

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

PAPEL DEL CITOESQUELETO EN LOS CAMBIOS  
MORFOLÓGICOS DURANTE LA MUERTE APOPTÓTICA DE  
LAS CÉLULAS GRANULARES DEL CEREBELO

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

ALETTE ORTEGA GOMEZ

TUTOR PRINCIPAL: DR. JULIO MORAN ANDRADE

MÉXICO, D.F.

DICIEMBRE, 2010



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.

# Papel del citoesqueleto en los cambios morfológicos durante la muerte apoptótica de las células granulares del cerebelo.

## **RESUMEN**

### **ABSTRACT**

#### **1. INTRODUCCIÓN**

- 1.1 Muerte Celular Programada
- 1.2 Tipos de Muerte Celular
  - 1.2.1 Apoptosis
  - 1.2.2 Necrosis
  - 1.2.3 Autofagia
- 1.3 Proteínas del Citoesqueleto
  - 1.3.1 Microfilamentos
  - 1.3.2 Microtúbulos
- 1.4 Apoptosis y Citoesqueleto
- 1.5 Neuronas Granulares de Cerebelo (NGC)

#### **II. JUSTIFICACION**

#### **III HIPÓTESIS**

#### **IV. OBJETIVO GENERAL**

- 3.1 Objetivos Particulares

#### **V. MATERIALES Y MÉTODOS**

- 4.1 Cultivo Celular
- 4.2 Evaluación Morfológica
- 4.3 Inmunohistoquímica
- 4.4 Evaluación de proteínas por el Método de Bradford
- 4.5 Western blot
- 4.6 Análisis Estadístico

#### **VI. RESULTADOS**

- 5.1 Cambios Morfológicos en NGC durante la muerte apoptótica inducido por K5 y STS.
- 5.2 Modificaciones de actina y  $\beta$  tubulina en NGC durante la muerte apoptótica inducida por K5 y STS.
- 5.3 Participación de caspasas y calpaínas en los cambios morfológicos de las NGC inducidos por K5 y STS.
- 5.4 Participación de caspasas y calpaínas en las alteraciones de actina y  $\beta$ -tubulina de las NGC inducidos por K5 y STS.

5.5 Niveles de actina y  $\beta$  tubulina de las NGC inducidos por K5 y STS.

5.6 Fragmentación de  $\alpha$ -espectrina inducida por K5 y STS.

**VII. DISCUSIÓN**

**VIII. CONCLUSIONES**

**IX. REFERENCIAS**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco el apoyo que recibí por parte del Posgrado en Ciencias Biológicas durante mis estudios de Doctorado.

El trabajo se apoyo por los donativos de CONACYT (79788) y de DGAPA-UNAM (IN223107 y IN218310). Durante los estudios de Doctorado conté con la beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Agradezco a los miembros del Comité Tutorial: Dra. María Luisa Fanjul, Dra. Rocío Salceda Sacanelles, Dra. Alicia Elizabeth Hernández Echeagaray, Dra. Limei Zhang Ji, Dr. Julio Morán Andrade, Dr. Abel Santamaría del Angel, Dra. Ana Brigida Clorinda Arias Alvarez.

Este trabajo se realizó en la División de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Julio Morán Andrade.

Agradezco la excelente ayuda y apoyo técnico de la Bióloga Guadalupe Domínguez Macouzet para el desarrollo de este trabajo.

## RESUMEN

Existen evidencias de que durante la muerte celular las proteínas del citoesqueleto son sustrato de diversas proteasas. En este trabajo, evaluamos el papel de las proteasas y los cambios de las proteínas del citoesqueleto durante la muerte celular inducida por dos condiciones apoptóticas, la privación de un estímulo despolarizante, colocando concentraciones bajas de potasio (KCl 5mM) y un inhibidor general de cinasas, la estaurosporina (STS) en neuronas granulares de cerebelo (NGC). Bajo estas condiciones encontramos que el KCl 5mM (K5), induce alteraciones en los somas neuronales manteniendo relativamente preservadas a las neuritas en un tiempo en el que la viabilidad celular disminuye de manera importante. Estos cambios parecen corresponder a la reorganización de actina y tubulina en las neuritas. Por el contrario, la estaurosporina induce alteraciones tempranas en las neuritas y una modificación más tardía de los somas asociada a un rearrreglo de la actina y tubulina. El inhibidor general de caspasas evitó el rearrreglo de actina y de tubulina que se observa en las neuritas y somas de las NGC tratadas con estaurosporina. La reorganización de actina y tubulina inducida por K5 también se previno utilizando un inhibidor de caspasas. Por otro lado, el inhibidor de general de calpaínas I, no afectó la reorganización de actina ó de tubulina inducida por STS, K5 o ionomicina. Los niveles de tubulina y actina no se modificaron por el tratamiento con K5 por 12 h; por otro lado, la estaurosporina indujo un aumento en los niveles de tubulina y actina después de 24h de tratamiento. Ninguno de los inhibidores de proteasas modificó los niveles de tubulina con STS. En contraste, el inhibidor de caspasas redujo el incremento en la expresión de actina por STS a las 24 h. Estos resultados sugieren que las proteínas de citoesqueleto en las NGC sufren alteraciones tanto en los niveles como en la reorganización de actina y tubulina, dependiendo de la condición apoptótica a la que se expongan.

## **ABSTRACT**

Cytoskeleton proteins are substrates for proteases and play a role in apoptotic death. We evaluated the participation of cytoskeleton in morphological changes during cell death induced by two apoptotic conditions, potassium deprivation (K5) and staurosporine (STS), in cerebellar granule neurons (CGC). We found that K5 induced somatic damage, but neurites were relatively preserved, which corresponded to the reorganization of actin and  $\alpha$ -tubulin in neurites. Staurosporine (STS) induced an early alteration of neurites with reorganization of cytoskeleton proteins in somas, with a partial preservation of somas during the first phase of cell death. The caspase inhibitor ZVAD totally inhibited STS-induced  $\alpha$ -tubulin reorganization and partially blocked STS-induced actin reorganization.  $\alpha$ -tubulin and actin reorganization induced by K5 was also affected by ZVAD. Calpain inhibitor (IC1) did not affect  $\alpha$ -tubulin or actin reorganization induced by STS, K5 or a necrotic condition induced by ionomycin. K5 condition did not alter  $\alpha$ -tubulin or actin levels. STS increased  $\alpha$ -tubulin and actin levels, but neither ZVAD nor IC1 changed  $\alpha$ -tubulin levels upon STS treatment. In contrast, ZVAD reduced the STS-induced increase of actin levels. These results suggest that CGC cytoskeleton proteins undergo a differential expression and reorganization depending on the apoptotic condition.

## **I. INTRODUCCION**

### **1.1 Muerte Celular Programada**

Durante el desarrollo del sistema nervioso ocurren procesos que se requieren para la maduración y diferenciación celular. En el cerebelo de rata existe una gran actividad celular y molecular durante la proliferación, diferenciación y migración de las neuronas cerebelares previas al nacimiento y durante las siguientes 3 semanas de vida del animal (Itoh, 1984). La muerte celular programada (MCP) es un proceso fundamental para el desarrollo del Sistema nervioso (SN) y también se considera que, después del nacimiento, cerca de la mitad de las neuronas generadas durante la proliferación mueren como resultado de la activación de un programa de muerte apoptótica en respuesta a señales externas e internas (Itoh, 1984). En la mayoría de los casos la MCP asegura la remoción de células generadas en exceso, sin función aparente o potencialmente dañinas para los tejidos, lo cual mantendrá los circuitos neuronales funcionales, permitiendo así el procesamiento y la comunicación neuronal (Jacobson et al, 1997; Hamburger et al, 1980; Buss et al, 2006;) También ocurre MCP como parte de algunas patologías durante daño neuronal y enfermedades crónico-degenerativas del SN. La MCP que ocurre en el desarrollo tiene lugar en todos los grupos taxonómicos e incluye sistemas neuronales en el sistema nervioso central y periférico. La MCP se ha caracterizado por ser un proceso adaptativo, el cual mantiene la morfología de la neuronas en las diferentes regiones del SN, ya sea durante su desarrollo y en el SN maduro (Oppenheim, 1991). La MCP se definió originalmente como apoptosis debido a que los mecanismos genéticos y bioquímicos que ocurren son los mismos. Sin embargo, se han descrito mecanismos de muerte programados con características no apoptóticas, lo que ha llevado a redefinir a más de un tipo de MCP.



## **1.2 Tipos de Muerte Celular**

### **1.2.1 Apoptosis**

La apoptosis es uno de los tipos de muerte celular programada más comunes durante el desarrollo embrionario y en algunos procesos fisiológicos de los organismos maduros como es el recambio tisular. La apoptosis también se ha sugerido que ocurre en las enfermedades neurodegenerativas como las enfermedades de Alzheimer, Huntington y Parkinson, así como otras como isquemia, esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y diversos desórdenes autoinmunes (Gao et al, 2005).

La apoptosis es un proceso activo que ocurre de manera secuencial y ordenada. Este tipo de muerte requiere de energía y de síntesis de proteínas (Oppenheim, 1990). En la apoptosis se preservan las membranas celulares, lo que permite la formación de cuerpos apoptóticos, evitando el vaciamiento del contenido celular, sin procesos inflamatorios asociados (Kerr et al., 1972; Ellis et al, 1991; Chimini, 2002; Green y Beere, 2001). La apoptosis puede ser distinguida de otros tipos de muerte por sus características morfológicas y moleculares asociadas (Kerr and Harmon, 1991). Dentro de las características moleculares se ha demostrado la fragmentación del ADN, la translocación de fosfatidilserina de la capa interna a la capa externa de la membrana plasmática y la activación de caspasas (Cohen, 1997).

Las características morfológicas asociadas a la apoptosis incluyen encogimiento celular, condensación y fragmentación nuclear, formación de protuberancias en la membrana plasmática y formación de cuerpos apoptóticos (Kerr et al, 1972). Una parte de éstos cambios se deben a la participación de las caspasas (Thornberry, 1998). Estas son proteasas de cisteína que son parte fundamental de la maquinaria bioquímica que participa en la iniciación y ejecución de la muerte apoptótica. Hasta ahora se han identificado catorce caspasas diferentes. Su clasificación está relacionada con su activación durante la progresión de la muerte (Hengartner, 2000).

Las caspasas iniciadoras activan a las caspasas ejecutoras que tienen como blancos finales a una serie de sustratos que incluyen enzimas, receptores y proteínas del citoesqueleto, entre otros (Oppenheim, 1990). Las caspasas reconocen una secuencia de cuatro residuos de aminoácidos, algunos de los cuales le confieren la selectividad por el sustrato. Las caspasas están presentes en la célula como zimógenos, por lo que requieren ser proteolizadas para su activación, la cual se inicia con la fragmentación de los sus dominios y la asociación subsecuente de éstas subunidades catalíticas. Los mecanismos de activación de caspasas incluyen: la acción proteolítica de la misma caspasa (actividad basal) ó de otra caspasa diferente previamente activa (Salvensen et al, 1999; Hengartner, 2000).

En la vía intrínseca de activación de caspasas, la caspasa 9 se activa a través de la formación de un complejo molecular llamado apoptosoma, constituido por procaspasa-9, ATP, Apaf-1 (factor apoptótico activador de caspasas) y citocromo C, que se libera de la mitocondria en respuesta a una condición proapoptótica (Hengartner, 2000). La vía intrínseca de activación de caspasas lleva finalmente a la fase ejecutora de la muerte a través de la activación de caspasas 3, 6 ó 7 (Lockshin et al, 2004; Zhuang et al, 1999). Por otro lado, la vía extrínseca involucra la activación de receptores de muerte presentes en la membrana plasmática (Ashkenazi et al, 1998), lo que induce el anclaje intracelular de moléculas adaptadoras, formando un complejo molecular (DISC) que permite unir con alta afinidad a una de las caspasas iniciadoras, la caspasa 8, iniciando su autoactivación. Finalmente, existe una vía de activación que se inicia en respuesta a una condición de estrés y que involucra al retículo endoplásmico (Levine, 2008). En este caso, se ha observado que la sobreexpresión de Bax induce la liberación de calcio del retículo endoplásmico lo que promueve un aumento en el flujo de calcio intramitocondrial y así, la liberación del citocromo C de la mitocondria, lo que activa caspasas (Rao, 2004).

Particularmente, cuando se mantienen las NGC por 6-8 DIV en KCl 25 mM (K25) y se transfieren a un medio con KCl 5mM (K5), alrededor del 40-50% de las

células mueren en 24-48 h respectivamente, con características apoptóticas con la activación de las caspasas 9 como iniciadora y la caspasa 3 como ejecutora de la muerte, liberación de citocromo-c, translocación de fosfatidilserina, condensación nuclear y fragmentación internucleosomal del DNA ( Moran J et al, 1999; Caballero and Morán, 2003). Cuando se tratan las células con estauroporina (STS), un inhibidor de general de cinasas, también mueren con características apoptóticas. Esta muerte está acompañada por la activación de la caspasa 2 y 9 como iniciadoras y la caspasa 3 como ejecutora de la muerte, de la liberación de citocromo-c y fragmentación nuclear (Caballero and Morán, 2003).

### **1.2.2 Necrosis**

La necrosis se ha caracterizado como un proceso de muerte accidental ó pasivo. Este tipo de muerte no está programado genéticamente. Se caracteriza por presentar un hinchamiento celular, ruptura de membranas, degradación del DNA inespecífica y el vaciamiento del contenido intracelular, lo que contribuye a la generación de procesos inflamatorios asociados. La necrosis está relacionada con eventos de isquemia ó hipoglucemia que se asocian a procesos excitotóxicos ó inflamatorios. Se han descrito algunos modelos en los que se promueve necrosis, donde se involucran citocinas extracelulares, estimulación de receptores excitadores o especies reactivas de oxígeno (ROS) que inducen un aumento en la concentración de calcio intracelular. Este aumento de calcio puede ser responsable de la activación de un grupo de proteasas conocidas como calpaínas. Las calpaínas proteolizan una gran cantidad de enzimas, factores de transcripción, así como proteínas de citoesqueleto. La actividad de calpaínas se ha observado también durante la muerte apoptótica (Lankiewicz et al, 2000; Nath et al. 1996; Chua, 2000). Existen evidencias que sugieren que la apoptosis y la necrosis presentan diferencias morfológicas y bioquímicas muy bien descritas. Sin embargo bajo ciertas circunstancias de estrés ninguno de los dos tipos de muerte predomina. Esto sugiere un entrecruzamiento de

información entre ambos tipos de muerte. La información cruzada se promueve entre caspasas y calpaínas (Farber, 1994; Levin, 1998; Hirsch et al, 1997). Es por esto, que la búsqueda de marcadores biológicos como la  $\alpha$ -espectrina permite distinguir la activación de calpaínas o de calpaínas que son dominantes en necrosis y en la apoptosis (Pike et al, 2004).

A diferencia de la apoptosis y la autofagia, que dependen de energía, en la necrosis ocurre una disminución de ATP. La disminución del ATP afecta a los sistemas de transporte activo membranal, llevando a la célula a una mayor permeabilización membranal lo que lleva a una distribución alterada de iones y a una disminución en el potencial de membrana mitocondrial. La disminución del ATP durante la muerte necrótica está acompañada por la sobreactivación de PARP-1 (Festjens et al. 2006). PARP-1 une oligómeros de ADP-ribosa a sí misma y a otras proteínas en respuesta al daño al ADN. El cofactor  $\text{NAD}^+$  es sustrato de esta enzima y la activación de PARP-1 induce una disminución en el ATP para la síntesis del sustrato (Proskuryakov et al, 2003).

### **1.2.3 Autofagia**

La autofagia es otro tipo de muerte programada conservada evolutivamente. Inicialmente, a este tipo de muerte se le relacionó con la capacidad que presentaban los organismos para sobrevivir ante la falta de nutrientes. Sin embargo, también existe autofagia en respuesta a hipoxia, alta densidad celular, altas temperaturas y estrés celular. En mamíferos se han descrito 3 tipos de autofagia: autofagia mediada por chaperonas, microautofagia y macroautofagia. Las dos últimas se encuentran conservadas desde las levaduras hasta los mamíferos, mientras que la autofagia mediada por chaperonas es exclusiva de mamíferos (Kelekar, A, 2005). La macrofagia se inicia con la formación de vacuolas autofágicas o autofagosoma formadas por la membrana celular. La fusión del autofagosoma con lisosomas provoca la degradación de los componentes intracelulares. Durante la microautofagia, la membrana lisosomal

se deforma para degradar los componentes del citoplasma. Finalmente, en la autofagia mediada por chaperonas, las proteínas citosólicas se unen a una chaperona formando un complejo que se une selectivamente a un receptor lisosomal que ayuda a su translocación al lumen lisosomal (Cuervo AM, 2004). De los tres procesos autofágicos, la macroautofagia (autofagia) es la vía catabólica de generación de energía y de degradación de macromoléculas y organelos en periodos de estrés o de privación de nutrientes.

Este tipo de muerte se caracteriza por la formación de vacuolas conocidas como autofagosomas, dilatación de mitocondrias y aumento en el tamaño del retículo endoplásmico y del aparato de Golgi. La proteína responsiva a nutrientes (mTor) se inhibe durante la carencia de nutrientes promoviendo autofagia (Yu L et al. 2010). También se han descrito vías de inducción de autofagia independientes de mTor que involucran la reducción de los niveles intracelulares de inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) (Sarkar S, 2009). Se ha observado muerte autofágica durante condiciones fisiológicas como en la regresión de membranas interdigitales en roedores. También se ha asociado a situaciones patológicas en modelos invitro de muerte neuronal (Maycotte et al, 2010), así como en algunas enfermedades neurodegenerativas, aunque se discute si las características autofágicas son el resultado de un proceso asociado a una respuesta de sobrevivencia o de muerte (Cuervo et al, 2004; Baehrecke et al., 2005; Yu, 2004; Shimizu et al., 2004). Se ha implicado a la autofagia en la activación de la apoptosis (Levine, 2008; Stocka, 2001). Durante el procesos autofágico las enzimas lisosomales proteolizan a Bid (miembro apoptótico de la familia BCL-2) y éste puede inducir la liberación de citocromo-c de la mitocondria (Stoka, et al 2001). Se ha propuesto que la fosforilación de Bcl-2 por JNK-1 regula la transición entre autofagia y apoptosis en un modelo de autofagia inducida por privación de nutrientes (Levine et al, 2008).

Existen algunos estudios sobre los mecanismos involucrados en las alteraciones morfológicas durante el proceso de muerte celular (Yan et al., 1994;

Chang et al., 1997; Brewton et al., 2001; Shelton et al., 2001). En este sentido, se ha explorado el papel que juegan las proteínas estructurales, como la actina y la tubulina que se sabe están involucradas en los cambios morfológicos durante la muerte celular. Uno de los objetivos de nuestro trabajo fue caracterizar las posibles alteraciones del citoesqueleto en un modelo de muerte neuronal. Por otro lado, evaluamos si estos cambios ocurren de manera similar en diferentes condiciones apoptóticas.

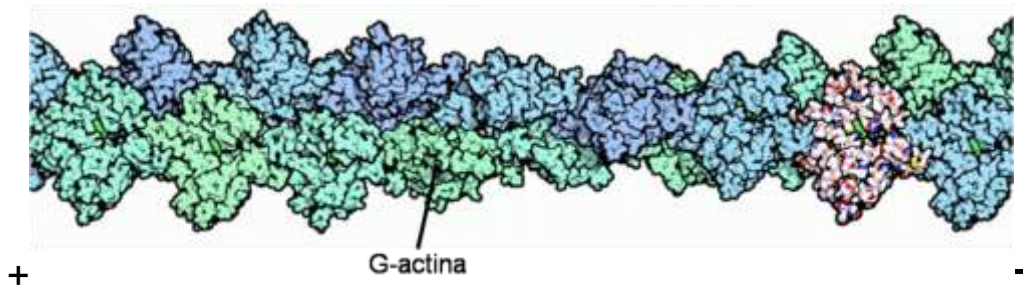
### **1.3 Citoesqueleto**

El citoesqueleto es un arreglo de proteínas filamentosas que se encuentran en el citosol de las células eucariontes. La interacción de estas proteínas le proporciona a la célula fuerza y rigidez, con lo que mantiene su forma. Otras funciones a las que se han asociado al citoesqueleto del SN son: la polaridad, el movimiento, la división y el transporte axoplásmico. El citoesqueleto se compone fundamentalmente de tres polímeros: microtúbulos, microfilamentos y neurofilamentos, cada uno con propiedades distintas y en conjunto constituyen una red muy dinámica (Howard, 2004; Karp, 2005).

#### **1.3.1 Microfilamentos**

Los microfilamentos miden 8 nm de diámetro y también se les ha llamado F-actina (actina fibrilar), la cual está conformada por actina globular ó G-actina. Los filamentos de actina están formados por monómeros idénticos que forman cadenas (Esquema 1). Cada subunidad de actina tiene una polaridad definida y las subunidades polimerizan en cabeza o cola; como consecuencia, los filamentos de actina también tienen una polaridad definida y todas las subunidades apuntan en la misma dirección. Junto con los microtúbulos, los microfilamentos forman un sistema de transporte cuando se asocian a proteínas motoras (miosinas, kinesinas y dineínas).

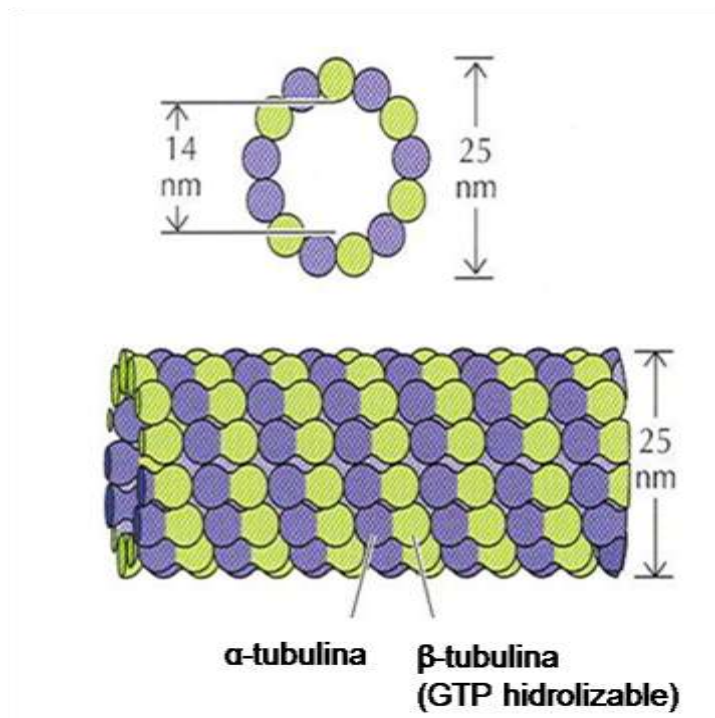
Los microfilamentos son especialmente dinámicos y su actividad funcional está mediada por proteínas asociadas (Hesketh et al. 1995).



**Esquema 1. Estructura de F-actina.** El polímero está constituido por subunidades monoméricas G-actina. El polímero presenta un extremo (+) y un extremo (-).

### 1.3.2 Microtúbulos

Los microtúbulos son polímeros que miden 24 nm de diámetro. Las paredes del cilindro que conforman al microtúbulo están formadas por 13 protofilamentos. Los microtúbulos están formados por dos tipos de proteínas  $\alpha$ -tubulina y  $\beta$ -tubulina, cada una con un peso molecular de 50 kDa. El cilindro está compuesto de un arreglo helicoidal de subunidades repetidas de tubulina conteniendo una molécula de  $\alpha$ -tubulina y otra de  $\beta$ -tubulina unidas entre sí, por uniones covalentes (Esquema 2).



**Esquema 2. Estructura de microtúbulos.** El polímero está constituido por 13 protofilamentos formando un hueco de 14 nm de diámetro. El microtúbulo (25 nm) de diámetro, está conformado de dos subunidades monoméricas,  $\alpha$  y  $\beta$ -tubulina. Ambos forman protofilamentos que se unen lateralmente a través de uniones débiles.

Las subunidades  $\alpha,\beta$ -tubulina tienen la capacidad de unir GTP, sin embargo, el GTP unido a la subunidad  $\alpha$  no se hidroliza, por lo que se le considera como parte integral de la  $\alpha$ -tubulina. Por el contrario, el nucleótido de la subunidad  $\beta$ -tubulina puede encontrarse tanto en la forma de GTP como de GDP. La hidrólisis de GTP situado en la subunidad  $\beta$  tiene un efecto importante en la dinámica de los microtúbulos. Los 13 protofilamentos que constituyen al cilindro formado por  $\alpha$ -tubulina y  $\beta$ -tubulina no son idénticos y corren paralelamente a lo largo del eje. Todos los protofilamentos de un microtúbulo poseen la misma polaridad: un extremo se conoce como extremo (+) y termina con una fila de subunidades  $\beta$ . El extremo contrario, es el extremo (-) y concluye con una fila de subunidades de  $\alpha$  tubulina. La polaridad estructural de los microtúbulos es un factor importante en el crecimiento y en las actividades mecánicas que lleva a cabo éste polímero (Darnell et al, 1990, Alberts et al., 2002; Karp., 2005).

Dentro de la dinámica de los microtúbulos existen proteínas asociadas conocidas como proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs). Estas proteínas suelen incrementar la estabilidad de los polímeros promoviendo su ensamblaje. Existen isoformas de tubulina independientes a las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ -tubulina, y son:  $\gamma$ -tubulina,  $\delta$ -tubulina y  $\epsilon$ -tubulinas. La  $\gamma$ -tubulina está localizada en la región organizadora de microtúbulos, la  $\delta$ -tubulina está localizada en el cuerpo basal de cilios y flagelos, y la  $\epsilon$ -tubulina está localizada en el material pericentriolar. En organismos eucariontes se presentan múltiples isoformas de tubulina y estas proteínas son susceptibles de sufrir modificaciones post-traduccionales que ocurren muy frecuentemente en los aminoácidos cercanos al extremo carboxilo terminal. Muchas de éstas modificaciones se han asociado a la activación de proteínas relacionadas con mecanismos de muerte celular (Giustiniani et al, 2009).

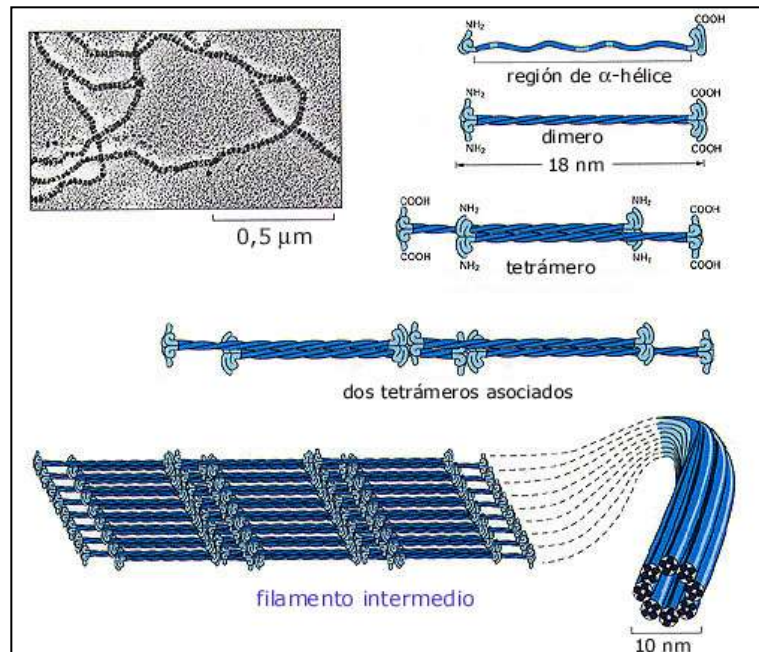


### 1.3.3. Neurofilamentos

Los neurofilamentos forman parte de los filamentos intermedios (FI) del SN y miden de 8 a 12 nm de diámetro (Darnell, 1990). Estas proteínas se conectan con otros tipos de filamentos del citoesqueleto por medio de puentes delgados y frágiles. Son un grupo químicamente heterogéneo que en los humanos se codifican por más de 60 genes diferentes. Los polipéptidos individuales que los conforman son moléculas alargadas, que presentan un dominio central en  $\alpha$  hélice que se enrosca con otro monómero igual formando una superhélice. Un par de dímeros antiparalelos entre sí se asocian formando un tetrámero inestable. Este tetrámero representa la subunidad soluble que sería análoga de  $\alpha, \beta$  tubulina, ó al monómero G actina. Los tetrámeros tienen afinidad por otros formándose una estructura más compleja en forma de cuerda lo que constituye al filamento. La familia de las proteínas individuales que constituyen a los FI es más complejo que el de los otros dos grupos del citoesqueleto. Las cadenas polipeptídicas de los FI contienen un dominio  $\alpha$  helicoidal que es central y presentan una secuencia homóloga de aminoácidos. El dominio central está flanqueado a ambos lados por dominios globulares de tamaño y secuencia variables. Dos de éstos polipéptidos interactúan de forma espontánea cuando los cilindros helicoidales  $\alpha$  se envuelven uno alrededor del otro (Karp, 2005) (Esquema 3).

Hasta ahora los filamentos intermedios sólo se han identificado en células animales. Son particularmente abundantes en el citoplasma de las células sometidas a estrés mecánico y parece que su función más importante consiste en proporcionar resistencia física a las células y a los tejidos. Los neurofilamentos se encuentran en grandes concentraciones en los tejidos neuronales, principalmente en los axones de neuronas. Estas fibras tridimensionales también se extienden hacia las dendritas y

axones. Tiene la capacidad de ensamblarse y desensamblarse por eventos de fosforilación y desfosforilación.



**Esquema 3.** Modelo de la organización de filamentos intermedios (FI). Se observa la organización de los filamentos intermedios a partir de estructuras monoméricas en  $\alpha$ -hélice, la formación de los dímeros y el tetrámero antiparalelo que conforma a la estructura “*rope-like*” (cuerda) característica de éstas proteínas.

#### 1.4 Citoesqueleto y Apoptosis

Como se comentó antes, la actina se distribuye en las neuronas por debajo de las membranas celulares, en somas y neuritas, generando soporte y contribuyendo a la regulación del transporte a través de la membrana plasmática. Por otro lado, la tubulina se mantiene polarizada hacia la membrana plasmática a partir del centro de nucleación (centrosoma) cerca del núcleo. Esto genera polaridad y compartimentalización de organelos intracelulares. La tubulina ( $\alpha$  y  $\beta$ ) se localiza en somas y neuritas formando polímeros que actúan como andamiajes de otros componentes celulares que participan en el crecimiento, retracción y transporte celular.

Diversas proteínas del citoesqueleto han sido reportadas por varios grupos como sustratos de proteasas durante la muerte celular (Brewtone et al., 2001; Shelton et al., 2001). En células granulares de cerebelo y de hipocampo se ha demostrado que durante la muerte apoptótica existen alteraciones en proteínas de citoesqueleto (Bonfoco et al., 1995; Canu et al., 1998; Castoldi et al., 2000) como resultado de varios estímulos que inducen este tipo de muerte celular.

Las alteraciones directas en estas proteínas por fármacos que alteran la dinámica del citoesqueleto promueven apoptosis en células neuronales, sugiriendo que el citoesqueleto es una señal primaria para el inicio de la apoptosis (Gorman et al, 1999; Kim et al, 2002; Kristensen et al, 2003; Jordá et al, 2005; Muller et al, 2006). Se sabe también que muchos de estos cambios morfológicos asociados a la apoptosis están relacionados con caspasas y calpaínas que actúan sobre varios sustratos (Thornberry, 1998; Bizat, 2003), y ambos incluyen proteínas del citoesqueleto (Mashima, 1999). Se ha sugerido que las calpaínas podrían regular la actividad de proteínas asociadas con apoptosis (Takano, 2005), lo que las relaciona con muerte apoptótica (Nath, 1996; McGinnis, 2003). En la necrosis las proteasas dependientes de calcio, las calpaínas, que pueden proteolizar una variedad de proteínas de citoesqueleto, enzimas y factores de transcripción (Nath, 1996).

Una de las proteínas del citoesqueleto relacionada directamente con muerte celular es la  $\alpha$ -espectrina. La  $\alpha$ -espectrina participa en el establecimiento de la forma celular, organización de organelos y transporte vesicular a través de su interacción con lípidos y proteínas integrales ó periféricas (Kevin, 2000). Se ha demostrado que esta proteína es sustrato de caspasas como de calpaínas (Ram, 2003; Nath et al, 1996; Rathna, 2000), por lo que se ha asociado tanto a muerte necrótica como apoptótica. La  $\alpha$ -espectrina como blanco proteolítico permite valorar el grado de participación de caspasas y calpaínas en diversos estímulos de muerte (Zhang et al, 2009). La caspasa-3 produce un fragmento de 120 kDa, mientras que la calpaína produce dos fragmentos, uno de 145 kDa y otro de 150 kDa (Harris et al,

2002; Vanags et al, 1996). Se ha propuesto al fragmento de 120 kDa como marcador de apoptosis (Nath et al, 1996). En neuronas cerebelares e hipocampales tratadas con estaurosporina (STS) se ha observado la fragmentación de  $\alpha$ -espectrina (Pike et al., 1998), así como también un aumento en su expresión en eventos de trauma cerebral en tálamo y estriado.

### **1.5 Neuronas granulares de cerebelo**

El cerebelo es una estructura en donde se ha estudiado el desarrollo neuronal (Burgoyne y Cambray, 1988) y posnatal. Durante el proceso de migración celular, las neuronas granulares se posicionan en la capa granular interna donde completan el proceso de diferenciación. La capa granular interna se forma durante la segunda semana de vida postnatal, tiempo en el cual las fibras musgosas excitadoras provenientes de núcleos pontinos y de la médula espinal establecen las entradas sinápticas a las células granulares. Se ha propuesto que estas aferencias sinápticas glutamatérgicas son determinantes para la diferenciación y la sobrevivencia de las células granulares durante el desarrollo del cerebelo (Ito, 1984; Jean-Claude et al, 2008).

Uno de los modelos de muerte más empleados para estudiar el desarrollo neuronal del cerebelo es el del cultivo primario de células granulares de cerebelo (NGC). Este modelo mimetiza lo que ocurre cuando las neuronas granulares no reciben las aferencias excitadoras durante el desarrollo *in vivo*. Experimentalmente, las NGC son cultivadas en un medio despolarizante (25 mM KCl; K25) por 7 días y luego son transferidas a un medio con concentraciones basales de potasio (5 mM KCl; K5), lo que induce su muerte después de 24 h. Esta muerte presenta características apoptóticas, como es la condensación y fragmentación del material nuclear, translocación de fosfatidilserina y activación de caspasas (Shultz et al., 1996; Morán et al., 1999; Gerhardht, 2001; Caballero y Morán, 2003). Por otro lado, se sabe que la estaurosporina (STS), un inhibidor general de cinasas, también induce muerte

apoptótica en las NGC por un mecanismo inicial diferente al propuesto para K5 mM (Caballero y Morán, 2003). En ese estudio se demostró que existe una activación de distintas caspasas dependiendo del estímulo apoptótico (Caballero y Morán, 2003).

## **II. Justificación**

A pesar de que existen evidencias que relacionan a los cambios morfológicos con la muerte apoptótica, no se conocen los mecanismos que conllevan al rearrreglo del citoesqueleto durante la progresión de la apoptosis. Por otro lado, aunque la muerte de las NGC inducida por K5 y STS es básicamente apoptótica, se desconoce la participación de las diferentes proteasas, incluyendo las calpaínas. Finalmente, se sabe que la muerte apoptótica en NGC activa diferentes caspasas dependiendo del tratamiento con bajo potasio (K5 mM) ó estaurosporina (STS). Con la idea de despejar algunas interrogantes sobre los mecanismos moleculares que involucran a los cambios del citoesqueleto durante la muerte de NGC, en este trabajo evaluamos los cambios morfológicos, así como la participación de dos proteínas estructurales (actina y tubulina) en la muerte apoptótica de NGC inducida por dos condiciones de muerte apoptótica, K5 y STS (0.5  $\mu$ M), en referencia a las características morfológicas descritas en la muerte necrótica inducida por ionomicina (1  $\mu$ M).

## **III. HIPÓTESIS**

La muerte apoptótica de las NGC por bajo potasio ó estaurosporina activa vías de caspasas diferentes, lo que reflejará cambios morfológicos distintos así como diferencias en las alteraciones del citoesqueleto.

## **IV. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la participación de actina y  $\beta$ -tubulina en los cambios morfológicos asociados a la muerte apoptótica inducida por K5 y STS en neuronas granulares de cerebelo.

#### **4.1 Objetivos Particulares**

- a) Evaluar los cambios morfológicos de las NGC durante la apoptosis inducida por K5 (K5 mM) y estaurosporina (STS).
- b) Evaluar la distribución de actina y de  $\beta$ -tubulina en las NGC durante la apoptosis inducida por K5 y STS.
- c) Evaluar la participación de caspasas y calpaínas en los cambios morfológicos de las NGC asociados a la muerte inducida por K5 y STS.
- d) Evaluar la participación de caspasas y calpaínas en la distribución de actina y de  $\beta$ -tubulina en las NGC durante la muerte inducida por K5 y STS.
- e) Evaluar la participación de caspasas y calpaínas en los niveles de actina y de  $\beta$ -tubulina en las NGC durante la apoptosis inducida por K5 y STS.

### **V. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **5.1 Cultivo celular**

Se obtuvieron cultivos primarios de células granulares de cerebelo mediante la técnica descrita por Morán y Patel (1989). Los animales fueron obtenidos del Bioterio del Instituto de Fisiología Celular. Se disociaron células a partir de cerebelos de ratas Wistar de 8 días de nacidas y se sembraron en un medio Basal Eagle suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (GIBCO), 2 mM de glutamina, 50 U/ml de penicilina y 50  $\mu$ g/ml de estreptomina. Las NGC se cultivaron en condiciones despolarizantes (KCl 25 mM). Las células se sembraron en cajas de Petri tratadas previamente con polilisina (5 $\mu$ g/ml). Las células se sembraron a una densidad de  $1.5 \times 10^6$  células/ml. Después de 18 h se añadió citocina arabinosa (10  $\mu$ M) para evitar la proliferación de células no neurales (Balázs et al, 1988). Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> (4.5%) y aire saturado con

vapor de agua (95%) (Morán y Patel, 1989). Después de 7-8 DIV se trataron con los diversos fármacos para inducir muerte (STS 0.5  $\mu$ M, ionomicina 1  $\mu$ M o cambio a un medio idéntico con KCl 5mM), tanto en ausencia o presencia de inhibidores de caspasas (ZVAD; benzyloxycarbonyl-Val-Asp-fluoromethylketone) ó de calpaínas (IC1; inhibidor de calpaína 1). Las células se incubaron por distintos tiempos y se prepararon las células para su posterior análisis.

## **5.2 Evaluación Morfológica**

Los cultivos de NGC expuestas a K5 mM, STS (0.5  $\mu$ M), Ionomicina (1 $\mu$ M) y en presencia de los inhibidores generales de caspasa, ZVAD (10  $\mu$ M) y de calpaína, IC1 (50  $\mu$ M), se examinaron por microscopia de contraste de fases, se fotografiaron y se analizaron los cambios morfológicos. Se evaluó la morfología en un tiempo en donde se comenzaron a observar las diferencias morfológicas (12 h) y cuando éstos cambios eran evidentes (24 h), con las diferentes condiciones experimentales. Para evaluar la morfología se realizó un análisis cualitativo del tamaño, grosor y distribución de neuritas y tamaño de los somas.

## **5.3 Inmunofluorescencia**

Las NGC se cultivaron en cajas de cultivo cubiertas previamente con poli-L-lisina (25  $\mu$ g/ml) por 7 DIV en K25 mM. Después del tratamiento, las células se fijaron con 4% de paraformaldehído por 20 minutos, se lavaron y permeabilizaron con Tritón (0.01%). Después de lavar con TBS, se procedió a bloquear sitios inespecíficos utilizando suero fetal bovino 1% por 30 minutos, se lavaron y se incubaron con los diferentes anticuerpos. Las NGC se incubaron con anticuerpos monoclonal anti-actina (1:100, Chemicon Int, cat MAB1501), anti- $\alpha$  tubulina (1:200, Sigma Aldrich, cat T6199) y anti- $\beta$  tubulina (1:200, Sigma Aldrich Int, cat T4026) por 1h a temperatura ambiente. Las células se lavaron y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a fluoresceína (1:250, Zymed, cat 81-6511) por 1 h

a temperatura ambiente. Las NGC se lavaron y se montaron utilizando un medio de montaje acoplado a DAPI (Vectashield, Vector). Las células se observaron utilizando un microscopio de fluorescencia (NIKON DIAPHOT-TMD; 40X) y se obtuvieron las imágenes digitalizadas para su evaluación.

#### **5.4 Western blot**

Las células se lavaron con PBS y se homogenizaron usando buffer de lisis (Tris 25 mM, NaCl 50 mM, Igepal 2%, SDS 0.2% e inhibidores de proteasas (Roche) a pH 7.4). La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (1976). Se tomaron 30  $\mu$ g de los homogenados, se separaron en un gel de acrilamida al 10% y se transfirieron a una membrana de PVDF. Se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo monoclonal anti- $\beta$ -tubulina (1:1000, Sigma Aldrich cat. T4026), anti-actina (1:1000, Chemicon Int, cat. MAB1501), anti- $\alpha$  tubulina (1:1000, Sigma Aldrich cat. T6199) y anti-GAPDH (1:2500, Chemicon Int cat. MAB374). Después de lavarse, las membranas se incubaron por 1 hora con un anticuerpo monoclonal acoplado a fosfatasa alcalina a temperatura ambiente. Las membranas se revelaron con un sistema de quimioluminiscencia (Bio-Rad, CDP-Star) y fueron expuestas a films Kodak Biomax. El análisis densitométrico se realizó con el programa image-J del NIH versión 1.38x.

#### **5.5 Análisis Estadístico**

Los datos se expresaron como la media  $\pm$  error estándar (ES) de 3-5 experimentos independientes. Se utilizó una ANOVA de una vía seguido de una prueba post-hoc de Tukey para comparación de las medias ( $P \leq 0.05$ ), utilizando el Software Prism Graph Pad versión 5.0.



## **VI. RESULTADOS**

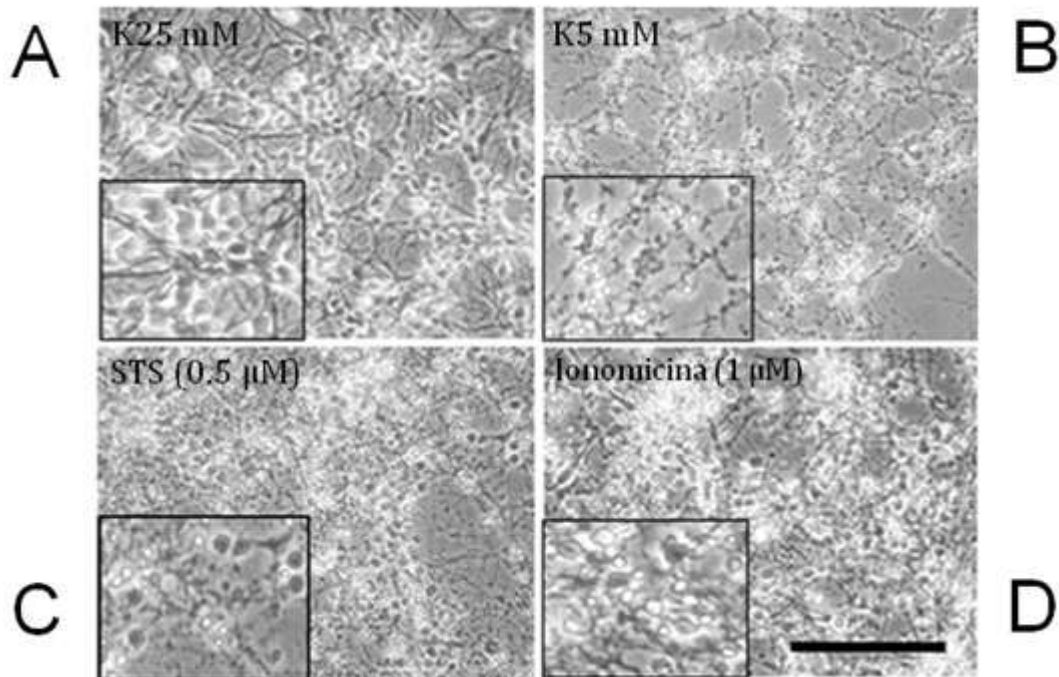
### **6.1 Cambios Morfológicos en NGC durante la muerte apoptótica inducida por K5 y STS.**

Las NGC se trataron con K5 ( KCl, 5 mM), STS (0.5  $\mu$ M) o ionomicina (1 $\mu$ M) por varios períodos de tiempo y fueron analizadas utilizando microscopia de contraste de fases. Las NGC mostraron cambios morfológicos diferentes, dependiendo del inductor de muerte empleado. Estos cambios fueron evidentes después de 8-12 h de tratamiento en todas las condiciones experimentales empleadas, y se permanecieron evidentes hasta las 24 h después de los diferentes tratamientos (Fig.1). Las NGC expuestas a K5 mostraron un encogimiento del soma y adelgazamiento de neuritas evidentes a las 12h. Después de 24 h, las NGC mostraron una pérdida de somas y la permanencia de neuritas con la presencia de varicosidades (Fig.1B).

Las NGC tratadas con STS mostraron cambios similares a los que se observaron para K5 entre 8-12 h, sin embargo a las 24 h fue más evidente la pérdida de neuritas con la permanencia de un número apreciable de somas (Fig.1C). Cuando se trataron a las NGC con ionomicina (1  $\mu$ M) se observó un adelgazamiento y degradación de neuritas, encogimiento de somas, vacuolización, pérdida de somas y desprendimiento de las células con una formación de detritos en el cultivo (Fig.1D). Las observaciones realizadas con microscopía de contraste de fases sugieren cambios morfológicos distintos dependiendo de la condición experimental.

### **6.2 Modificaciones de actina y $\beta$ -tubulina en NGC durante la muerte apoptótica inducida por K5 y STS.**

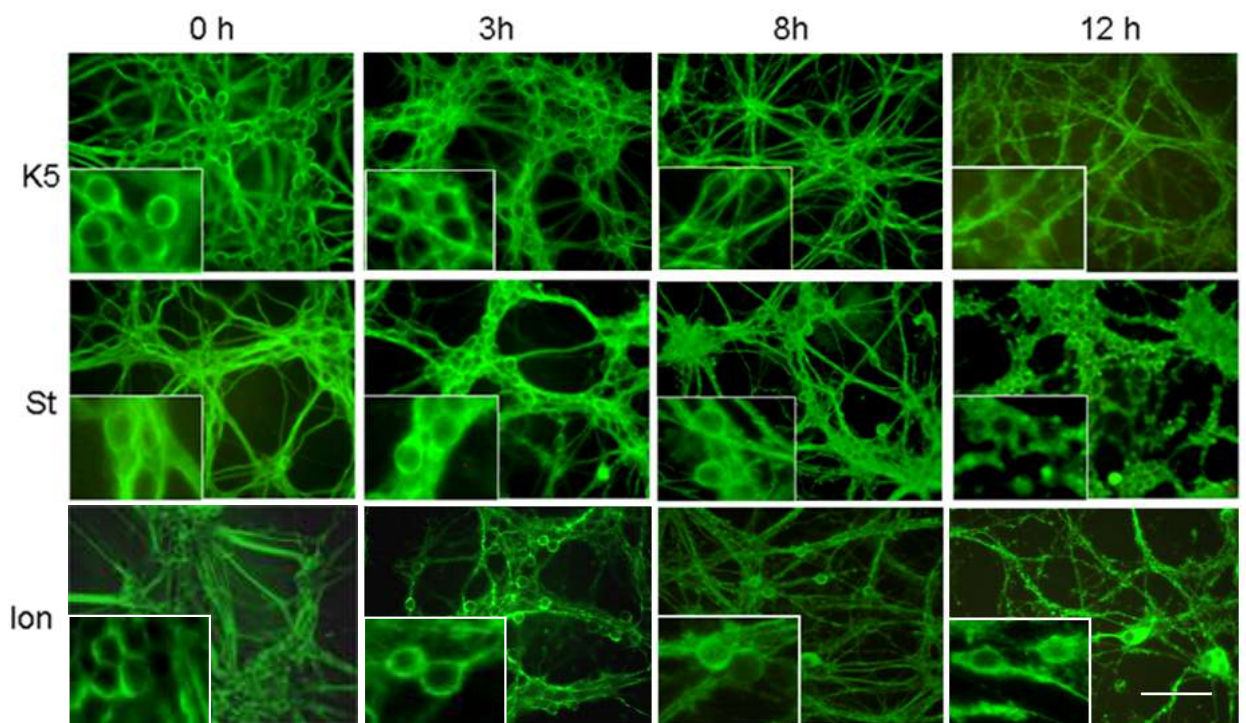
Para evaluar la relación entre el citoesqueleto y los cambios morfológicos descritos anteriormente, estudiamos la organización de actina y  $\beta$ -tubulina bajo los



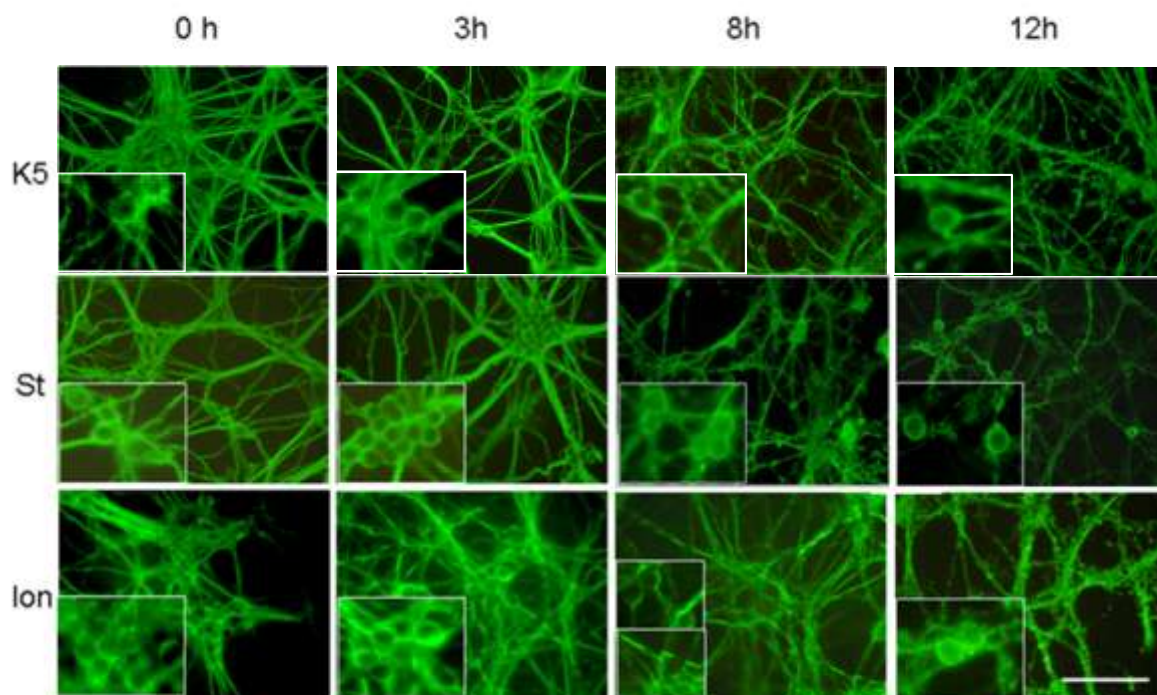
**Figura. 1 Efecto de K5, STS y ionomicina en la morfología de las NGC.** A) Las NGC se crecieron en (A) K25 mM por 7DIV y se transfirieron a un medio con (B) K5 mM (KCl 5 mM), o se trataron con (C) estaurosporina (STS 0.5  $\mu$ M) o (D) ionomicina (1  $\mu$ M). La morfología se evaluó por microscopia de contraste de fases después de 24h de tratamiento. La barra representa 40  $\mu$ m. Recuadro de ampliación izq (3x).

diferentes tratamientos experimentales. Utilizando la técnica de inmunofluorescencia, encontramos que ambas proteínas se localizan tanto en somas como en neuritas en las NGC control ( $t=0$ ; Fig.2 y 3). La Figura 2 muestra que las NGC tratadas con K5 induce una disminución en la expresión de  $\beta$ -tubulina en los somas a las 8 h, sin modificar la expresión de tubulina en las neuritas. Por el contrario, en las NGC tratadas con STS (0.5  $\mu$ M) se observó una reducción en la expresión de  $\beta$ -tubulina en neuritas a las 8h, sin cambios en los somas (Fig.2). Bajo esta misma condición se observó que la tubulina se localiza en los somas entre 8-12 h después del tratamiento (Fig.2). Las NGC tratadas con ionomicina (1  $\mu$ M) mostraron alteraciones en la  $\beta$ -tubulina en los somas y neuritas, 8 h después del tratamiento (Fig.2).

Por otro lado, el tratamiento de las NGC con K5 redujo la expresión de actina en los somas después de 8-12 h del tratamiento, sin alterar su expresión en neuritas (Fig.3). La STS (0.5  $\mu$ M) indujo una ligera disminución en la expresión de actina en neuritas después de 12 h (Fig.3), sin alterar la expresión en somas a este mismo tiempo (Fig.3). El tratamiento con ionomicina indujo una degradación generalizada de actina, particularmente en las neuritas después de 8 h de tratamiento.



**Figura 2. Efecto del K5, STS y ionomicina en la inmunolocalización de  $\alpha$ -tubulina en las NGC.** Las NGC se crecieron en K25 mM por 7 DIV se transfirieron a un medio en presencia de K5 mM (KCl 5 mM) o se trataron con estaurosporina (STS 0.5  $\mu$ M) o ionomicina (1  $\mu$ M) en diferentes periodos de tiempo. La figura muestra imágenes de microscopía de fluorescencia utilizando anti- $\alpha$  tubulina (1:200). Se utilizó un objetivo de 40X de inmersión en aceite y filtro B-2A (fluoresceína). Las barra representa 20  $\mu$ m. Recuadro de ampliación izq (3X).



**Figura 3. Efecto del K5, STS y ionomicina en la inmunolocalización de actina en las NGC.**

Las NGC se crecieron en K25 mM por 7 DIV y se transfirieron a un medio en presencia de K5 mM (KCl 5 mM) o se trataron con estaurosporina (STS 0.5  $\mu$ M) o ionomicina (1  $\mu$ M) en diferentes periodos de tiempo. La figura muestra imágenes de microscopía de fluorescencia utilizando anti-actina (1:100). Se utilizó un objetivo de 40X de inmersión en aceite y filtro B-2A (fluoresceína). Las barra representa 20  $\mu$ m. Recuadro de ampliación izq (3X)

### **6.3 Participación de caspasas y calpaínas en los cambios morfológicos de las NGC inducidos por K5 y STS.**

Para estudiar la participación de caspasas en los cambios morfológicos neuronales inducidos por K5 mM y STS (0.5  $\mu$ M), utilizamos un inhibidor general de caspasas (ZVAD) y un inhibidor general de calpaínas (calpaína 1). Bajo estas condiciones, el ZVAD (10  $\mu$ M) inhibió parcialmente los cambios morfológicos inducidos por K5 (Fig.4), mientras que el inhibidor de calpaína 1 no tuvo ningún efecto en la morfología de las NGC tratadas con K5 a las 12 h (Fig.4). El ZVAD también indujo una

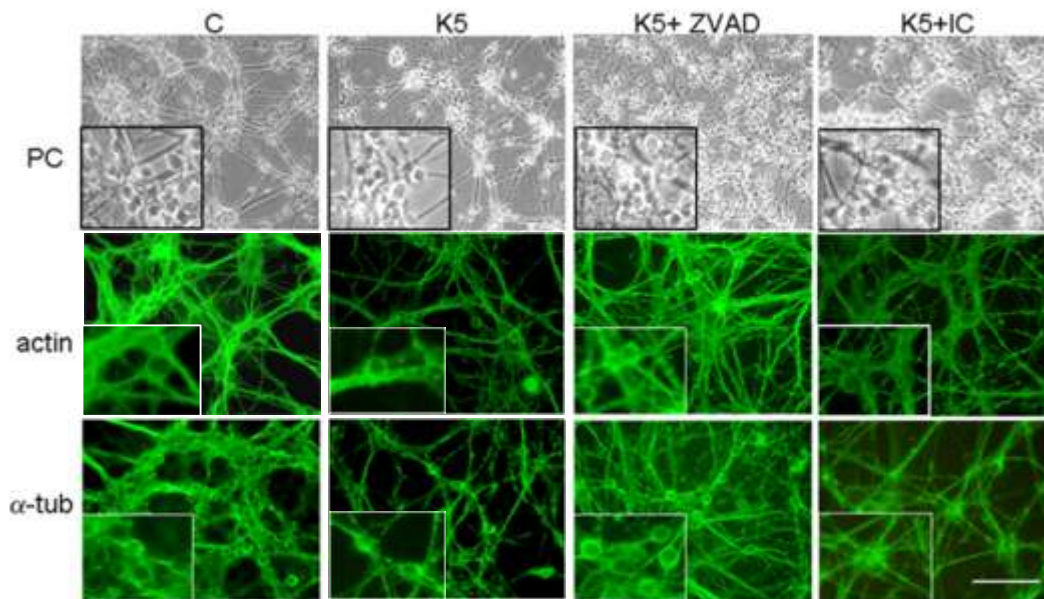
protección en los cambios morfológicos producidos por la STS (0.5  $\mu$ M), generando una reducción muy importante en el adelgazamiento de neuritas característico del tratamiento con STS, así como de la pérdida de somas (Fig.5). El inhibidor de calpaína 1 no produjo cambios de la morfología de las NGC por STS (Fig.5). Finalmente, ninguno de los inhibidores promovió cambios en la morfología de las NGC tratadas con ionomicina (Fig.6).

#### **6.4 Participación de caspasas y calpaínas en las alteraciones de actina y $\beta$ -tubulina de las NGC inducido por K5 y STS.**

Para evaluar la participación de caspasas o calpaínas en la organización de actina y  $\beta$ -tubulina en NGC tratadas con K5 mM y STS (0.5  $\mu$ M), utilizamos inhibidores generales de ambas proteasas y evaluamos sus efectos en la localización de actina y  $\beta$ -tubulina. Utilizando técnicas de inmunofluorescencia, encontramos que ninguno de los dos inhibidores tuvo efecto en la distribución de actina o  $\beta$ -tubulina en las NGC en condiciones control. Sin embargo, el ZVAD (10  $\mu$ M) indujo cambios en la localización de actina en somas y neuritas inducida por K5. Este inhibidor indujo una localización de la actina y  $\beta$ -tubulina principalmente en los somas, por debajo de la membrana plasmática similar a lo observado en las NGC control (Fig.4). Por su parte, el IC1 no modificó a ninguna de las dos proteínas en NGC tratadas con K5 (Fig.4).

La reducción en la inmunofluorescencia de actina y  $\alpha$ -tubulina que se observó con STS a las 12 horas se inhibió cuando se utilizó un inhibidor de caspasas (ZVAD). El inhibidor de calpaínas IC1, no modificó la distribución de actina ni de  $\beta$ -tubulina en NGC tratadas con STS (Fig.5). No encontramos ningún efecto del ZVAD o IC1 en la localización tanto de actina como de  $\beta$ -tubulina en las NGC tratadas con ionomicina (1  $\mu$ M) (Fig.6).

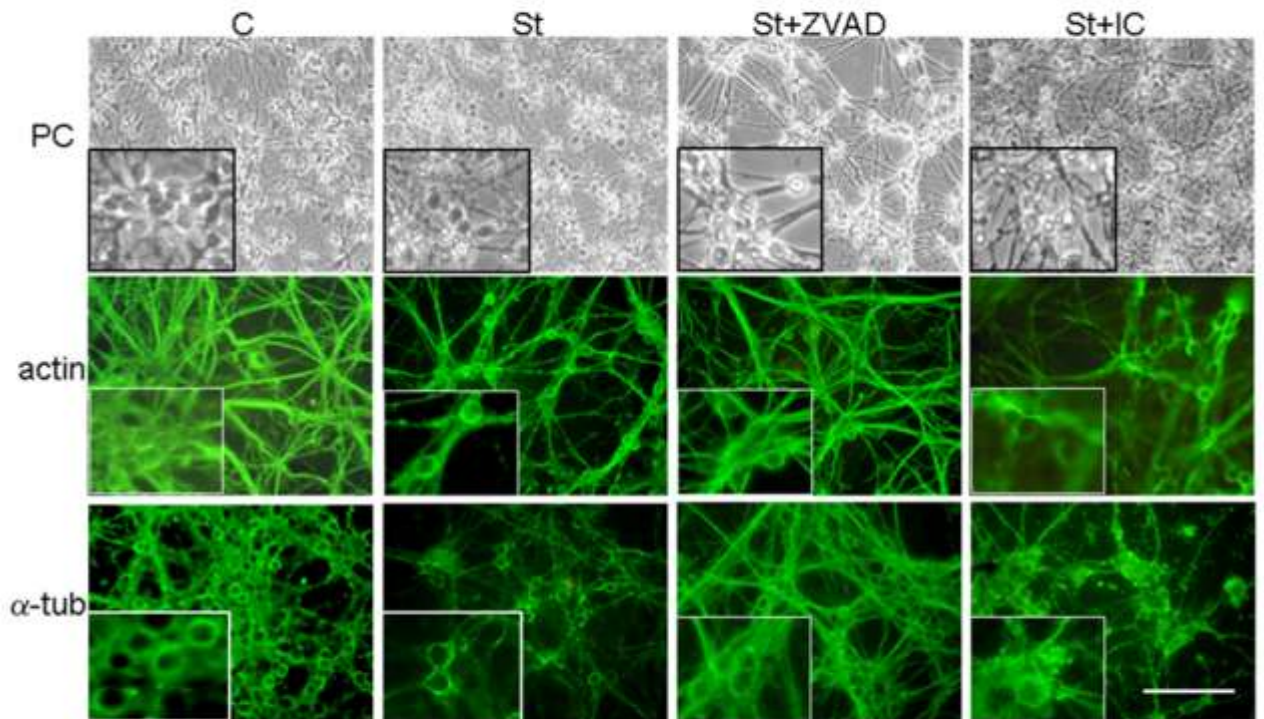




**Figura 4. Efecto de los inhibidores de caspasas y calpaínas en la morfología y distribución de  $\alpha$ -tubulina y actina durante la muerte de NGC inducida por K5.** Las NGC se cultivaron en K25 mM por 7 DIV y se transfirieron a un medio K5 en presencia y ausencia de ZVAD (10  $\mu$ M) o de IC1 (50  $\mu$ M) durante 12 h. La morfología de las NGC se evaluó por microscopía de contraste de fases (CF). Se muestran imágenes de microscopía de fluorescencia utilizando anti-actina (1:100) y anti- $\alpha$ -tubulina (1:200). Se utilizó un objetivo de 40X de inmersión en aceite y filtro B-2A (fluoresceína). La barra representa 20  $\mu$ m. Recuadro de ampliación izq (3X).

### 6.5 Niveles de actina y $\beta$ -tubulina en las NGC tratadas con K5, STS y ionomicina

Para evaluar los niveles de expresión de actina y  $\beta$ -tubulina durante la apoptosis inducida por K5, STS (0.5  $\mu$ M) y ionomicina (1  $\mu$ M), en presencia y ausencia de inhibidores de proteasas, se utilizó la técnica de Western blot en homogenados de NGC. El ZVAD e IC1, por sí solos, no modificaron los niveles de expresión de actina ni de  $\beta$ -tubulina en lisados de NGC control (K25 mM). En la Fig.7 A,C se muestra que en los lisados de NGC tratadas con K5 no hubo cambios en los niveles de expresión de actina o  $\beta$ -tubulina entre las 8-12 h después del tratamiento. El análisis



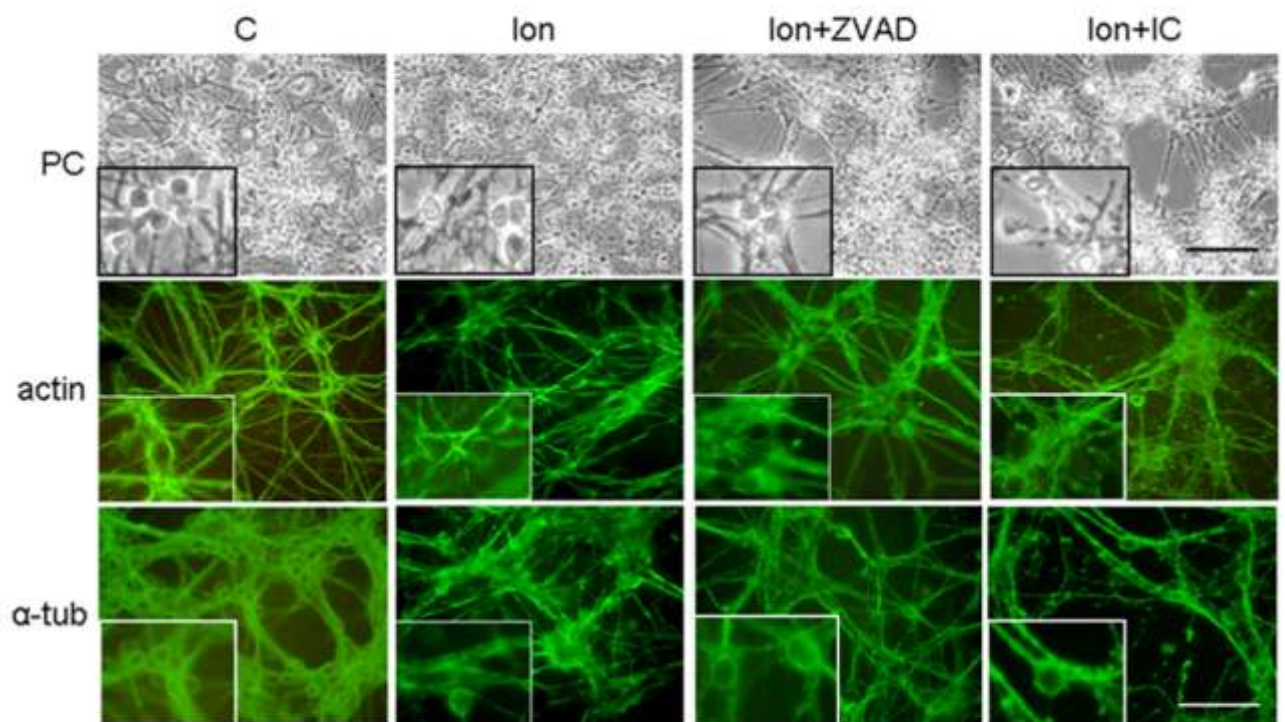
**Figura 5. Efecto de los inhibidores de caspasas y calpaínas en la morfología y distribución de  $\alpha$ -tubulina y actina durante la muerte de NGC inducida por STS.** Las NGC se crecieron en K25 mM por 7 DIV y se trataron con STS (0.5  $\mu$ M) en presencia y ausencia de inhibidores generales de caspasa (ZVAD; 10  $\mu$ M) y calpaínas (IC1; 50  $\mu$ M) durante 12 h. La morfología de las NGC se evaluó por microscopía de contraste de fases (CF). Se muestran imágenes de microscopía de fluorescencia utilizando anti-actina (1:100) y anti- $\alpha$ -tubulina (1.200). Se utilizó un objetivo de 40X de inmersión en aceite y filtro B-2A (fluoresceína). La barra representa 20  $\mu$ m. Recuadro de ampliación izq (3X).

densitométrico mostró que ninguno de los dos inhibidores de proteasas modifican la expresión de estas proteínas (Fig.7 B y D).

En relación al tratamiento con STS, encontramos diferencias significativas en la expresión tanto de actina como de  $\beta$ -tubulina 24h después del tratamiento (Fig.8). Observamos un aumento del 30% en la expresión de  $\beta$ -tubulina y actina en NGC tratadas con STS por 24h (Fig.8 A,C). El análisis densitométrico mostró que

ninguno de los inhibidores de proteasas modificaron los niveles de expresión de  $\beta$ -tubulina en lisados de NGC tratadas con STS (Fig.8 B). Observamos que sólo el ZVAD promovió una disminución en los niveles de expresión de actina en NGC tratadas con STS, después de 24 h del tratamiento (Fig.8 C).

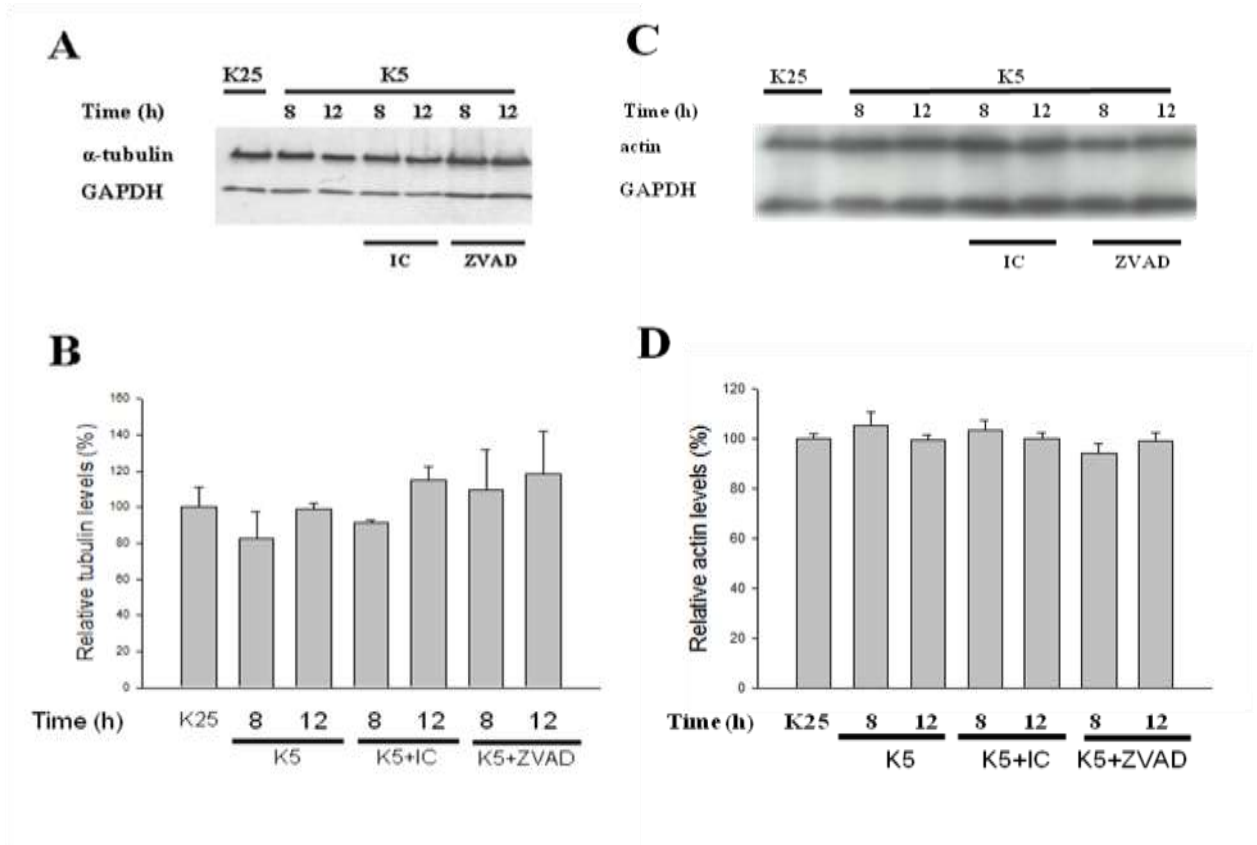
El tratamiento con ionomicina no promovió cambios en los niveles de expresión de tubulina en lisados de NGC (Fig.9 A), que tampoco se modificó



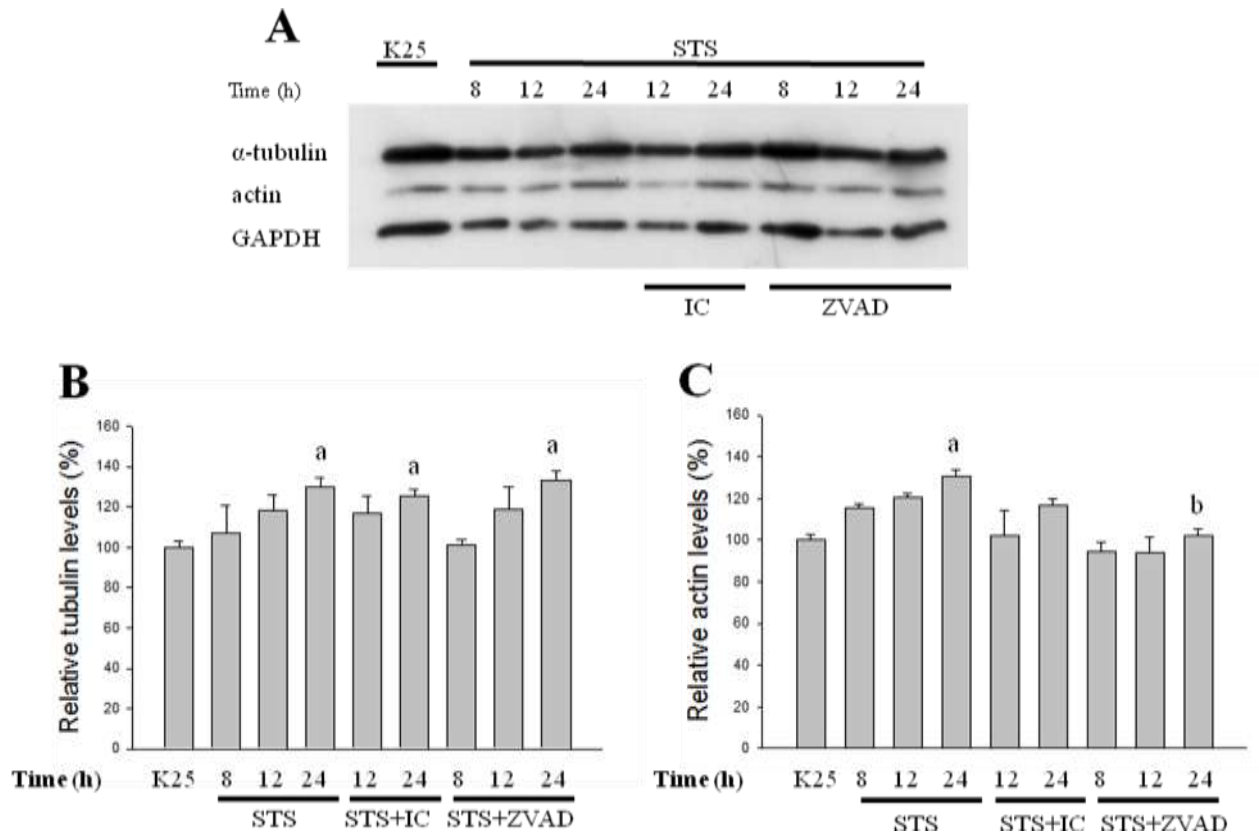
**Figura 6. Efecto de los inhibidores de caspasas y calpaínas en la morfología y distribución de  $\alpha$ -tubulina y actina durante la muerte de NGC inducida por ionomicina.** Las NGC se crecieron en K25 mM por 7 DIV se trataron con ionomicina (1  $\mu$ M) en presencia y ausencia de inhibidores generales de caspasa (ZVAD; 10  $\mu$ M) y calpaínas (IC1 ;50  $\mu$ M) durante 12 h. La morfología de las NGC se evaluó por microscopía de contraste de fases (CF). Se muestran imágenes de microscopía de fluorescencia utilizando anti-actina (1:100) y anti- $\alpha$ -tubulina (1.200). Se utilizó un objetivo de 40X de inmersión en aceite y filtro B-2A (fluoresceína). Las barra representa 20  $\mu$ m. Recuadro de ampliación izq (3X).



en presencia de ZVAD o IC1 (Fig.9 B). Por otro lado, el tratamiento con ionomicina indujo una disminución del 20% en la expresión de actina 12h después del tratamiento (Fig.9 C), sin embargo ambos inhibidores revierten los efectos que se observan con ionomicina en los niveles de actina (Fig.9 C).



**Figura 7 Efecto de inhibidores de caspasas y calpaínas en los niveles de  $\alpha$ -tubulin y actina en NGC tratadas con K5.** Las NGC se crecieron en K25 mM por 7 DIV y se transfirieron a un medio con K5 (KCl 5mM) en presencia o ausencia de inhibidores generales de caspasas (ZVAD; 10  $\mu$ M) o calpaínas (IC1 ;50  $\mu$ M) durante varios periodos de tiempo. En A, las bandas corresponden a  $\alpha$ -tubulina y en C las bandas corresponden a la actina. B y D, son los análisis densitométricos de la expresión de  $\alpha$ -tubulina (B) y actina (D). Los resultados se expresan como porciento del control normalizado contra GAPDH. Los datos son representativos de 6 - 7 experimentos independientes. En ningún caso se observaron diferencias significativas (B y D).

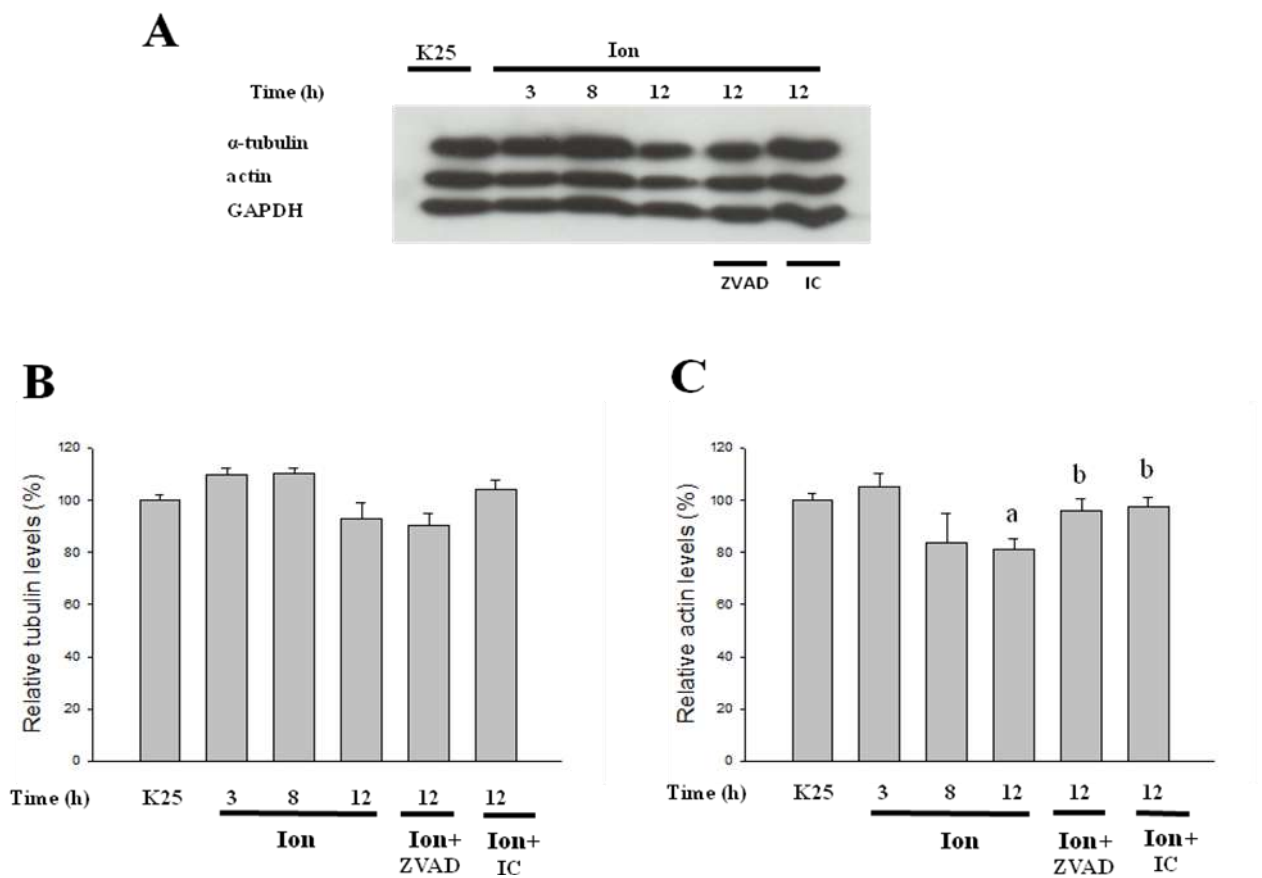


**Figura 8. Efecto de inhibidores de caspasas y calpaínas en los niveles de  $\alpha$ -tubulin y actina en NGC tratadas con STS ( $0.5 \mu\text{M}$ ).** Las NGC se crecieron en K25 por 7 DIV y se trataron con STS ( $0.5 \mu\text{M}$ ) en presencia y ausencia de inhibidores generales de caspasas (ZVAD;  $10 \mu\text{M}$ ) o calpaínas (IC1;  $50 \mu\text{M}$ ) durante varios periodos de tiempo. A) inmunoblot para  $\alpha$ -tubulina y actina. B) y C), análisis densitométricos de la expresión de  $\alpha$ -tubulina (B) y actina (C). Los resultados se expresan como porcentaje del control normalizado contra GAPDH. Los datos son promedios  $\pm$  error estándar de 6 experimentos independientes. <sup>a</sup>P<0.05, diferente vs. K25; <sup>b</sup>P<0.05 diferente vs. STS (24h). Se utilizó ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey.

## 6.6 Fragmentación de $\alpha$ -espectrina inducida por K5 y STS.

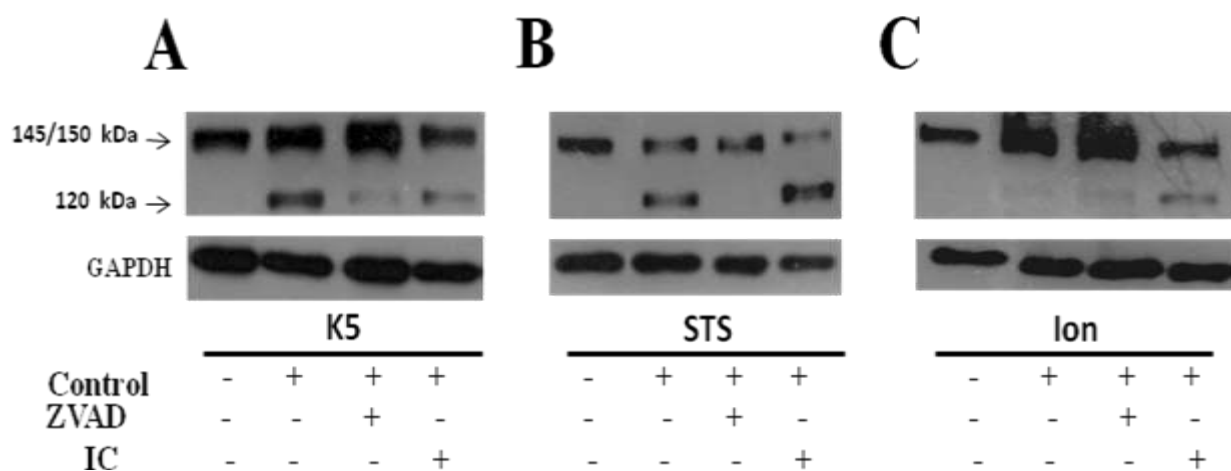
Se sabe que la fragmentación de  $\alpha$ -espectrina (280 kDa) es una medida directa de activación tanto de caspasas como de calpaínas (Harris et al., 1988; Martinet et al., 1995; Nath et al., 1996; Vanags et al., 1996). Evaluamos la fragmentación de  $\alpha$ -espectrina para conocer la participación de caspasas y calpaínas en las NGC tratadas con K5 mM, STS ( $0.5 \mu\text{M}$ ) y ionomicina ( $1 \mu\text{M}$ ).

La Fig. 10 muestra que el tratamiento con K5 promovió parcialmente la activación de caspasas (fragmento de 120 kDa), misma que se redujo con ZVAD. Esta condición promueve la aparición de los fragmentos 145 kDa y 150 kDa que se redujeron en presencia de IC1 (Fig. 10A). En las NGC tratadas con STS sólo se observó un incremento en la banda de 120 kDa, que se disminuyó marcadamente con ZVAD (Fig. 10B). El tratamiento con ionomicina promueve la aparición de los fragmentos de  $\alpha$ -tubulina (145 kDa y 150 kDa) que fueron marcadamente reducidos por el inhibidor de calpaínas (Fig. 10 C).



**Figura 9. Efecto de inhibidores de caspasas y calpaínas en los niveles de  $\alpha$ -tubulina y actina en NGC tratadas con ionomicina (1  $\mu$ M).** Las NGC se crecieron en K25 mM por 7 DIV y se trataron con ionomicina (1  $\mu$ M) en presencia y ausencia de inhibidores de caspasas (ZVAD; 10  $\mu$ M) o calpaínas (IC1; 50  $\mu$ M) por 3-12h. A) inmunoblot para  $\alpha$ -tubulina y actina. B) análisis densitométricos de la expresión de  $\alpha$ -tubulina o(C) actina. Los resultados se expresan como porcentaje del control normalizado contra GAPDH. Los datos son promedios  $\pm$  error estándar de 6 experimentos independientes. <sup>a</sup>P<0.05

diferente vs. K25, <sup>b</sup>P<0.05 diferente vs. Ion (12h). Se utilizó ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey.



**Figura 10. Activación de caspasas y calpaínas en NGC durante la muerte inducida por K5, STS y ionomicina.** Las NGC se cultivaron en un medio K25 (25 mM KCl) por 7 DIV y se trataron con estaurosporina (STS 0.5  $\mu$ M) o ionomicina (1  $\mu$ M) o se transfirieron a un medio K5 (5 mM KCl) en ausencia o presencia de inhibidores general de caspasas (ZVAD; 10  $\mu$ M) o de calpaínas (IC1; 50  $\mu$ M) por 12 h. A), corresponde a lisados de NGC tratados con K5. B) corresponde a lisados de NGC tratados con STS (0.5  $\mu$ M). C) corresponde a lisados de NGC tratados con ionomicina (1  $\mu$ M).

## VII. DISCUSIÓN

La muerte apoptótica está relacionada con un patrón morfológico muy característico. Algunas de las características morfológicas que se observan durante la apoptosis neuronal incluyen encogimiento celular, vacuolización del citoplasma, retracción de procesos, adelgazamiento de neuritas y condensación nuclear (Kerr and Harmon, 1991). La apoptosis se distingue de otros tipos de muerte por algunas características bioquímicas que incluyen la activación de proteasas de cisteína, conocidas como caspasas (Rudel, 1999).

El cultivo de NGC representa un modelo muy utilizado para estudiar muerte apoptótica utilizando diversos inductores de muerte. En este trabajo, se evaluó la muerte apoptótica de las NGC inducida por STS o transfiriendo a las células de un medio despolarizante (25 mM KCl) a un medio con concentraciones fisiológicas de potasio extracelular (5 mM KCl) (Armstrong et al., 1997; Ni et al., 1997; D'Mello et al., 1998; Marks et al., 1998; Morán et al., 1999; Caballero Benitez and Morán, 2003; Ramiro-Cortés y Morán, 2009; Maycotte et al., 2010). Bajo estas condiciones se sabe que las NGC muestran todas las características descritas para la muerte apoptótica, incluyendo la activación de caspasas.

Nuestro grupo demostró anteriormente que, aunque el tratamiento con K5 y STS induce muerte apoptótica de NGC, los mecanismos involucrados parecen implicar distintas caspasas (Caballero-Benitez and Morán, 2003). En línea con estos resultados, en el presente trabajo demostramos que las NGC tratadas con K5 y STS promueven cambios morfológicos diferentes. Las alteraciones inducidas tanto por K5 como por STS se observan después de 12-24h del tratamiento. Sin embargo, en las NGC tratadas con K5 las neuritas parecen persistir por mayor tiempo, mientras que los somas sufren un proceso degenerativo alrededor de las 12 h. En contraste, a este mismo tiempo las NGC tratadas con STS presentan un efecto opuesto: los somas parecen persistir más que las neuritas. Por otro lado, el tratamiento con ionomicina parece inducir un daño generalizado, caracterizado por un encogimiento del soma, vacuolización y fragmentación de neuritas.

Existe un gran número de trabajos que sugieren que el citoesqueleto participa en los cambios morfológicos que ocurren durante la muerte celular en varios modelos experimentales; sin embargo, existe poca información en relación a los cambios específicos que ocurren en las proteínas del citoesqueleto durante el proceso de muerte apoptótica y de manera particular en la muerte apoptótica de NGC inducida por K5 y STS (Brewton, 2001; Shelton, 2001; Mashima, 1999; Vanags, 1996). Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que los cambios morfológicos

inducidos por K5 y STS parecen estar relacionados con la reorganización del citoesqueleto de actina y tubulina.

En términos generales, tanto la actina como la  $\alpha$  y  $\beta$ -tubulina sufren cambios similares en presencia de K5 y STS, pero estos cambios ocurren de manera diferente en somas y en neuritas, lo cual determina los cambios morfológicos que observamos. Es posible por lo tanto, que ambas condiciones apoptóticas estén relacionadas con una dinámica diferencial de actina y  $\alpha,\beta$ -tubulina. En otros modelos, algunos estudios han mostrado que durante la apoptosis existe una reorganización y acumulación de algunas proteínas del citoesqueleto, incluidos la actina y a la tubulina (Huot, 1998; Endresen, 1995). Más aún, esto podría estar modulado por la capacidad de los microtúbulos de polimerizarse y despolimerizarse en etapas tempranas de la apoptosis (Blagosklonny, 1997).

Se ha sugerido que el compromiso de muerte celular, ya sea por apoptosis o necrosis, está relacionado con la naturaleza y la intensidad de estímulo (Bonfoco et al., 1995), lo que lleva a la participación de diferentes tipos de proteasas que se activan durante el proceso de muerte (Vanags et al., 1996; Hengartner et al., 2000). Los cambios morfológicos que se observan en las NGC tratadas con K5 y STS coinciden con una participación diferencial de proteasas, particularmente de caspasas. El inhibidor general de caspasas, ZVAD, previno parcialmente los cambios morfológicos inducidos por K5 y STS, pero no por ionomicina. En este sentido, en nuestro trabajo el inhibidor general de calpaina I no previene de manera directa las alteraciones en las proteínas del citoesqueleto en K5 y STS. Sin embargo, no descartamos la posibilidad de que exista una regulación entre ambas proteasas. En este sentido, se sabe que las calpaínas y caspasas se activan durante la muerte apoptótica en diversos modelos de muerte que resultan en el procesamiento de diversos sustratos importantes durante el proceso apoptótico (Zhang et al, 2009).

Para conocer la participación de caspasas y calpaínas en la muerte apoptótica y necrótica evaluamos la fragmentación de la  $\alpha$ -espectrina nativa (280 kDa) en

presencia de los diferentes estímulos de muerte. Se sabe que la calpaína produce el fragmento 145/150 kDa mientras que la actividad de la caspasa-3 produce un fragmento de 120 kDa. En este trabajo, encontramos que el K5 y la STS producen la activación de caspasas, y no así la ionomicina, ya que el inhibidor de caspasas (ZVAD) inhibe parcialmente el fragmento de 120 kDa inducido por K5 y completamente el inducido por STS. De manera interesante, el fragmento 120 kDa inducido por K5 también disminuye parcialmente con el inhibidor de calpaínas (IC1). Con este resultado pensamos que la caspasa requiere de la actividad previa de la calpaína durante el procesamiento de la  $\alpha$ -espectrina como se ha reportado por Zhang (2009) en células PC12. Por otro lado, el K5 y la ionomicina, pero no la STS, producen el fragmento 145/150 kDa. Esta fragmentación se inhibe de manera importante cuando se utiliza un inhibidor general de calpaínas (IC1). Así, K5 y STS parecen activar también de manera diferencial dos grupos de proteasas críticos para la muerte apoptótica y necrótica, lo cual podría también contribuir a entender las diferencias en los cambios morfológicos y el procesamiento sufrido por las proteínas del citoesqueleto.

Una diferencia adicional entre K5 y STS se refiere a la expresión en los niveles de actina y tubulina en NGC. En el caso de K5 y STS por ejemplo, no se observaron cambios en los niveles de ninguna de las dos proteínas a tiempos tempranos (12 hrs); sin embargo, en las NGC tratadas con STS ocurrió un aumento en la expresión de  $\alpha$ , $\beta$ -tubulina y actina a tiempos largos (24 hrs). A tiempos cortos (12 hrs), los cambios morfológicos que observamos parecen ser el resultado del rearrreglo de las proteínas del citoesqueleto. Los resultados en la morfología de las NGC tratadas con STS a tiempos largos (24 hrs) podrían ser el resultado de mecanismos compensatorios que presenta la célula para mantener los niveles de actina y  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulina en los somas neuronales. Se ha sugerido que cambios postraduccionales de las proteínas de citoesqueleto como la destirosinación, fosforilación y acetilación entre otros procesos regulan la actividad de diversas proteínas, incluyendo aquellas que están

relacionadas con la muerte apoptótica (Giustiniani et al, 2009). En este sentido, pensamos que el incremento de actina y  $\alpha$ -tubulina inducido por STS podría estar relacionado con modificaciones postraduccionales en estas proteínas.

Ambos estímulos apoptóticos activan vías de caspasas diferentes y esto también podría estar relacionado con diferentes vías de señalización y con las diferencias en los cambios morfológicos que se observan en las NGC. Nuestro grupo reportó recientemente, que el K5 a diferencia de la STS induce muerte apoptótica en las NGC mediado por la activación de la vía JNK (Ramiro-Cortéz y Morán, 2009). También se tiene evidencia de que p38 está involucrado en la muerte apoptótica de NGC inducido por K5 y STS, pero el mecanismo que media su activación parece ser diferente en cada caso (Ramiro-Cortéz y Morán, 2009).

En conclusión, este trabajo muestra que la actina y la  $\alpha$  y  $\beta$ -tubulina sufren modificaciones que están relacionadas con los cambios morfológicos en las NGC tratadas con diferentes estímulos apoptóticos. Las caspasas son las principales ejecutoras de las alteraciones de la actina y  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulina en los cambios morfológicos inducidos por K5 y STS. La dinámica del citoesqueleto podría estar relacionada con las vías de señalización y con las diferentes caspasas que se activan durante la muerte inducida por K5 y STS en las NGC.

## **VIII. CONCLUSIONES**

El tratamiento con K5, STS y ionomicina inducen cambios morfológicos diferentes. En el tratamiento con K5, las neuritas persisten más tiempo, mientras que los somas sufren un proceso degenerativo alrededor de las 12 h. En contraste, en las NGC tratadas con STS los somas persisten más que las neuritas. La distribución de actina y  $\beta$ -tubulina se da de manera similar en cada condición apoptótica y sigue un patrón de alteraciones morfológicas. Los cambios morfológicos



durante la muerte apoptótica inducida por STS parecen estar relacionados principalmente con caspasas, mientras que en el caso de K5 por caspasas y calpaínas. Los niveles de expresión de actina y  $\beta$ -tubulina no se modifican en NGC tratadas con K5, pero sí en las tratadas con STS que induce un aumento en la expresión de ambas proteínas, las cuales responden de manera diferente a la inhibición de las proteasas. Así, los mecanismos implicados parecen comprender tanto al rearrreglo de actina y tubulina como el cambio en la expresión de estas proteínas. Finalmente, un elemento adicional que puede estar contribuyendo a las diferencias observadas entre K5 y ST es la participación de diferentes caspasas. Estos resultados sugieren que las neuronas podrían hacer uso de diferentes mecanismos moleculares finos dentro de cada tipo de muerte dependiendo de las condiciones de muerte a las que se enfrenten.

## IX. REFERENCIAS

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (2002). The Cytoskeleton: Molecular Motors. Molecular Biology of the Cell. 4<sup>th</sup>. Edition. New York. 949-53.
- Armstrong RC, Aja TJ, Hoang KD, Gaur S, Bai X, Alnemri ES, Litwack G, Karanewsky DS, Fritz LC, Tomaselli KJ. 1997. Activation of the CED3/ICE-related protease CPP32 in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis but not necrosis. J Neurosci 17: 553-562.
- Ashkenazi A, Dixit VM. (1998). Death receptors: Signalling and modulation. Science. 281:1305-1308.
- Balazs R, Jorgensen OS, Hack N. (1988). N-methyl-D-aspartate promotes the survival of cerebellar granule cells in culture. Neuroscience 27: 437-451.
- Baehrecke, E.H. (2005). Autophagy: Dual roles in life and death. Nat Rev Mol Cell Biol. 6 (6):505-510.
- Bizat N, Hermel JM, Humbert S, Jacquard C, Créminon C, Escartin C, Saudou F, Krajewski S, Hantraye P, Brouillet J. (2003). In vivo calpain/caspase cross-talk during 3 nitropropionic

acid induced striatal degeneration: implication of a calpain mediated cleavage of active caspase-3. *J Biol Chem* 278:43245-53.

Blagosklonny MV, Giannakakou P, El-Deiry WS et al (1997) Raf-1/Bcl-2 phosphorylation: a step from microtubule damage to cell death. *Cancer Res* 57:130-135.

Bonfoco E, Ceccatelli S, Manzo L, Nicotera P (1995) Colchicine induces apoptosis in cerebellar granule cells. *Exp Cell Res*. 218(1):189-200

Bradford M.(1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal Biochem*.72:248-54.

Brewton LS, Haddad L, Azmitia EC. (2001). Colchicine-induced cytoskeletal collapse and apoptosis in N-18 neuroblastoma cultures is rapidly reversed by applied s-100 beta. *Brain Res* 912: 9-16.

Burgoyne R y Canbray- Deakin . (1988). The cellular neurobiology of neuronal development, the cerebellar granule cells. *Brain Res Rev* 13:77-101.

Buss R, Sun W and Oppenheim R (2006) Adaptive roles of programmed cell death during nervous system development. *Annu Rev Neurosci*. 29:1-35.

Caballero-Benítez A, Morán J. (2003). Caspase activation pathways induced by staurosporine and low potassium: role of caspase-2. *J Neurosci Res* 71: 383-396.

Canu N, Dus L, Barbato C et al (1998) Tau cleavage and dephosphorylation in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis. *J Neurosci*. 18:7061-7074.

Castoldi AF, Barni S, Turin I, Gandini C, Manzo L. (2000). Early necrosis, delayed apoptosis and cytoskeletal breakdown in cultured cerebellar granule neurons exposed to methylmercury. *J. Neurosci Res* 59: 775-787.

Chang JY, Wang JZ .(1997). Morphological and biochemical changes during programmed cell death of rat cerebellar granule cells. *Neurochem Res* 22: 43-48.

Chimini G. (2002). Repulsive encounters. *Nature*.418:139-141.

Chua BT, Guo K, Li P.(2000). Direct cleavage by the calcium-activated protease calpain can lead to inactivation of caspases. *J. Biol. Chem*. 275:5131-5135.

- Cohen GM. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J.* 326:1-6.
- Cuervo, A.M. (2004). Autophagy: in sickness and in health. *Trends Mol Med.* 12 (8):382-93
- Darnell J, Lodish, Baltimore D. (1990). *Molecular Cell Biology*. 2th. Edition Scientific American Books. 815-899 USA.
- D'Mello SR, Aglieco F, Roberts MR, Borodezt K, Haycock JW. (1998). *J Neurochem* 70: 1809-1818.
- Ellis, RE, Yuan J, Horvitz R. (1991). Mechanisms and function of cell death. *Ann Rev Cell Biol.* 7: 663-698.
- Endresen PC, Fandrem J, Eide TJ et al (1995). Morphological modifications of apoptosis in HL-60 cells; effects of homocystein and cytochalasins on apoptosis initiated by 3-deazaadenosine. *Virchows Arch.* 426: 257-266.
- Farber E (1994) Programmed cell death: necrosis versus apoptosis. *Mod Pathol* 7:605–609
- Festjens, N.T. Vanden Berghe, and P. Vandenabeele. (2006). Necrosis a well orchestrated form of cell demise: signaling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim Biophys Acta.* 1757( 9-10):1371-87.
- Gao X, Wee A.S. Nock T.G (2005). Effect of ke (KT7515) preserves metabolito-acidosis on seizures currence in diabetic patients. *J.Miss State Med Assoc.* 46 (5):131-3
- Gerhardt ES, Kugler M, Leist C, Beier L, Berliocchi C, Volbracht M, Bahr P, Shultz JB. (2001). Cascade of caspases activation in potassium-deprived cerebellar granule neurons: targets for treatment with peptide and protein inhibitors of apoptosis. *Mol Cell Neurosci* 17: 717-731.
- Giustiniani J, Daire V, Cantaloube I et al (2009) Tubulin acetylation favors Hsp90 recruitment to microtubules and stimulates the signaling function of the Hsp90 clientes Akt/PKB and p53. *Cell Signal.* 21:529-39.
- Gorman, A.M., E. Bonfoco, B. Zhivotovsky, S. Orrenius, and S. Ceccatelli .(1999). Cytochrome release and caspase-3 activation during colchicine-induced apoptosis of cerebellar granule cells. *Eur. J. Neurosci.* 11: 1067-1072.
- Green DG, Beere HM. (2001). Mostly dead. *Nature*, 412: 133-134.

- Hamburger V (1980) Trophic interactions in neurogenesis: a personal historical account. *Annu Rev Neurosci.* 3: 269-78
- Harris CA, Deshmukh M, Tsui-Pierchala B, Maroney A, Johnson M. (2002). Inhibition of the c-jun N-terminal kinase signaling pathway by the mixed lineage kinase inhibitor CEP-1347 preserves metabolism and growth of trophic factor deprived neurons. *J. Neurosci.* 22 (1):103-13
- Hengartner, MO. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407:770-776.
- Hesketh J, Pryme I. (1995). *The Cytoskeleton: Structure and Assembly*. Vol.1 Jai Press Inc.
- Hirsch T, Marchetti P, Susin SA et al (1997) The apoptosis necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene* 15:1573–1581
- Howard J. (2004). *Mechanics of motor proteins and the Cytoskeleton*, Sinauer Associates, Inc. Massachusetts.
- Huot J, Houle F, Rousseau S et al (1998) SAPK2/p38-dependent F-actin reorganization regulates early membrane blebbing during stress-induced apoptosis. *J Cell Biol* 143: 1361–1373.
- Ito M. (1984). *The cerebellum and neuronal control*. Raven Press. NY, USA. 580 pp.
- Jacobson M, Weil M and Raff (1997) Programmed cell Death in animal development. *Cell.* 88(3): 347-54.
- Jean- Claude Platel, Benjami Lacar and Angelique Borday. (2008). GABA and Glutamate signaling: homeostatic control of adult forebrain Neurogenesis. *J. Mol. Histo.* 38(4):303-311.
- Jordá EG, Verdaguer E, Jiménez A, Arriba SG, Allgaier C, Pallàs M, Camina A . (2005). Evaluation of the neuronal apoptotic pathways involved in cytoskeletal disruption induced Apoptosis. *Biochem Pharmacol* 70: 470-480.
- Karp G. (2005). *Molecular and Cell Biology: Concepts and Experiments*. 4<sup>th</sup> Edition. McGrawHill Edition. 357-417.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with a wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br.J. Cancer* 26:239-257.

- Kerr JFR, Harmon BV (1991) Definition and Incidence of apoptosis: An Historical Perspective. In: Tomei D (ed) Apoptosis: The Molecular Basis of Cell Death. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp 5-29.
- Kelekar, A (2005) Autophagy. *Ann N Y Acad Sci.* 1066:259-71.
- Kevin KW. (2000). Calpain and caspase: can you tell the difference?. *Trends Neurosci.* 23:20-26.
- Kim JA, Mitsukawa K, Nishiyama N, Matsuki N, Ikegaya Y. (2002). Cytoskeleton disruption causes apoptotic degeneration of dentate granule cells in hippocampal slice cultures. *Neuropharmacology.* 42: 1109-1118.
- Kristensen BW, Noer H, Gramsbergen JB, Zimmer J, Noraberg J . (2003). Colchicine induces apoptosis in organotypic hippocampal slice cultures. *Brain Res* 964: 264-278.
- Lankiewicz, S.C. Marc Luetjens, N Truc Bui, A.J. Krohn, M. Poppe G.M. Cole T.C. Saido and J.H. (2000). Activation of calpain I converts excitotoxic neurons death into a caspase-independent cell death. *J. Biol.Chem.* 275(22):17064-71
- Levin S (1998) Apoptosis, necrosis, or oncosis: what is your diagnosis? A report from the Cell Death Nomenclature Committee of the Society of Toxicologic Pathologists. *Toxicol Sci* 41:155–156
- Levine, B.S, Sinha and G. Kroemer. (2008). Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy.* 4(5):600-6.
- Lockshin RA and Z. Zakeri. (2004). Apoptosis, autophagy and more. *Int J Biochem Cell Biol.* 36 (12): 2405-19.
- Marks N, Berg MN, Guidotti A, Saito A .(1998). Activation of caspase-3 and apoptosis in Cerebellar cells. *Journal Neurosci Res* 52: 334-341
- Mashima T, Naito M, Tsuruo T. (1999). Caspase mediated cleavage of cytoskeletal actin plays a positive role in the process of morphological apoptosis. *Oncogene* 18:2423-30.
- Maycotte P, Guemez-Gamboa A, Moran J. (2010). Apoptosis and Autophagy in Rat Cerebellar granule Neurons Death: Role of Reactive Oxygen Species. *J Neurosci Res.* 88(1):73-85.

- McGinnis KM, Gnegy ME, Falk N, Nath R, Wang KK . (2003). Cytochrome c translocation does not lead to caspase activation in maitotoxin-treated SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neurochem Int* 2003:517-23.
- Morán J, Itoh RU, Reddy M, Chen SE, Pleasure D .(1999). Caspase-3 expression by cerebellar granule neurons is regulated by calcium and cyclic AMP. *J Neurochem* 73: 568-577.
- Muller GJ, Geist MA, Veng LM, Willensen MG, Johansen FF, Leist M, Vaudano E . (2006). A role for mixed lineage kinases in granule cells apoptosis induced by cytoskeleton disruption. *Neurochem.* 96: 1242-1252.
- Nath R, Raser KJ, McGinnis K, Nadimpalli R, Stafford D,Wang KK (1996). Effects of ICE-like protease and calpain inhibitors on neuronal apoptosis. *Neuroreport* 8: 249-55.
- Ni B, Wu X, Du Y, Su Y,Hamilton-Byrd E, Rockey PK, Rosteck PK, Poirier GG, Paul SM (1997). Cloning and expression of a rat brain interleukin -1beta-converting enzyme (ICE)-related protease (IRP) and its possible role in apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 16:1561-1569.
- Oppenheim RW. (1991). Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 14: 453-501.
- Oppenheim RW, Prevet D, Tytell M, Homma S (1990). Naturally occurring and induced neuronal death in the chick embryo in vivo requires proteins and RNA synthesis: evidence for the role of cell death genes. *Dev Biol* 138: 104-113.
- Proskuryakov, S.Y. Konoplyannikov, A.G. and V.L.Gabai. (2003). Necrosis: a specific form of programmed cell death. *Exp Cell Res.* 283(1):1-16.
- Pike BR, Zhao X, Newcomb JK, Wang KK, Posmantur RM, Hayes RL. Temporal. (1988). relations between the novo protein synthesis, calpain and caspase 3-like protease activation, and DNA fragmentation during apoptosis in septo-hippocampal cultures. *J. Neurosci Res.* 1:52(5):505-20
- Rami A. (2003). Ischemic neuronal death in the rat hippocampus: the calpain-calpastatin-caspase hypothesis. *Neurobiol. Disease*, 13:75-88.
- Ramiro-Cortés Y, Morán J (2009) Role of oxidative stress and JNK pathway in apoptotic death induced by potassium deprivation and staurosporine in cerebellar granule neurons. *Neurochem Int.* 55:581-92.

- Rao RV, Ellerby HM, Bredensen DE (2004). Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death Differ* 11(4):372-80.
- Rathna NM, Hugginsa B, Susan J, Morrowb K, McGinnisc R, Nadimpallia KW, Wangc C. (2000). Alpha II-spectrin (alpha-fodrin) is demonstrated endogenous substrate for caspase-3 in neurons undergoing unscheduled apoptotic death. *Neurochem Int* 37: 357-361.
- Rudel T (1999) Caspase inhibitors in prevention of apoptosis. *Herz*. 24: 236-241.
- Salvensen GS, Dixit VM. (1999). Caspase activation: The induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 10964-10967.
- Sarkar S (2009) Rapamycin and mTor-independent autophagy inducers ameliorate toxicity of polyglutamine-expanded huntingtin and related proteinopathies. *Cell Death Differ* 16(1):46-56.
- Shelton SB, Johnson GV .(2001). Tau and HMW tau phosphorylation and compartmentalization in apoptotic neuronal PC12 cells. *J Neurosci Res* 66: 203-213.
- Shimizu S (2004) Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol*. 6(12):1221-8
- Shultz JB, Weller M, Klockgether T. (1996). Potassium deprivation induced apoptosis in cerebellar granule neurons: a sequential requirement for new mRNA and protein synthesis, ICE-like protease activity, and reactive oxygen species. *J. Neurosci* 6:4696-4706
- Stocka, V.B. Turk, S.L. Shendel, T.H Kim, T Cirman, S.J. Snipas, L.M. Ellerby, D. Bredensen, H. Freeze, M. Abrahamson, D. Bromme, S Krajewski, J.C. Reed, X.M. Yin, V Turk and Salvensen, G.S. (2001). Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not-procaspases, is the most likely route. *J. Biol. Chem*. 276(5):3149-57.
- Takano J, Tomioka M, Tsubuki S, Higuchi M, Iwata N, Itohara S, Maki M , Saido TC. (2005). Calpain mediates excitotoxic DNA fragmentation via mitochondrial pathways in adult brains: evidence from calpastatin mutant mice. *J Biol Chem* 280: 16175-84.
- Thornberry NA, Lazebnik Y .(1998). Caspases: enemies within. *Science* 281: 1312-1316.
- Vanags DM, Pörn-Ares MI, Coppola S, Burgess DH, Orrenius S .(1996). Protease involvement in fodrin cleavage and phosphatidylserine exposure in apoptosis. *J Biol Chem* 271:31075-85.

Yan GM, Ni B, Weller M, Wood KA, Paul SM (1994). Depolarization or glutamate receptor activation blocks apoptotic cell death of cultured cerebellar granule neurons. *Brain Research* 656: 43-51.

Zhang Z, Larner S, Cheng Liu M (2009) Multiple alphaII-spectrin breakdown products distinguish calpain and caspase dominated necrotic and apoptotic cell death pathways. *Apoptosis*.14:1289-1298.

Zhuang S, Lynch M, Kochevar IE. (1999). Caspase 8 mediates caspase 3 activation and cytochrome c release during singlet oxygen induced apoptosis of HL-60 cells. *Exp Cell Res*, 250:203-212.

Yu L, McPhee CK, Zheng L, Mardones GA, Rong Y, Peng J, Mi N, Zhao Y, Liu Z, Wan F, Hailey DW, Oorschot V, Klumperman J, Baehrecke EH, Lenardo MJ (2010). Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature*, 465:942-946.

Yu, L (2004) Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase 8. *Science*, 2004. 304 (5676):1500-1512.