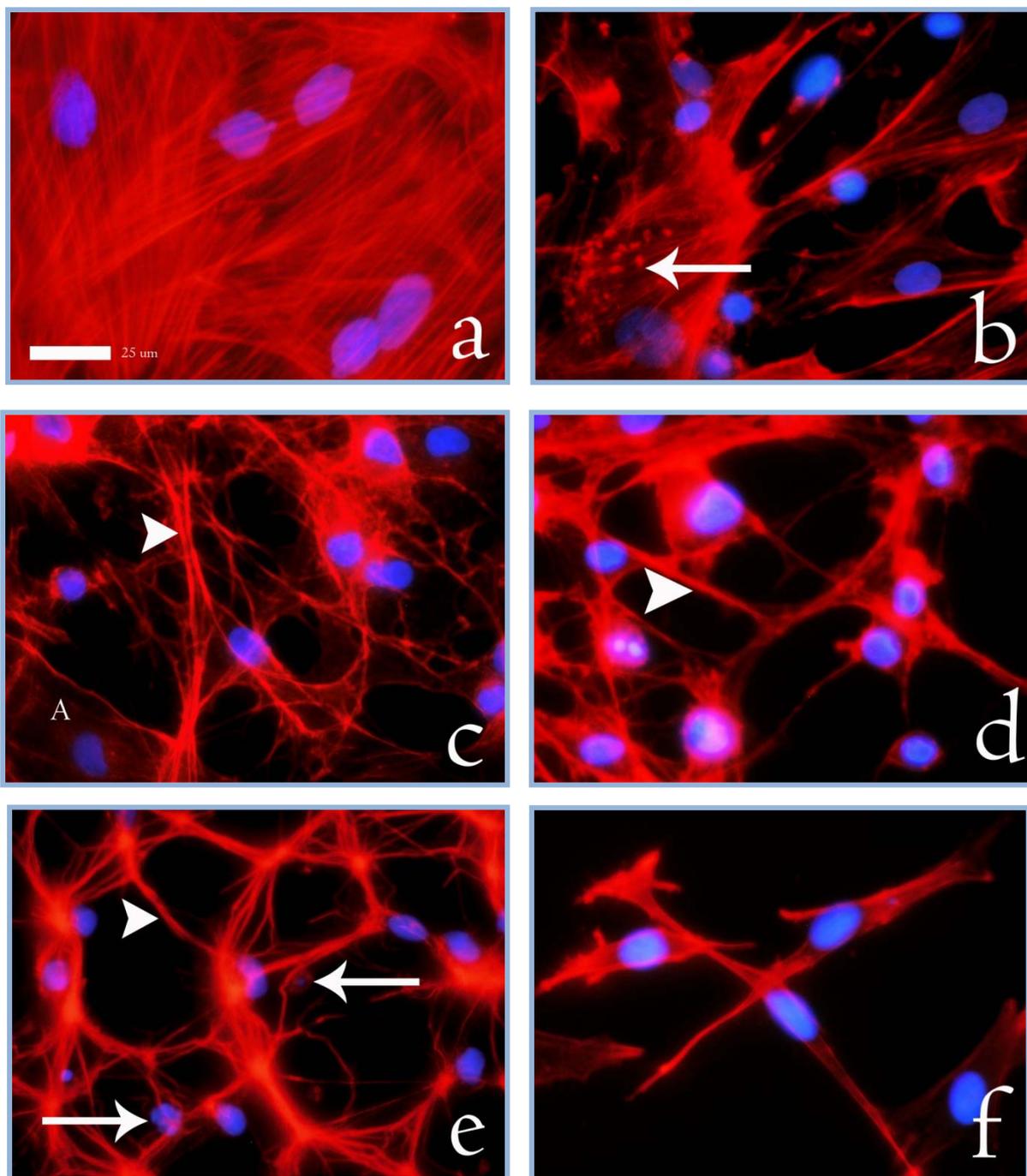


Figura 3. Efecto de estaurosporina, ionomicina, inhibidor de calpaína y privación de suero sobre el arreglo del citoesqueleto de actina. Los cultivos se trataron con las diferentes condiciones y después 30 minutos (b) ó 14 horas (a, c-f) se trataron con rodamina-faloidina como se detalla en Métodos y se fotografiaron con un objetivo de 40X. (a) En condiciones control los filamentos de actina se disponen en fibras de estrés. (b) En los primeros minutos (30 min) de la condición -S las fibras de estrés

comienzan a perder su organización y se forman cúmulos (Flechas). (c) En las condiciones IC (1 uM) ó privadas de suero (d) los filamentos se disponen en haces (puntas de flecha). (e) Con St (0.5 uM) los núcleos se encuentran más condensados (flecha) y los filamentos se también disponen en haces (puntas de flecha). (f) Con ionomicina (1 uM) los haces que se forman no son tan contraídos como en las condiciones anteriores. La barra equivale a 25 um.

Arreglo del citoesqueleto de tubulina durante los cambios morfológicos

Se realizaron ensayos de inmunocitoquímica para determinar si los cambios morfológicos asociados a los inductores de muerte celular y al inhibidor de calpaína están sustentados en el arreglo del citoesqueleto de tubulina,

La Figura 4 muestra que en condiciones control el citoesqueleto de tubulina se dispone como una red difusa alrededor del núcleo (flecha), justo en este punto se presenta una pequeña zona en donde la fluorescencia es más intensa (Figura 4a, punta de flecha). Cuando los astrocitos se tratan con las diferentes condiciones experimentales, en todos los casos se observa que el citoesqueleto de tubulina parece contraerse en haces de filamentos (Figura 4b-e, puntas de flecha). En el caso de la St se aprecian además núcleos condensados (Figura 4d, flecha). En la condición St más el inhibidor de caspasas Z-VAD (200 uM), hay una marcada reducción en los núcleos condensados (Figura 4f).

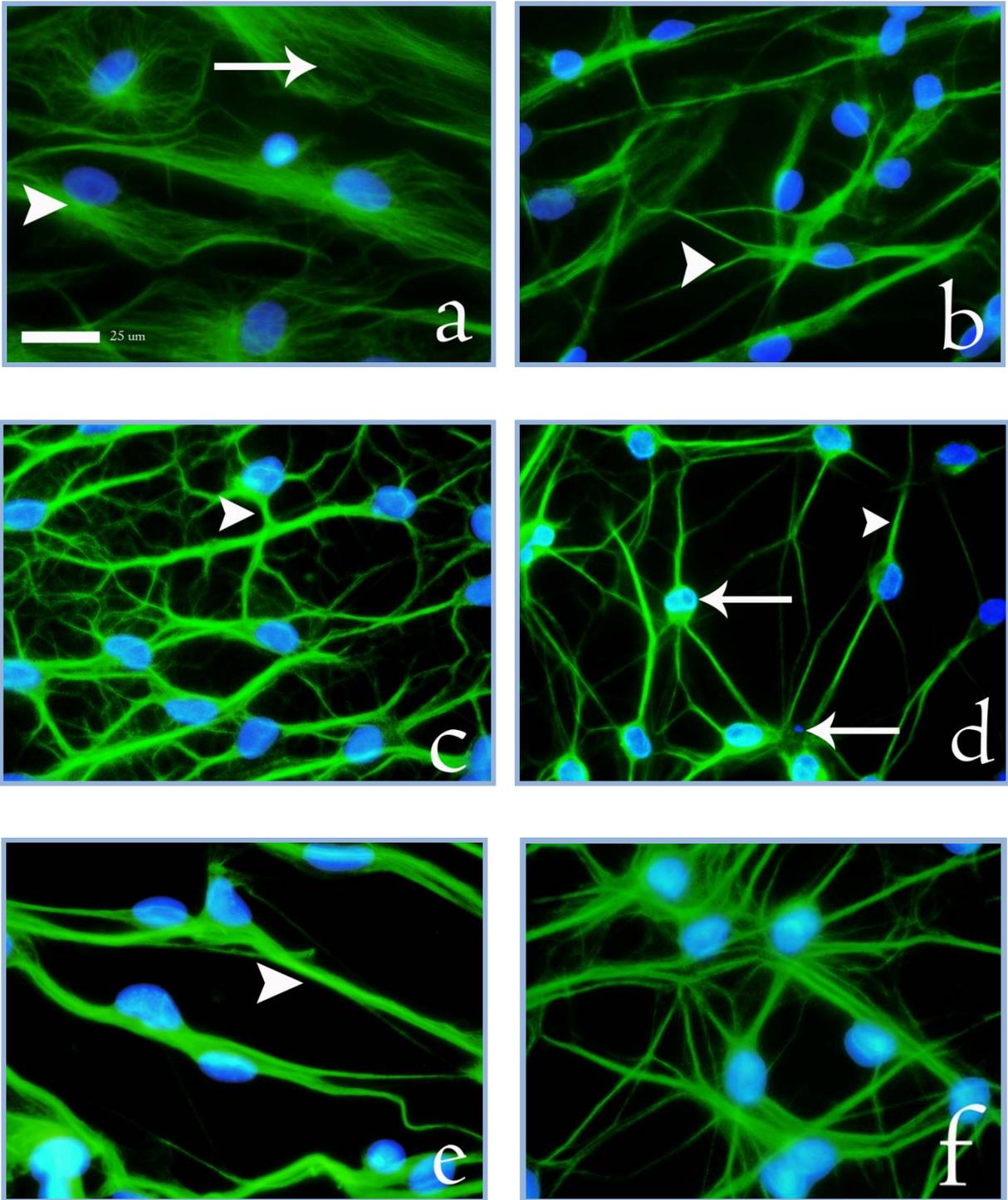


Figura 4. Efecto de estaurosporina, ionomicina, inhibidor de calpaína y privación de suero en el arreglo del citoesqueleto de tubulina. Los cultivos se trataron con las diferentes condiciones experimentales y después 14 horas se realizó la inmunocitoquímica para tubulina como se detalla en Métodos y se fotografiaron con un objetivo de 40X. En condiciones control (a) los microtúbulos se disponen de manera

homogénea que parece irradiar del núcleo que corresponde al punto con una mayor fluorescencia (puntas de flecha). En condiciones de (b) IC (1uM), (c) -S, (d) St (1 uM) y (e) I (1uM) los microtúbulos se disponen en haces compactos. En (d) aparecen algunos núcleos condensados (flechas). En la condición St (0.5 uM) + Z-VAD (200 uM) no aparecen núcleos condensados La barra equivale a 25 um.

Niveles de las proteínas del citoesqueleto

Se realizaron ensayos Western Blot para las proteínas del citoesqueleto con la finalidad de conocer si los cambios observados en el citoesqueleto por acción de las diferentes condiciones experimentales está determinado por un rearrreglo, síntesis o una degradación del citoesqueleto por proteasas activadas durante los diferentes tipos de muerte celular. Cuando las células se mantuvieron con las distintas condiciones, tanto α -tubulina como β -actina no presentan una modificación en sus niveles a ninguno de los tiempos evaluados (3-24 h) (Figura 5).

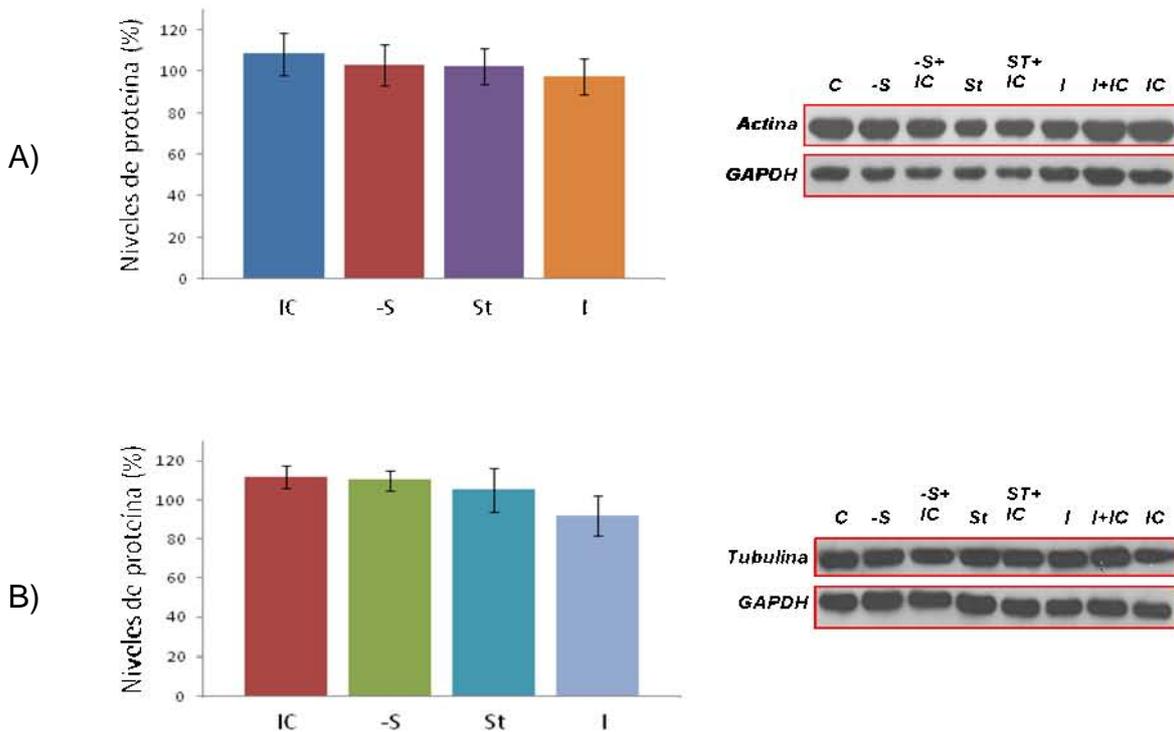


Figura 5. Efecto de estaurosporina, ionomicina, inhibidor de calpaína y privación de suero en los niveles de β -actina y α -tubulina. Mediante ensayos Western Blot se determinaron los niveles de β -actina (A) y α -tubulina (B) a las 14 horas y se normalizo

respecto a GAPDH, los datos son el promedio de 3 experimentos \pm error estándar. En el panel izquierdo se muestran las densitometrías para las condiciones IC (1 μ M), -S, St (0.5 μ M) y I (1 μ M) a las 14 horas. En el panel derecho se muestran las bandas correspondientes a un experimento representativo a las 14 horas. En los tratamientos con dos condiciones, ambas condiciones son incubadas desde el tiempo 0.

VI. DISCUSIÓN

La muerte celular programada representa una amplia gama y continua de diferentes tipos de muerte que pueden distinguirse por ciertos parámetros básicos. Esto va desde la muerte que ocurre de una forma más caótica, como la muerte necrótica, hasta una muerte completamente programada como la apoptótica, pasando por la autofágica. En todos los casos, el proceso de muerte involucra cambios morfológicos que están relacionados con las proteínas del citoesqueleto y con la muerte celular. Por otro lado, uno de los tipos celulares del sistema nervioso que juegan un papel fundamental en la fisiología de este tejido es el de los astrocitos. Estas células mueren a lo largo de la vida del individuo por diferentes motivos y se cree que también lo hacen por distintos mecanismos. Esto tiene implicaciones tanto funcionales como de interés clínico. En éste trabajo evaluamos distintas formas de muerte de los astrocitos y los mecanismos involucrados, en particular el papel de algunas moléculas del citoesqueleto.

En todas las condiciones experimentales empleadas se observaron una serie de cambios morfológicos muy marcados. Algunos de estos tratamientos indujeron muerte celular, como es el caso de la estaurosporina y la ionomicina, mientras que otras condiciones como la privación de suero tiene un efecto menor en la viabilidad y otra más, la inhibición de calpaínas, no afectó la viabilidad celular.

En el caso de la estaurosporina, y de acuerdo a los mecanismos de muerte observados y reportados previamente, podríamos sugerir que los cambios asociados a este agente posiblemente correspondan a un proceso apoptótico, donde el inhibidor de caspasas ZVAD no redujo la muerte celular. Sin embargo, es preciso mencionar que la falta de efecto del inhibidor de caspasa podría deberse a un problema de concentración, ya que en un estudio previo con astrocitos de corteza una concentración de ZVAD de 200 μM inhibió completamente la muerte inducida por estaurosporina (D'Alimonte and Patrizia Di Iorio 2007). En apoyo a estos datos, en algunos experimentos realizados en presencia de ZVAD (200 μM) observamos una reducción evidente en el número de núcleos condensados, sugiriendo una inhibición del proceso apoptótico. Independientemente de esto, en ninguna de las concentraciones empleadas de ZVAD observamos una inhibición de los cambios morfológicos inducidos por la condición estaurosporina. De manera complementaria probamos que el inhibidor de calpaína no inhibió ni el proceso de muerte ni los cambios morfológicos inducidos por las distintas condiciones. Esto sugiere que

posiblemente la formación de procesos en estaurosporina no está relacionada directamente con el proceso de muerte celular. Para esclarecer esto habrá de realizarse trabajos de viabilidad y de descripción morfológica en distintos tiempos.

En la condición ionomicina también se presentan una serie de cambios morfológicos que corresponden a un alargamiento de la célula y cuerpos amorfos. Esto podría relacionarse con los niveles de calcio intracelular y o a etapas subsecuentes que llevan al proceso de muerte necrótico. En otros trabajos se ha visto que los cambios morfológicos inducidos por ionomicina, son reversibles, inhibidos por EGTA e independientes del calcio extracelular (Fawthrop D 1987), esto sugiere que el Ca^{2+} participa en los cambios morfológicos de los astrocitos. Una elevación de los niveles de calcio intracelular puede activar una serie de mecanismos asociados al proceso de muerte celular como la activación de calpaínas y endonucleasas (McConkey D 1997).

Con la finalidad de evaluar el papel de las calpaínas se probó el efecto del inhibidor de calpaína I. Bajo estas condiciones no se inhibió tanto el proceso de muerte como los cambios morfológicos inducidos por ionomicina. Resultados similares se obtuvieron en presencia de ZVAD, sugiriendo que al igual que en el caso de la estaurosporina, las caspasas ni las calpainas intervienen en el proceso de muerte ni de los cambios morfológicos inducidos por Ca^{2+} . Posiblemente el efecto del Ca^{2+} en la morfología esté relacionado con la organización del citoesqueleto de actina, en este sentido distintas proteínas sensibles al calcio participan en la dinámica del citoesqueleto de actina, tal es el caso de α -actinina y α -espectrina, (Wyszynski 1997; Wechsler A 1998).

De manera interesante, el inhibidor de calpaína 1, por si solo es capaz de provocar un cambio morfológico en los astrocitos. Aunque la actividad de las calpaínas posiblemente no está relacionada con los cambios asociados a la condición I, quizá si esté relacionado con los cambios asociados a la condición IC; se sabe que los cambios morfológicos pueden estar asociados a la actividad de proteasas (Iwig M 1995), posiblemente los cambios asociados a la condición IC están mediados por la inhibición de proteasas, en particular es posible que la actividad basal de las calpaínas regule el arreglo del citoesqueleto.

En el caso de la privación de suero, también están presentes una serie de cambios morfológicos y una limitada baja en la viabilidad. Al igual que en las condiciones anteriores, los inhibidores de caspasas y calpaínas tuvo efecto sobre estas características.

En general las condiciones que presentan un cambio a la forma tipo estrellada siguen una serie de cambios específicos, primero las fibras de estrés que determinan una morfología aplanada o poligonal, pierden su arreglo y se forman pequeños cúmulos, posteriormente los filamentos de actina se organizan en haces que sustentan la morfología del astrocito, en el caso de los microtúbulos estos se disponen como una red difusa que surge en un punto concentrado que posiblemente se trata del centro organizador de microtúbulos, durante los cambios morfológicos los microtúbulos únicamente parecen concentrarse en un haz que determina la morfología del astrocito.

Parece ser que la organización del citoesqueleto de actina es clave en la morfología de los astrocitos (Suidan H 1997; Sam Safavi-Abbasi 2001; Abe 2003; Pagonini S 2004; Virgili Perez 2005; Chun-Jung Chen 2006; Rouach N 2006), su arreglo es regulado por los miembros de la familia Rho de GTPasas pequeñas (Hall 1998), la activación de Rho lleva a la formación de fibras de estrés, estas fibras son haces de filamentos de actina y miosina, el ensamble de los filamentos de miosina requiere la fosforilación de la cadena ligera de la miosina, esto lo hace la cinasa MLC que a su vez está regulada por la fosfatasa MLC; cuando RhoA es activada, estimula a la cinasa RHO que a su vez inhibe a la fosfatasa MLC y se promueve la formación de fibras de estrés. La cinasa RHO también promueve la fosforilación de cofilina a través de la cinasa LIM. (Koyama Y 1996; Kalman D 1999; Maekawa M 1999; Ridley 2001; Lin O 2003).

Los cambios morfológicos asociados a St, podrían estar mediados por una inhibición de Rho, la estaurosporina es un inhibidor general de cinasas que presenta cierta especificidad por miembros de la familia PKC. En algunos trabajos se ha visto que la actividad de estas cinasas, en particular PKC_{ϵ} , promueve la despolimerización de fibras de estrés induciendo el cambio a la forma estrellada, (Burgos M 2007). Por otro lado en otro trabajo (Mehta D 2001) muestran que la actividad de PKC_{α} activa a Rho fosforilando directamente a GDI. En la privación de suero la ausencia del ácido fosfatídico podría ser la causa de los cambios morfológicos, el ácido fosfatídico activa a RhoA, ésta promueve la formación de fibras de estrés y por lo tanto, la morfología tipo aplanada (Suidan H 1997). Además, la activación de Rho estabiliza subpoblaciones de microtúbulos (Cook T 1998). Si la vía de Rho es inactivada, se despolimerizan las fibras de estrés y consecuentemente ocurre un cambio morfológico.

Todos los cambios morfológicos están sustentados por los elementos del citoesqueleto, los distintos elementos están comunicados entre si por distintas proteínas y la modificación de uno de los elementos puede llevar a la modificación de otros. *In vivo* estos cambios poseen implicaciones fisiológicas importantes en la neuroprotección y en el funcionamiento normal del SNC. Esta plasticidad de los astrocitos se ve reflejada en la capacidad de cambiar morfológicamente.

VII. CONCLUSIONES

En este trabajo se evaluaron los cambios morfológicos de los astrocitos en condiciones de estrés celular, en todas las condiciones los astrocitos presentaron cambios morfológicos. Algunos de estos cambios pueden asociarse a los procesos de muerte celular, mientras que otros pueden estar más relacionados con la capacidad de respuesta que tienen los astrocitos ante distintas condiciones. Todos estos cambios están sustentados por los componentes del citoesqueleto, siendo este un punto en el cual convergen distintas vías de señalización. En este trabajo se muestra que dichos cambios posiblemente ocurren por un rearrreglo de los elementos del citoesqueleto y no por síntesis o degradación de los mismos.

VIII. REFERENCIAS

- Abe, K. y. M., M. (2003). "Astrocyte stellation induced by Rho kinase inhibitors in culture." Brain Res. Dev. Brain Res **143**: 99-104.
- Adams J, C. S. (1998). "The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival." Science **281**: 1322-1326.
- Artal-Sanz M, T. N. (2005). "Proteolytic mechanisms in necrotic cell death and neurodegeneration." FEBS Letters **579** 3287–3296.
- Ashkenazi A, D. V. (1998). "Death receptors: signaling and modulation." Science. **281**(5381): 1305-8.
- Barres B, S. S. (2001). "Neurobiology.Cholesterol--making or breaking the synapse." Science **294**(5545): 1296-7.
- Berglund H, O. D., Sankar A, Federwisch M, McDonald NQ, Driscoll PC (2000). "The three-dimensional solution structure and dynamic properties of the human FADD death domain." J Mol Biol **302**(1): 171-88.
- Blystone S (2004). "Integrating an integrin: a direct route to actin." Biochim Biophys Acta **1692** (2-3): 47-54.
- Burakov A, N. E. (2006). "Dynein and dynactin as organizers of the system of cell microtubules." Ontogenez **37**(5): 323-39.
- Burgos M, C. S., Molina F, Vaquero C, Samarel A, Llopis J, Tranque P (2007). "PKCe induces astrocyte stellation by modulating multiple cytoskeletal proteins and interacting with Rho A signalling pathways: implications for neuroinflammation." European Journal of Neuroscience **25**: 1069–1078.
- Byers H, W. G., Fujiwara K (1984). "Organization and function of stress fibers in cells in vitro and in situ." Cell Muscle Motil **5** 83-137.
- Cohen G (1997). "Caspases: the executioners of apoptosis." Biochem. J. **326**: 1-16.
- Cook T, N. T., Gundersen G. (1998). "Rho guanosine triphosphatase mediates the selective stabilization of microtubules induced by lysophosphatidic acid." J Cell Biol **141**: 175-185.
- Craig R, W. J. (2006). "Structure and function of myosin filaments." Curr Opin Struct Biol **16**(2): 204-12.
- Croft D, C. M., Li S, Robertson D, Sullivan T, Stewart C, Olson M (2005). "Actin-myosin-based contraction is responsible for apoptotic nuclear disintegration " J Cell Biol **168**(2): 245-55.

- Croisier E, G. M. (2006). "Glial degeneration and reactive gliosis in alpha-synucleinopathies: the emerging concept of primary gliodegeneration." Acta Neuropathol **112**(5): 517-30.
- Chan W, K. S., Rezaie P (2007). "The origin and cell lineage of microglia: new concepts." Brain Res Rev **53**(2): 344-54.
- Chen C, O. Y., Lin S, Liao S, Huang Y, Chiang A, (2006). "l-Glutamate activates RhoA GTPase leading to suppression of astrocyte stellation." European Journal of Neuroscience **23**: 1977–1987.
- Chen Y, S. R. (2003). "Astrocytes and brain injury." J Cereb Blood Flow Metab **23**(2): 137-49.
- Chun-Jung Chen, Y.-C. O., Shih-Yi Lin, Su-Lan Liao, Yong-San Huang and An-Na Chiang (2006). "l-Glutamate activates RhoA GTPase leading to suppression of astrocyte stellation." European Journal of Neuroscience **23**: 1977–1987.
- D'Alimonte, I., Patrizia Ballerini, Eleonora Nargi, Silvana Buccella, Patricia Giuliani, and F. C. Patrizia Di Iorio, Renata Ciccarelli (2007). "Staurosporine-induced apoptosis in astrocytes is prevented by A1 adenosine receptor activation." Neuroscience Letters **418**(66-71).
- Defilippi P, O. C., Venturino M, Dolce L, Silengo L, Tarone G (1999). "Actin cytoskeleton organization in response to integrin-mediated adhesion." Microsc Res Tech **47**(1): 67-78.
- Desai A, M. T. (1997). "Microtubule polymerization dynamics." Annu. Rev. Microbiol. Cell Dev. Biol **13**: 83-117.
- Drubin D, N. W. (1996). "Origins of cell polarity." Cell **84** 335-344.
- Eliasson C, S. C., Berthold C, (1999). " Intermediate filament protein partnership in astrocytes." J Biol Chem **274**(23): 996-24
- Etienne-Manneville S, H. A. (2002). "Rho GTPases in cell biology." Nature **420**: 629-635.
- Fawthrop D, E. R. (1987). "Morphological changes in cultured astrocytes following exposure to calcium ionophores." Neuroscience Letters **81**: 250 -256.
- Ferreira A, B. J., Cáceres A (1989). "Microtubule formation and neurite growth in cerebellar macroneurons which develop in vitro: evidence for the involvement of the microtubule-associated proteins, MAP-1a, HMW-MAP2 and Tau." Brain Res Dev Brain Res **49**(2): 215-28.
- Festjens N, V. B. T., Vandenabeele P (2006). "Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response." Biochim Biophys Acta **1757**(9-10): 1371-87.

Funchal C, G. C., de Almeida L, dos Santos A, Wajner M, Pessoa-Pureur R (2004). "Morphological Alterations and Cell Death Provoked by the Branched-Chain α -Amino Acids Accumulating in Maple Syrup Urine Disease in Astrocytes from Rat Cerebral Cortex." Cellular and Molecular Neurobiology **25**(5): 851-862.

Furukawa R, F. M. (1997). "The structure, function, and assembly of actin filament bundles." Int. Rev. Cytol. **175** 29-90.

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

Goldman, J. E. y. A., B. (1990). "Cyclic AMP-induced shape changes of astrocytes are accompanied by rapid depolymerization of actin."
." Brain Res **528**: 189–196.

Golstein P, K. G. (2007). "Cell death by necrosis: towards a molecular definition." Trends Biochem Sci **32**(1): 37-43.

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

Hall, A. (1998). "Rho GTPases and the actin cytoskeleton." Science **279**: 509-514.

Hanahan D, W. R. (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **7;100**(1): 57-70.

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

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

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

Herrmann H, A. U. (1998). "Intermediate filament assembly: fibrillogenesis is driven by decisive dimer-dimer interactions " Curr. Opin. Struct. Biol. **8**: 177-185.

Hill T, K. M. (1982). "Subunit treadmilling of microtubules or actin in the presence of cellular barriers: possible conversion of chemical free energy into mechanical work." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79**: 490-494.

Howard J, H. A. (2007). "Microtubule polymerases and depolymerases." Curr Opin Cell Biol **19**(1): 31-5.

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

Iwig M, C. E., Müller A, Gruner M, Spindler M, Glaesser D (1995). "Growth regulation by cell shape alteration and organization of the cytoskeleton." Eur J Cell Biol **67**(2): 145-157.

Janmey P (1998). "The cytoskeleton and cell signaling: component localization and mechanical coupling." Physiol. Rev **78**: 763-781.

Janmey P, I. K., Yin H, Stossel T (1987). "Polyphosphoinositide micelles and polyphosphoinositide-containing vesicles dissociate endogenous gelsolin-actin complexes and promote actin assembly from the fast-growing end of actin filaments blocked by gelsolin." J Biol Chem **262**(25): 12228-36.

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

Kalai M, V. L. G., Vanden Berghe T, Meeus A, Burm W, Saelens X, Vandenabeele P (2002). "Tipping the balance between necrosis and apoptosis in human and murine cells treated with interferon and dsRNA." Cell Death Differ **9** 981-994.

Kalman D, S. N., Stephen H, Kitamura M, Michael B, (1999). "Ras Family GTPases Control Growth of Astrocyte Processes." Mol. Biol. Cell. **10**(5): 1665-1683.

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

Kerr J, W. A., Currie A (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." Br J Cancer **26**(4): 239-57.

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

Koyama Y, B. A. (1996). "Endothelin-Induced Cytoskeletal Actin Re-Organization in Cultured Astrocytes: Inhibition by C, ADP-Ribosyltransferase." Glia **16**(342-350).

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

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

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

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

Lee M, C. D. (1996). " Neuronal intermediate filaments " Annu. Rev. Neurosci **19**: 187-217.

Leist M, N. P. (1998). "Apoptosis versus necrosis: the shape of neuronal cell death." Results Probl Cell Differ **24**: 105-35.

Li P, N. D., Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M (1997). "Cytochrome c and dATPdependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade." Cell **91**: 479-489.

- Lin O, Z. L., Liu Y, DeFea K, Schwartz M, Chien S, John Y, Shyy J, (2003). "Rho-ROCK-LIMK-Cofilin Pathway Regulates Shear Stress Activation of Sterol Regulatory Element Binding Proteins." American Heart Association, Inc. **92**: 1296-1304.
- Linck R, S. R. (2007). "Functional protofilament numbering of ciliary, flagellar, and centriolar microtubules." Cell Motil Cytoskeleton **64**(7): 489-95.
- Liu X, K. C., 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.
- Lüders J, S. T. (2007). "Microtubule-organizing centres: a re-evaluation." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(2): 161-7.
- Madden K, S. M. (1998). "Cell polarity and morphogenesis in budding yeast " Annu. Rev. Microbiol **52** 687-744.
- Maekawa M, I., T, Boku S, Watanabe N, Fujita A, Iwamatsu A, Obinata T, Ohash K, Mizuno K, Narumiya S, (1999). "Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIMkinase." Science **285**(895-898).
- Mahesh V, D. K., Brann D (2006). "Role of astrocytes in reproduction and neuroprotection." Mol Cell Endocrinol **246**(1-2): 1-9.
- McConkey D, O. S. (1997). " The Role of Calcium in the Regulation of Apoptosis." Biochemical and Biophysical Research Communications **239**: 1997.
- Mehta D, R. A., Malik A (2001). "Protein Kinase C-alpha Signals Rho-Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitor Phosphorylation and Rho Activation and Regulates the Endothelial Cell Barrier Function." J. Biol. Chem **276**(25): 22614-22620.
- Morán J, P. A. (1989). "Effect of potassium depolarization on phosphateactivated glutaminase activity in primary cultures of cerebellar granule neurons and astroglial cells during development, ." Dev. Brain Res **46**: 97–105.
- Muzio M (1998). "Signalling by proteolysis: death receptors induce apoptosis." Int J Clin Lab Res **28**(3): 141-7.
- Ness J, V. M., McIver S, Goldberg M (2005). "Identification of oligodendrocytes in experimental disease models." Glia **50**(4): 321-8.
- Nicholson D, T. N. (1997). "Caspases: killer proteases." Trends Biochem Sci **22**(8): 299-306.
- Nijhawan D, H. N., Wang X (2000). "Apoptosis in neural development and disease." Annu Rev Neurosci **23**: 73-87.
- Pagonini S, A. K., Ferreira A, (2004). "Differential Subcellular Localization of Ror Tyrosine Kinase Receptors in Cultured Astrocytes." Glia **46**: 456–466.

- Pantaloni D, L. C. C., Carlier MF (2001). "Mechanism of actin-based motility " Science **292**: 1502-1506.
- Parsons J, M. K., Slack J, Taylor J, Weed S (2000). "Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement." Oncogene **19**(49): 5606-13.
- Pawlak, G., Helfman, G (2001). "Cytoskeletal changes in cell transformation and tumorigenesis." Current Opinion in Genetics & Development **11**(1): 41-47.
- Pekny M (2001). "Astrocytic intermediate filaments: lessons from GFAP and vimentin knock-out mice." Prog Brain Res **132** 23-30.
- Pekny M, W. U., Bogestål YR, Pekna MT (2007). "The role of astrocytes and complement system in neural plasticity." Int Rev Neurobiol **82**: 95-111.
- Perez V, B. T., Fernandez C, Bockaert J, Journot L (2005). "Dynamic reorganization of the astrocyte actin cytoskeleton elicited by cAMP and PACAP: a role for phosphatidylinositol 3-kinase inhibition." European Journal of Neuroscience **21**: 26-32.
- Pocock J, K. H. (2007). "Neurotransmitter receptors on microglia." Trends Neurosci **30**(10): 527-35.
- Puthalakath, H., D.C. Huang, L.A. O'Reilly, S.M. King and A. Strasser (1999). "The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex " Mol Cell **3**: 287–296.
- Puthalakath, H., Villunger A, O'Reilly L, Beaumont J, Coultas L, Cheney R, Huang D, Strasser A (2001). "BMF: A proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis." Science **293**(1829-1832).
- Raftopoulou M, H. A. (2004). "Cell migration: Rho GTPases lead the way." Dev Biol. Jan **265**(1): 23-32.
- Ramakers, G. J. A. y. M., W.H. (1998). "Regulation of astrocyte morphology by RhoA and lysophosphatidic acid." Exp. Cell Res **245**: 252–262.
- Raynaud-Messina B, M. A. (2007). "Gamma-tubulin complexes and microtubule organization." Curr Opin Cell Biol **19**(1): 24-30.
- Revenu C, A. R., Robine S, Louvard D (2004). "The co-workers of actin filaments: from cell structures to signals." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(8): 635-46.
- Ridley, A. (2001). "The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibres in response to growth factors." FEBBS Lett **498**: 168-171.
- Rivero F, C. F. (2007). "Origins and evolution of the actin cytoskeleton." Adv Exp Med Biol **607**: 97-110.

Roberts-Lewis J, S. M., Marcy V, Pinsker L, Siman R (1994). "Immunolocalization of calpain I-mediated spectrin degradation to vulnerable neurons in the ischemic gerbil brain." J. Neurosci **14**: 3934-3944.

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

Rosso, L., Peteri-Brunbač, B., Vouret-Caraviari, V., Deroanne, C., Troadec, J.D., Thirion, S., Obberghen-Schilling, E.V. & Mienville, J.M. (2002). "RhoA inhibition is a key step in pituicyte stellation induced by A1 type adenosine receptor activation." glia **38**: 351-362.

Rouach N, P. A., Meme W, Cordier J, Ezan P, Etienne E, Giaume C, Tence M (2006). "S1P inhibits gap junctions in astrocytes: involvement of Gi and Rho GTPase/ROCK." European Journal of Neuroscience **23**: 1453–1464.

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

Safavi-Abbasi S, W. J., Missler M, (2001). "Rapid Morphological Changes in Astrocytes Are Accompanied by Redistribution But Not by Quantitative Changes of Cytoskeletal Proteins." Glia **36**(1): 102 - 115.

Sam Safavi-Abbasi, J. R. W., Markus Missler (2001). "Rapid Morphological Changes in Astrocytes Are Accompanied by Redistribution But Not by Quantitative Changes of Cytoskeletal Proteins." Glia **36**(1): 102 - 115.

Schmitz A, G. E., Bottner B, Van-Aelst L (2000). "Rho GTPases: signaling, migration, and invasion." Exp. Cell Res **261** 1-12.

Schoenwaelder S, B. K. (1999). "Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins." Curr Opin Cell Biol **11**(2): 274-86.

Schweichel J, M. H. (1973). "The morphology of various types of cell death in prenatal tissues." Teratology **7**(3): 253-66.

Siegel R, M. D., Zheng L, Ng S, Bertin J, Cohen J, Lenardo M (1998). "Death-effector filaments: novel cytoplasmic structures that recruit caspases and trigger apoptosis." J Cell Biol. **141**(5): 1243-53.

Skowronek K, K. E., Kasprzak A (2007). "Subunits interactions in kinesin motors." Eur J Cell Biol **86**(9): 559-68.

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

Squier M, M. A., Malkinson A, Cohen J (1994). "Calpain activation in apoptosis." J. Cell. Physiol **159**: 229-237.

Suidan H, N. C., Hall A, Monard D, (1997). "Astrocyte Spreading in Response to Thrombin and Lysophosphatidic Acid Is Dependent on the Rho GTPase." Glia **21**: 244–252.

Thompson C (1995). "Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease." Science **10;267**(5203): 1456-62.

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

Thornberry N, L. Y. (1998). "Caspases: enemies within." Science **281**: 1312-1316.

Verdaguer E, A. D., Jiménez A, Rimbau V, Camins A, Pallás M, (2005). "Inhibition of the cdk5/MEF2 pathway is involved in the antiapoptotic properties of calpain inhibitors in cerebellar neurons." British Journal of Pharmacology **145**: 1103–1111.

Villa P, W. J., Henzel W, Sensenbrenner M, Henderson C, Pettmann B (1998). "Calpain inhibitors, but not caspase inhibitors, prevent actin proteolysis and DNA fragmentation during apoptosis." Journal of Cell Science **111**: 713-722.

Virgili Perez, T. B., Céline Fernandez, Joel Bockeaert yLaurent Journot (2005). "Dynamic reorganization of the astrocyte actin cytoskeleton elicited by cAMP and PACAP: a role for phosphatidylinositol 3-kinase inhibition." European Journal of Neuroscience **21**: 26-32.

Wade R (2007). "Microtubules: an overview." Methods Mol Med **137**: 1-16.

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

Wechsler A, T. V. (1998). "Brain spectrin binding to the NMDA receptor is regulated by phosphorylation, calcium and calmodulin." EMBO J **17**: 3931-3939

Wilhelmsson U, L. L., Pekna M (2004). "Absence of glial fibrillary acidic protein and vimentin prevents hypertrophy of astrocytic processes and improves post-traumatic regeneration." J Neurosci **24**: 5016-5021.

Wu W, L. D., A-Cerione R, Manor D (1997). "Interaction between Cdc42Hs and RhoGDI is mediated through the Rho insert region." J Biol Chem **272**(42): 26153-8.

Wyszynski, M., J. Lin, A. Rao, E. Nigh, AH Begga, A.M. Craig, M. Sheng. 1997. . 385: 439-442. (1997). "Competitive binding of alpha-actinin and calmodulin to the NMDA receptor." Nature **385**: 439-442.

Young B. Lee, S. D., Hyewhon Rhim, Eunhee B. Lee, George J. Markelonis, Tae H. Oh (2000). "Rapid increase in immunoreactivity to GFAP in astrocytes in vitro induced by acidic pH is mediated by calcium influx and calpain I." Brain Research **864**: 220–229.

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

Yuan J, L. M., Degtrev A (2003). "Diversity in the mechanisms of neuronal cell death." Neuron **40**(2): 401-13.

Zong W, T. C. (2006). "Necrotic death as a cell fate." Genes Dev **20**(1): 1-15.

Zou H, L. 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.