



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**PAPEL DE LA NADPH-OXIDASA DURANTE EL DESARROLLO DEL CEREBELO
DE RATA.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

ANGÉLICA BERENICE COYOY SALGADO

TUTOR PRINCIPAL

DR. JULIO MORÁN ANDRADE, INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR Y ENTIDAD O INSTITUCIÓN DE
ADSCRIPCIÓN

DRA. DIANA ESCALANTE ALCALDE, INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

DR. PEDRAZA CHAVERRI, FACULTAD DE QUÍMICA

MÉXICO, D. F. JUNIO, 2013



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.

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis Doctoral se realizó bajo la dirección del Dr. Julio Morán Andrade en el laboratorio BL-302, del Departamento de Neurociencias en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Diana Escalante Alcalde	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. José Pedraza Chaverri	Facultad de Química, UNAM
Dr. Julio Morán Andrade	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Se reconoce la asesoría técnica de la M. en C. Guadalupe Domínguez M., técnico del laboratorio.

Se reconoce la colaboración del Dr. Ricardo Tapia, del Departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de Rota Rod. Del Dr. Iván Velasco, del Departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de Campo abierto. De la Dra. Lourdes Massieu, del Departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular. Del Dr. Javier Espinosa del Instituto de Investigaciones Biomédicas, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de PCR en tiempo real. De la Dra. Diana Escalante, del Departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular.

Se reconoce la asesoría técnica de la Dra. Cristina Márquez, de la Dra. Amalia Márquez, Dra. Diana Escalante, de la Lic. Teresa Montiel, de la Q.F.B. Sitlali Olguín Reyes del Biol. Gabriel Orozco y las unidades de Cómputo, Microscopía, Bioterio, Taller e Histología del Instituto de Fisiología Celular.

El proyecto fue apoyado parcialmente por DGAPA-UNAM (IN218310 y IN206213) y CONACyT (179234). Durante los estudios de doctorado gocé de una beca otorgada por CONACyT para la realización de la presente tesis.

ÍNDICE

	Páginas
RESUMEN	4
ABSTRACT	5
INTRODUCCIÓN	6
Aspectos generales del cerebelo y su desarrollo	6
Especies reactivas de oxígeno	10
NADPH oxidasa	15
Papel fisiológico de las ERO producidas por las NOX	22
NOX1	22
NOX2	23
NOX3	23
NOX4	24
NOX5	24
DUOX	25
ANTECEDENTES	26
HIPÓTESIS	28
OBJETIVO	28
OBJETIVOS PARTICULARES	28
MATERIALES Y MÉTODOS	29
RT-PCR	29
PCR en tiempo real	31
Inmunoblots	32
Detección de ERO	32
Actividad de NADPH-oxidasa	33
Inmunohistoquímica GFAP	33
Inmunohistoquímica Caspasa 3 activa	34
Evaluación de migración neuronal	34
Medición de la actividad locomotora	35
Análisis estadístico	37
RESULTADOS	37
DISCUSION	51
SUMARIO Y CONCLUSION GENERAL	58
ARTICULO PUBLICADO	59
REFERENCIAS	74

RESUMEN

Las evidencias experimentales sugieren que las especies reactivas de oxígeno (ERO) podrían participar en la regulación de algunas funciones fisiológicas. Se ha propuesto que las ERO pueden actuar como moléculas de señalización y participar en el proceso del desarrollo regulando la diferenciación celular, la proliferación y la muerte celular programada. Aunque las fuentes de ERO pueden ser diversas, se ha sugerido que la NADPH oxidasa (NOX) podría ser crítica en la producción de ERO y podría participar en algunos de estos eventos. La familia de la NOX está formada por 5 enzimas homólogas, nombradas NOX1, NOX2, NOX3, NOX4 y NOX5.

Se ha reportado que las ERO producidas por NOX participan en la maduración neuronal y en la diferenciación durante el desarrollo del cerebro. En un estudio previo encontramos que una NOX participa en la muerte programada de las neuronas granulares del cerebelo durante el desarrollo in vitro. Para conocer si la NOX es necesaria en el desarrollo del cerebelo, en el presente trabajo, se estudió el papel de las ERO y de la NOX en la migración de las células granulares de cerebelo en un modelo in vitro y en el desarrollo del cerebelo in vivo, utilizando antioxidantes e inhibidores de la NOX.

Por un lado, encontramos en cultivos de células granulares del cerebelo de rata una producción diferencial de ERO a distintas edades, lo que coincidió con una expresión del mRNA y proteína de los homólogos de NOX. Cuando se evaluó la migración de las células granulares del cerebelo en cultivo encontramos que las células que migran generan ERO, y que un antioxidante o inhibidores de la NOX disminuyen la migración de estas células.

También demostramos que durante el desarrollo in vivo del cerebelo de la rata entre el día posnatal (P)4 y P25 ocurre una generación diferencial de ERO entre las distintas capas del cerebelo. Demostramos que las células que producen las ERO son principalmente neuronas. También se encontró una expresión diferencial de los homólogos de la NOX durante el desarrollo del cerebelo de la rata. El mRNA de NOX1 en P8 aumenta respecto a P4 y posteriormente se reduce a P16. El mRNA de NOX2 aumenta a P12 y P16 respecto a P4 y P8. El mRNA de NOX4 disminuye desde P16. Por otro lado, la proteína de NOX1 disminuye a P12 y P25 respecto a P4, mientras que la proteína de NOX2 aumenta a P8 y P16 respecto a P4 y NOX4 disminuye desde P12.

Cuando tratamos a ratas en desarrollo, entre P2 y P25, con el antioxidante MnTMPyP o con apocinina, un inhibidor de la NOX, encontramos una marcada disminución en los niveles de ERO en todas las capas del cerebelo a todas las edades evaluadas. Ambos tratamientos indujeron un cambio significativo en la foliación del cerebelo, particularmente en las folias II, III, IV, V, VI y IX a partir de P4. Cuando se evaluó el comportamiento locomotor de los animales tratados bajo estas condiciones se encontró una alteración marcada en distintos parámetros de actividad locomotora asociada particularmente al cerebelo. Estos resultados sugieren que las ERO juegan un papel fundamental en los mecanismos del desarrollo del cerebelo a diferentes niveles y que una fuente de estas ERO podría ser algún(os) homólogo (s) de la NOX.

ABSTRACT

Experimental evidence suggests that reactive oxygen species (ROS) could participate in the regulation of physiological functions. It has been proposed that the ROS could act as signaling molecules during development, regulating cellular differentiation, proliferation and programmed cell death. Although the sources of ROS may be different, it has been suggested that NADPH-oxidase (NOX) could be critical in the production of ROS and it could participate in some of these developmental processes. The NOX family is formed by five homologues, named NOX1, NOX2, NOX3, NOX4 and NOX5.

It has been reported that ROS produced by NOX are involved in neuronal maturation and differentiation during the development of the brain. In a previous study, we found that NOX participates in the programmed death of cerebellar granule neurons (CGN) during development in vitro. In the present work, we studied the role of the ROS and NOX in the migration of CGN in an in vitro model as well as in the development of the cerebellum in vivo, using antioxidants and inhibitors of the NOX.

Under these conditions, we found in cultures CGN a differential production of ROS at different ages, which coincided with the expression of mRNA and protein of NOX homologues. When we evaluated the migration of CGN in culture, we found that migrating cells generate higher levels of ROS, and that an antioxidant or inhibitors of the NOX decrease the migration of these cells.

We also demonstrated that during the development of rat cerebellum in vivo occurs a differential generation of ROS in the different regions of the cerebellum between postnatal day (P)4 and P25. The observed ROS production corresponded to neurons. We also found a differential expression of the counterparts of NOX during the development of the cerebellum of the rat. At P8, NOX1 mRNA increases with respect to P4, which was subsequently reduced at P16. NOX2 mRNA increases at P12 and P16 as compared to P4 and P8. NOX4 mRNA decreases from P16. On the other hand, NOX1 protein decreases at P12 and P25 as compared to P4, while NOX2 protein increases at P8 and P16 respect to P4. NOX4 decreases from P12.

When we treated developing rats, between P2 and P25, with the antioxidant MnTpyP antioxidant or the inhibitor of the NOX, apocynin, we found a marked decrease in the levels of ROS in all layers of the cerebellum at all the assessed ages. Both treatments induced a significant change in the foliation of the cerebellum, particularly in folia II, III, IV, V, VI y IX from P4. When the locomotor behavior of animals treated under these conditions was evaluated, we found a marked change in the different parameters of locomotive activity, particularly those associated with the cerebellum. These results suggest that the ROS play a fundamental role in the cerebellar development at different levels and that a possible source of these ROS could be a NOX homologue.

INTRODUCCIÓN

Aspectos generales del cerebelo y su desarrollo

El cerebelo es una estructura que participa en diversas funciones, incluyendo funciones sensoriales motoras, el control del balance y el reflejo vestibular ocular (Ito, 2006). Recientemente, se ha encontrado que el cerebelo es importante en funciones cognitivas, como el habla y la memoria espacial (Boyden et al., 2004; De Zeeuw Yeo, 2005; Schmahmann y Caplan, 2006).

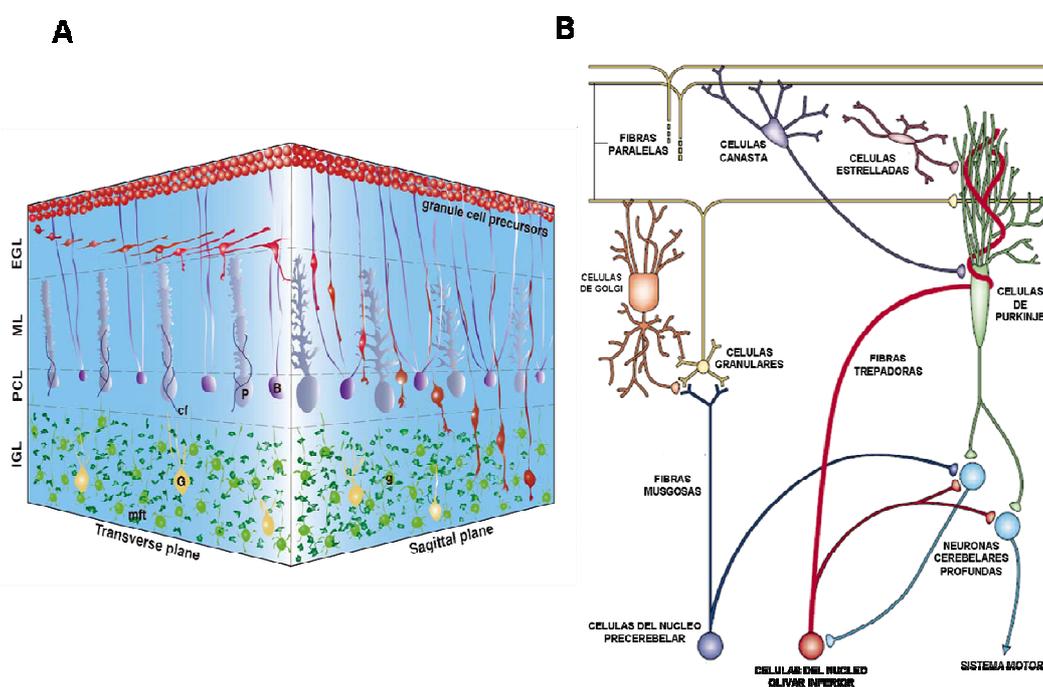


Figura 1. Desarrollo postnatal del cerebelo. A. Representación tridimensional de la migración de las células granulares de la capa granular externa (EGL) a la capa granular interna (IGL) en el cerebelo del ratón. 1, extensión de dos procesos irregulares horizontales cerca de la parte superior de la EGL; 2, Imigración tangencial en el centro de la EGL; 3, desarrollo de proceso vertical cerca de la frontera entre la EGL y la capa molecular (ML); 4, inicio de la migración radial en la frontera EGL-ML; 5, migración radial asociada a la glia de Bergmann en la ML; 6, estado estacionario en la capa de células de Purkinje (PCL); 7, migración radial independiente de la glia en la IGL; 8, finalización de la migración en la IGL. Abreviaturas: P, células de Purkinje, B, células gliales de Bergmann, G, células de Golgi, g, células granulares postmigratorias; cf, fibras trepadoras; tmf, fibras musgosas terminales. B. Diferentes tipos neuronales presentes en el cerebelo y sus conexiones. (Modificado de Komuro, 2003; Wang y Zoghbi, 2001).

Las neuronas cerebelares se localizan en la corteza, la cual está formada por tres capas que contienen cinco tipos celulares neuronales: células estrelladas, células en canasta, células de Golgi, células de Purkinje y células granulares. La capa externa o capa molecular, se compone principalmente de axones de células granulares (fibras paralelas), células estrelladas, células en canasta y dendritas de las células de Purkinje.

Debajo de la capa molecular se encuentra la capa de las células de Purkinje, constituida por los cuerpos celulares de estas neuronas. La capa granular contiene los somas de las neuronas granulares y de las células de Golgi (Fig. 1). Aunque el cerebelo constituye cerca del 10% del volumen total del cerebro, las neuronas granulares (NGC) constituyen casi el 80% del total de las neuronas del cerebro. La organización de la corteza con pocos tipos neuronales, su arreglo en capas conspicuas y su accesibilidad hacen del cerebelo un modelo interesante para el estudio de los procesos del desarrollo en el sistema nervioso central

El desarrollo del cerebelo de la rata es posnatal y se completa durante las 3 primeras semanas de vida, lo que coincide con el desarrollo de las NGC. Al momento del nacimiento, la superficie externa del cerebelo contiene una capa de células precursoras cerebelares. Estas células poseen una alta capacidad proliferativa. En roedores estas células producen cerca del 80 al 90% de neuronas precursoras durante la primera semana de vida. Desde el primer día postnatal (P) algunas de estas células se sitúan en la zona basal constituyendo la zona premigratoria que crece en grosor entre P7 y P10. Para el día 11, la zona proliferativa y premigratoria han disminuido marcadamente su grosor en parte como resultado de una migración masiva de estas células hacia la capa granular interna (Fig. 1, 2 y 3).

Las células de la capa granular externa migran hacia la capa granular interna (Altman, 1972) a través de los procesos de las células gliales de Bergman. Se ha propuesto que la migración sobre las células gliales podría darse mediante el reconocimiento tanto de moléculas de adhesión celular de ambos tipos celulares como de componentes de la matriz extracelular. Alrededor de la segunda semana se completa la migración y en consecuencia la capa más externa es la capa molecular, conteniendo los axones de las neuronas granulares y a las células estrelladas y en canasta (fig.3).

Algunas de las NGC que han migrado y arribado a la capa granular interna reciben cerca del P5 los primeros contactos sinápticos excitadores entre sus dendritas y los axones de las fibras musgosas, provenientes del tallo cerebral y cordón espinal. Sin embargo, se ha descrito que la mayoría de estos contactos sinápticos comienzan a ser funcionales entre P10-P12 (Arsenio-Nuñez y Sotelo, 1985; Burgoyne y Cambray-Deakin, 1988), cuando la mayoría de las NGC han alcanzado la capa granular interna (Fig 1 y 3).

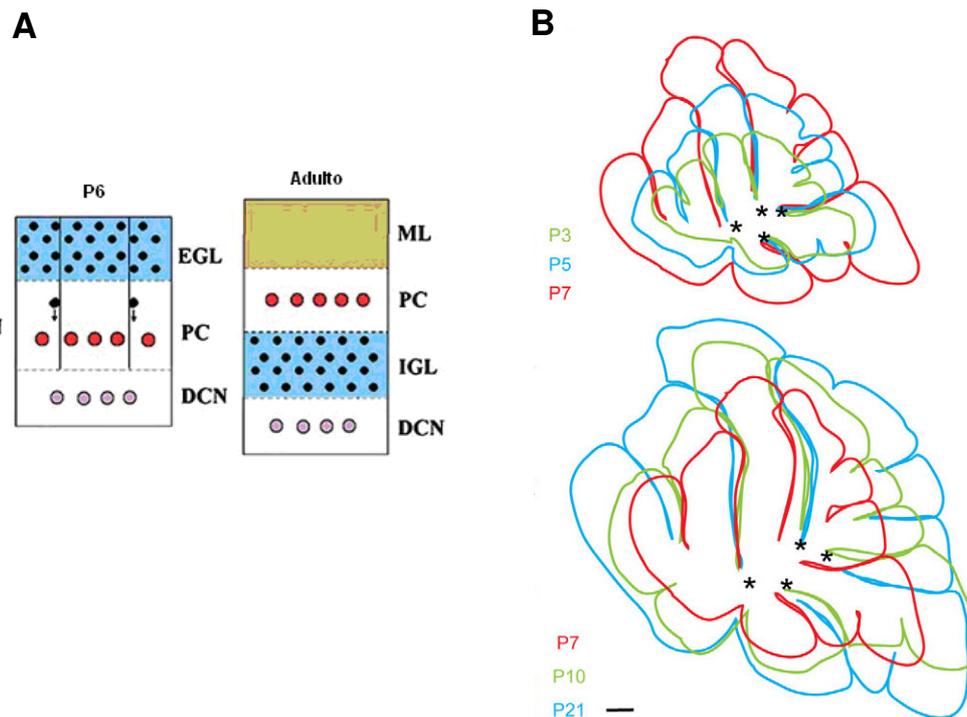


Figura 2. Diagrama esquemático del desarrollo del cerebelo. A. En el cerebelo a P6 se observa la capa granular externa (EGL), la capa de células de Purkinje (PC) y el núcleo cerebelar profundo (DCN), demostrando la abundante migración neuronal que se requiere para obtener la estructura laminar del cerebelo adulto. Las flechas indican la dirección de la migración celular. Las células granulares son negras, las células rojas son las células de Purkinje y las células del núcleo cerebelar profundo son las rosas. Las fibras gliales se representan como líneas negras. B. Sobreposición de la línea media del vermis desde P3 a P21 mostrando que la folia crece en forma alargada, mientras que la base de las fisuras permanecen fijas en una posición. La barra de escala representa 600 μm . (Modificado de Sudarov y Joyner, 2007; Chizhikov y Millen, 2003)

A lo largo de este proceso los tipos celulares del cerebelo van adquiriendo su fenotipo neural definitivo que les conducirá a un estado especializado, ampliando así la expresión de ciertas características, tanto morfológicas como metabólicas. Durante este proceso las células definen el neurotransmisor a utilizar durante el estado maduro, lo cual conlleva a la expresión de la maquinaria bioquímica para la síntesis, liberación y captura de dicho neurotransmisor.

Finalmente, uno de los eventos críticos del desarrollo de las NGC es la muerte programada. Se ha calculado que alrededor del 50% de las NGC que proliferan se eliminan en periodos críticos del desarrollo. Se ha sugerido que el tipo de muerte predominante es apoptótico. En particular, se ha demostrado que uno de los momentos de mayor muerte de NGC ocurre durante la segunda semana posnatal (Tanaka et al, 2000).

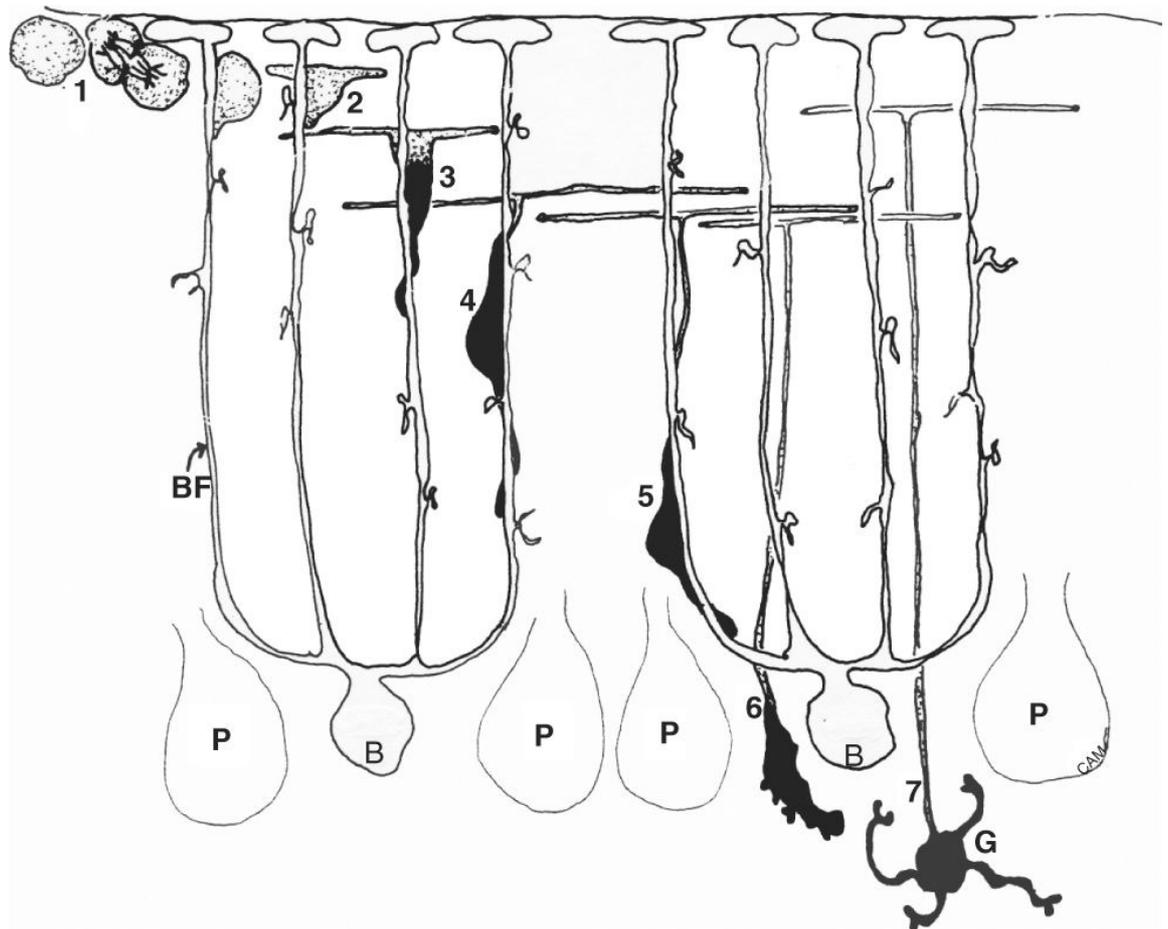


Figura 3. Migración de las células granulares. Las células granulares se dividen en la capa superficial de la corteza cerebelar neonatal (1), después de lo cual, las células granulares postmitóticas comienzan a extender sus axones (2) y el proceso conductor desciende (negro) (3) el cual migra a lo largo de la fibra radial de Bergmann (B) el soma de la célula granular permanece sobre la fibra radial de Bergmann (4,5). A nivel de las neuronas de Purkinje (P) las neuronas granulares se desprenden de la fibra radial de Bergmann (6) y se mueven en la capa granular interna donde se diferencian a neuronas granulares maduras (G) con dendritas cortas, como garras, que forman con conexiones aferentes con las fibras musgosas (no se muestra). (Tomado de Roussel y Hatten, 2011).

Todos estos eventos están dirigidos por la combinación de una serie de estímulos internos y externos y la información genética de estas neuronas. Las NGC son blanco de las fibras musgosas, las cuales son excitadoras y usan glutamato y acetilcolina como neurotransmisores. Se ha sugerido que las influencias presinápticas de estas fibras son críticas para promover la diferenciación y supervivencia de las NGC durante periodos críticos del desarrollo del cerebelo. Estudios *in vivo* indican que el tiempo crítico en el que las NGC reciben las influencias glutamatérgicas es entre los P10 y P19, si se bloquean estos influjos alteran la supervivencia (Alavez et al, 2006) y la diferenciación de las NGC (Morán et al, 1999b). Por otro lado, en rebanadas del cerebelo inmaduro la inhibición de

los receptores glutamatérgicos induce una reducción en la migración de las NGC (Komuro y Rakic, 1993).

Especies reactivas de oxígeno

Especies reactivas de oxígeno (ERO) es el nombre genérico que se le da a una variedad de moléculas y radicales libres derivados del oxígeno molecular (O_2). Las principales ERO generadas son resultantes del producto de la ruptura o de la excitación del O_2 , como el ozono (O_3) y el oxígeno en singulete (1O_2). En un segundo grupo se encuentran las especies de oxígeno parcialmente reducidas como el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$) (Dröge, 2002; Halliwell, 1992). Cuando el anión superóxido reacciona con el óxido nítrico (NO), se produce el peroxinitrito ($ONOO^-$), el cual es altamente reactivo. La reacción de Haber-Weiss utiliza al hierro para generar radicales hidroxilo a partir de superóxido o peróxido de hidrógeno.

Las ERO interactúan con una gran cantidad de moléculas, incluyendo moléculas inorgánicas, proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos, entre otras. De esta forma las ERO pueden alterar la funcionalidad de una gran variedad de moléculas, lo que puede repercutir en los procesos fisiológicos en función de la concentración de ERO, el tipo celular y el contexto en el que se encuentren las células (Covarrubias et al., 2008). Se sabe que las concentraciones elevadas de ERO llevan a la degeneración y muerte celular como resultado de la oxidación masiva e inespecífica de moléculas como lípidos, proteínas y DNA (Lambeth, 2004). (Fig. 4)

El radical hidroxilo es el principal causante de modificaciones oxidativas en las proteínas. Puede haber oxidaciones de las cadenas laterales de los aminoácidos o en la cadena polipeptídica principal, lo que conduce a su fragmentación, también produce entrecruzamientos proteína-proteína. Los aminoácidos más sensibles a la oxidación son la cisteína y la metionina (Standtman and Berlett, 1998).

Entre los lípidos, los ácidos grasos insaturados son el principal blanco de oxidación por EOR. La oxidación de los lípidos membranales afecta las interacciones que estabilizan la integridad de la membrana, alterando su función.

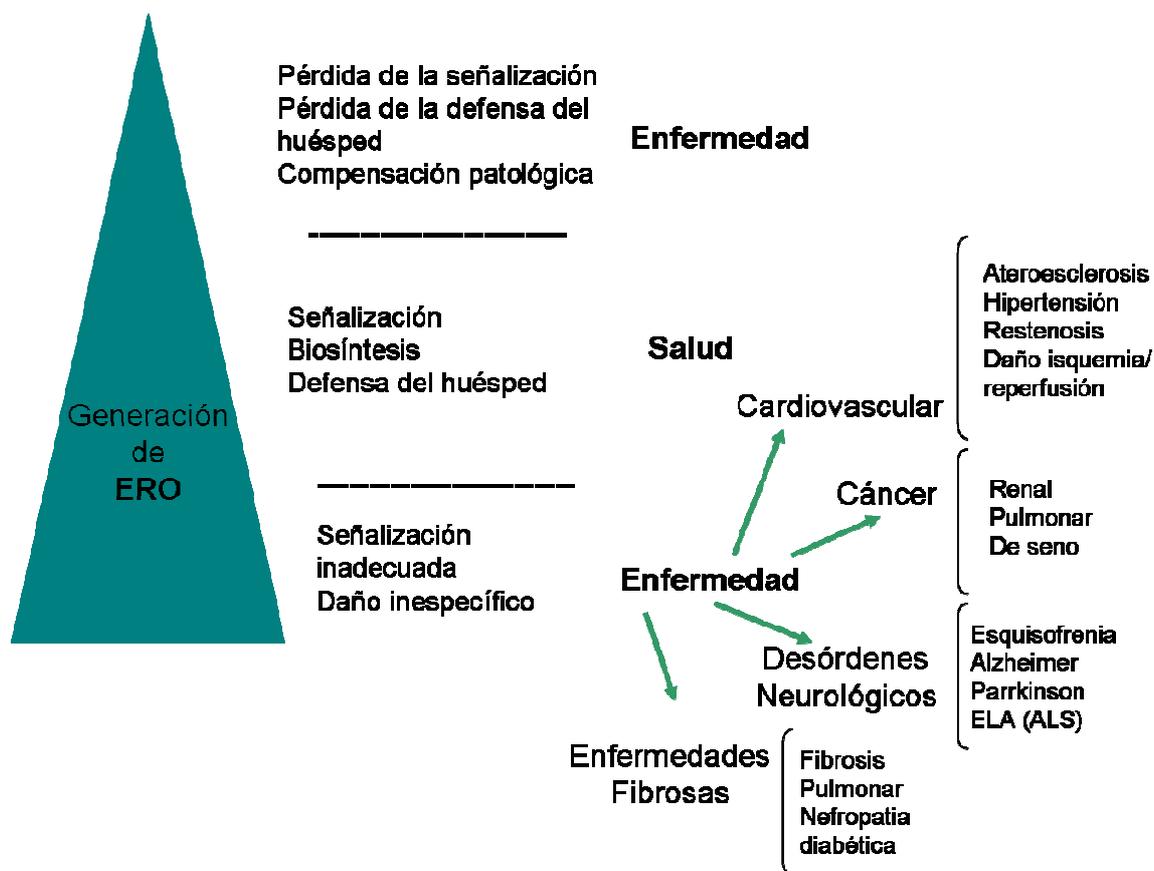


Figura 4. Regulación de ERO en procesos fisiológicos y patológicos. A niveles moderados, las ERO tienen un papel crucial en la salud a través de mecanismos como la señalización, procesos biosintéticos, y la defensa del huésped. Cuando las ERO son producidas en niveles bajos, puede producir una disminución de la defensa antimicrobiana (por ejemplo, en la enfermedad granulomatosa crónica), hipotiroidismo, presión arterial baja o pérdida de la otoconia. Cuando los niveles son muy altos ocasionan aumento de las enfermedades cardiovasculares, trastornos neurológicos, cáncer e inflamación crónica.

Por otro lado, recientemente se ha demostrado que las ERO participan en diversos procesos fisiológicos y patológicos, regulando eventos como el crecimiento celular, la adhesión, la diferenciación, la senescencia y la apoptosis, entre otros (Dröge, 2002). En estos casos las ERO son generadas endógenamente en respuesta a la activación de receptores intra y extracelular, citocinas, factores de crecimiento, etc. Las ERO producidas actúan a través de mecanismos moleculares que no se conocen completamente y que pueden implicar la activación o inhibición de vías de señalización intracelular, la modificación de receptores y de moléculas del citoesqueleto (Hernández-García y cols. 2010), entre otros.

Las células animales expuestas a una concentración de oxígeno elevada o a una tensión oxidativa transcriben los genes de las proteínas de choque térmico, las proteínas reguladas por glucosa, la hemoxigenasa-1, la colagenasa, algunas moléculas de adhesión

(ICAM-1) y algunas citocinas (TNF, IL-2, IL-6, IL-8), además de la catalasa, la glutatión peroxidasa, la tioredoxina y a veces la MnSOD.

Los factores de transcripción activados durante la tensión oxidativa son el NF- κ B, el AP-1 y el AP-2 (Klotz LO, et al., 2000; Wang, et al., 2002). La actividad del NF- κ B (Wang, et al 2002; Pineda-Molina, et a., 2001) y del AP-1 (Toone, et al., 2001), al igual que el factor de transcripción en bacterias OxyR (Choi H, 2001), depende del estado redox de una o dos cisteínas críticas.

La endonucleasa que repara los sitios sin base (sitios AP) (APE/HAP-1) es al mismo tiempo el factor redox Ref-1 que también reduce las cisteínas de AP-1, NF- κ B, Erg-1 y p53 para que éstos se puedan unir al ADN (Fritz G y Kaina B 1999).

Asimismo se ha descrito la regulación de algunos canales de Ca²⁺ y de K⁺ por el estado redox del GSH/GSSG (Chung, et al., 2002). La tensión oxidativa también activa la expresión de p21 que determina la detención del ciclo celular.

En el sistema nervioso las ERO tienen un papel importante en la regulación del crecimiento neurítico, la sinaptogénesis y la plasticidad sináptica. Los antioxidantes y otros agentes que afectan la producción o metabolismo de las ERO pueden afectar el crecimiento neurítico, la sinaptogénesis y la transmisión sináptica en varios sistemas (Mattson, 1998). El aumento de los neurotransmisores pueden estar regulados por las ERO; por ejemplo, el óxido nítrico y el radical hidroxilo pueden regular el aumento de acetilcolina en cultivos de neuronas corticales (Ohkuma et al, 1995). Se ha demostrado que una variedad de agentes tróficos inducen o suprimen la producción de ERO. Muchos factores tróficos que promueven el crecimiento neurítico disminuyen la acumulación de ERO, por ejemplo bFGF induce el crecimiento dendrítico y axonal en cultivos embrionario de neuronas hipocámpales (Mattson et al, 1989) y disminuyen la acumulación de ERO (Mattson et al, 1995).

Como se mencionó, durante el desarrollo del sistema nervioso ocurre una muerte neuronal masiva en un periodo crítico de tiempo (Roth y D'Sa, 2001), lo cual asegura que un número adecuado de neuronas establezca inervaciones apropiadas con órganos efectores o con otras poblaciones neuronales. Se ha sugerido que la generación de ERO participa activamente en la muerte apoptótica neuronal que ocurre durante el desarrollo del cerebro (Schulz et al, 1996; Valencia y Moran, 2001). En este último caso se ha propuesto que las ERO podrían servir como señal inicial durante el proceso de muerte, mientras que en otros casos puede servir como un ejecutor de la muerte.

Se ha reportado que las ERO incrementan durante el primer mes postnatal en comparación con los niveles detectados en etapas embrionarias (Scarpa et al, 1987). La cantidad de ERO en el cerebro de rata es menor a los 7-21 P, incrementándose en las ratas adultas y alcanzando el nivel más alto en ratas ancianas, estos resultados concuerdan con los descritos por Schreiber (Schreiber et al, 1995; Driver et al, 2000) y sugieren que pueden ser intrínsecas las diferencias en la producción de especies reactivas y las diferencias relacionadas con la edad. La respuesta de las neuronas frente las ERO cambia durante el desarrollo (Kushima et al, 1990), por ejemplo altas concentraciones de oxígeno inducen muerte neuronal en neuronas embrionarias, pero no en neuronas posnatales (Ishikawa et al, 1999).

En los sistemas biológicos una parte de las ERO se forman como subproducto de la respiración aeróbica (Halliwell, 1991). Durante el transporte de electrones mitocondrial algunos electrones escapan dando lugar a la formación de anión superóxido (Fig. 5). El anión superóxido se puede convertir a su vez en peróxido de hidrógeno por acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD). Además, este anión también puede ser transformado no enzimáticamente a H_2O_2 y 1O_2 . El peróxido de hidrógeno producido puede ser subsecuentemente transformado en agua por enzimas como la catalasa y la glutatión peroxidasa. Además, en presencia de metales de transición no reducidos, como los iones ferroso y cuproso, el H_2O_2 puede ser convertido, mediante la reacción de Fenton, en el radical hidroxilo que es altamente reactivo (Dröge, 2002). (Fig. 5)

Otros procesos metabólicos también producen ERO como un subproducto, como sucede durante la oxidación de los ácidos grasos en los peroxisomas. En este caso, los electrones de alto potencial generados durante la oxidación se transfieren al oxígeno y se produce peróxido de hidrógeno mediante una reacción catalizada por la acetil-CoA oxidasa. La β -oxidación de los ácidos grasos es catalizada por la enzima citocromo P450, la cual también produce ERO (Fig. 5). La xantina deshidrogenasa es una flavoproteína citosólica con cuatro centros Fe-S y un átomo de Mb que cataboliza la xantina en hipoxantina y luego en ácido úrico, durante la degradación de las purinas (Lehninger et al., 2000). En algunas ocasiones, se pueden producir modificaciones en la proteína que la convierten en una oxidasa que puede formar superóxido a partir del O_2 (Enroth et al., 2000). Otra condición que genera ERO ocurre en el retículo endoplásmico durante el plegamiento de proteínas catalizado por la enzima sulfidril-oxidasa. (Fig. 5)

En mamíferos se han identificado diversas oxidorreductasas que llevan a la producción de ERO como un subproducto de sus actividades. Éstas incluyen a la

ciclooxigenasa, la lipooxigenasa, la óxido nítrico sintasa, la xantina oxidasa y la ubiquinona, entre otras. Finalmente, la NOX es un complejo fundamental en la producción de ERO, la cual, a diferencia de las otras fuentes mencionadas, que generan ERO como subproductos, tiene como función primaria la producción de ERO (Covarrubias y cols., 2008; Hernández-García y cols; Halliwell, 1991). (Fig. 5)

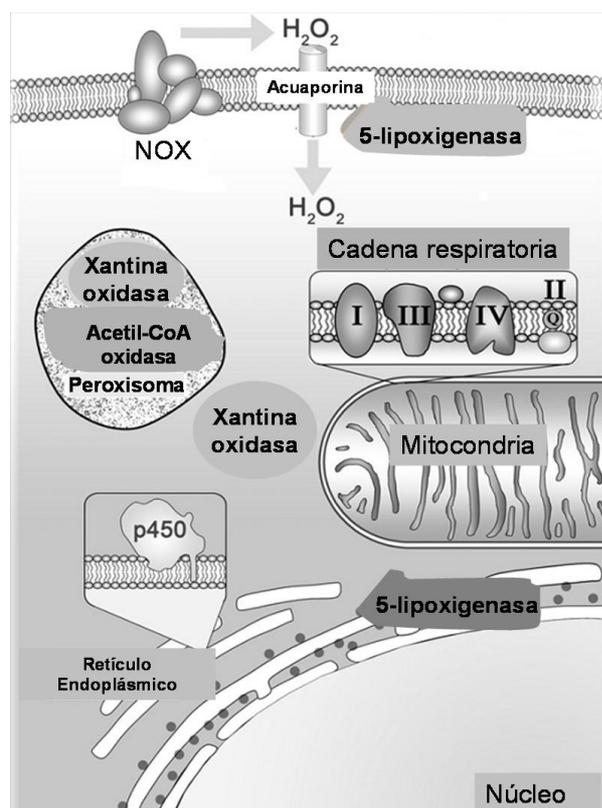


Figura 5. Fuentes de ERO en la célula. La cadena respiratoria en la mitocondria es una de las fuentes responsables de la generación de ERO producidas en aerobiosis. Otras fuentes de ERO como producto secundario, incluyen a la degradación de los ácidos grasos de cadena larga, el catabolismo de las purinas mediado por la xantina oxidasa peroxisomal o citosólica, la síntesis de leucotrienos mediada por la 5-lipoxigenasa y la activación del citocromo P450, entre otros. La NOX se localiza en membranas y su función primaria es la producción de ERO. Las ERO producidas por la NOX pueden salir de la célula, y en el caso del peróxido de hidrógeno éste puede ingresar a las células a través de acuaporinas. (Modificada de Covarrubias et al., 2008).

Los sistemas biológicos han desarrollado mecanismos enzimáticos y no enzimáticos para la degradación de especies reactivas como lo es la enzima superóxido dismutasa (SOD) que dismuta el superóxido a H₂O₂, las catalasas que convierten el H₂O₂ en H₂O y O₂, las peroxidasas catalizan la reducción de H₂O₂ empleando una amplia gama de compuestos orgánicos e inorgánicos. El sistema de peroxidasas dependientes del glutatión y de la tioredoxina contiene con el H₂O₂ los hidroperóxidos, los lipoperóxidos,

etc. El factor de transcripción nuclear Nrf2 es un regulador de la expresión de enzimas antioxidantes (Joshi y Jhonson, 2012). Otros antioxidantes no enzimáticos son el glutatión, los quelantes de metales de transición, el ácido lipóico, la melatonina, el ascorbato, los β -carotenos, el α -tocoferol, el urato, etc. (Halliwell y Gutteridge, 2010) (Fig. 6).

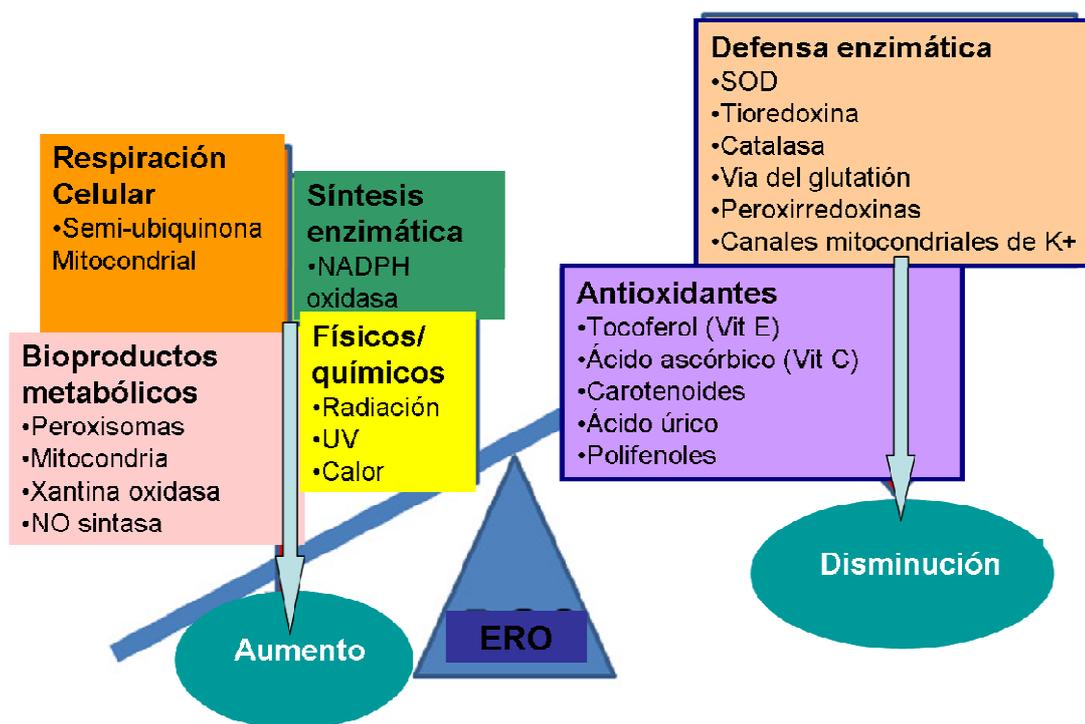


Figura 6. Relación entre producción y eliminación de ERO. Diversos factores intervienen para el aumento y la disminución de las ERO.

NADPH oxidasa (NOX)

La NOX es un complejo enzimático que se identificó y caracterizó inicialmente en neutrófilos y macrófagos. El complejo está formado por un componente membranal y otro citosólico. El primero está constituido por las subunidades p22phox y gp91phox (NOX2) y es conocido también como el citocromo b558 y representa la parte catalítica del complejo. El componente citosólico está formado por tres subunidades citosólicas, p40phox, p47phox, p67phox, las cuales regulan la actividad del complejo catalítico junto con la GTPasa Rac (Figs. 7,8). La subunidad catalítica NOX2 es un flavocitocromo altamente glicosilado de 570 aminoácidos que contiene dos grupos hemo no idénticos, coordinados por dos pares de residuos de histidina (Lambeth, 2004; Babior, 2004; Leto y cols. 2009).

Una vez activa, la NOX cataliza la reducción de una molécula de oxígeno para producir anión superóxido utilizando NADPH como sustrato. El proceso se inicia cuando, después de recibir una señal de activación, la subunidad p47phox es fosforilada en múltiples serinas a través de una cinasa, que puede ser algún miembro de la familia de PKC, ERK1/2, p38 MAPK, Pak1 y Akt. La fosforilación de la p47phox induce su translocación, junto con el complejo p40phox / p67phox, a la membrana plasmática, por lo que se considera que p47phox es una “subunidad organizadora”. Una serie de fosforilaciones posteriores permiten a esta subunidad interactuar con p22phox y NOX2 mediante cambios conformacionales que reducen el estado de auto inhibición y exponen sus dominios SH3, los cuales se unen a las regiones ricas en prolina (PRR) presentes en p22phox. Por su parte, p67phox, a través de su dominio SH3 del C-terminal, se asocia con la PRR de p47phox. La interacción de p67phox con NOX2 es fundamental para la activación de la NOX. Después de la señal de activación, la subunidad p40phox se fosforila y se desplaza a la membrana junto con el complejo p47phox-p67phox a través de sus dominios Phox/Bem1p (PB1). Se sabe que p40phox aumenta la interacción de estas subunidades reguladoras con el complejo ensamblado, ayudando a su anclaje a la membrana. Finalmente y de manera independiente de p47phox y p67phox, ocurre una translocación de Rac a la membrana. El GTP determina la interacción de Rac con la región N-terminal de p67phox. Así, la asociación de las subunidades citosólicas con las de la membrana conduce a la activación de la enzima (Fig. 8).

Además de los dos grupos hemo presentes en la región transmembranal N-terminal, la subunidad catalítica también contiene un sitio de unión a NADPH y otro a FAD en la región citosólica C-terminal, lo que constituye un aparato eficiente para el transporte de electrones del citoplasma al exterior de la célula. Una vez ensambladas las subunidades citoplásmicas y membranales, los electrones fluyen del NADPH unido a NOX hacia el FAD y, mediante los dos grupos hemos orientados perpendicularmente a la superficie de la membrana formando un conducto, los electrones pasan a través de la membrana para reducir el oxígeno molecular y formar anión superóxido (Fig. 8) (Lambeth, 2004; Leto y cols. 2009). En un primer paso, los electrones son transferidos al FAD en un proceso regulado por p67phox y generándose NADP y FADH₂; en un segundo paso, un electrón es transferido de FADH₂ al grupo hemo interno. Para poder recibir un segundo electrón del recién formado FADH, el hemo interno pasa el electrón al hemo externo. Para crear una fuerza energéticamente favorable es necesario que el O₂ esté unido al hemo externo, donde el oxígeno recibe el electrón, formando anión superóxido en el borde

externo de la membrana. Así, una molécula de NADPH produce dos iones superóxido mediante una transferencia gradual de dos electrones a dos moléculas de oxígeno (Fig. 8) (Leto y cols. 2009, Bokoch y cols 2009, Lambeth, 2000; Cheng y cols, 2001).

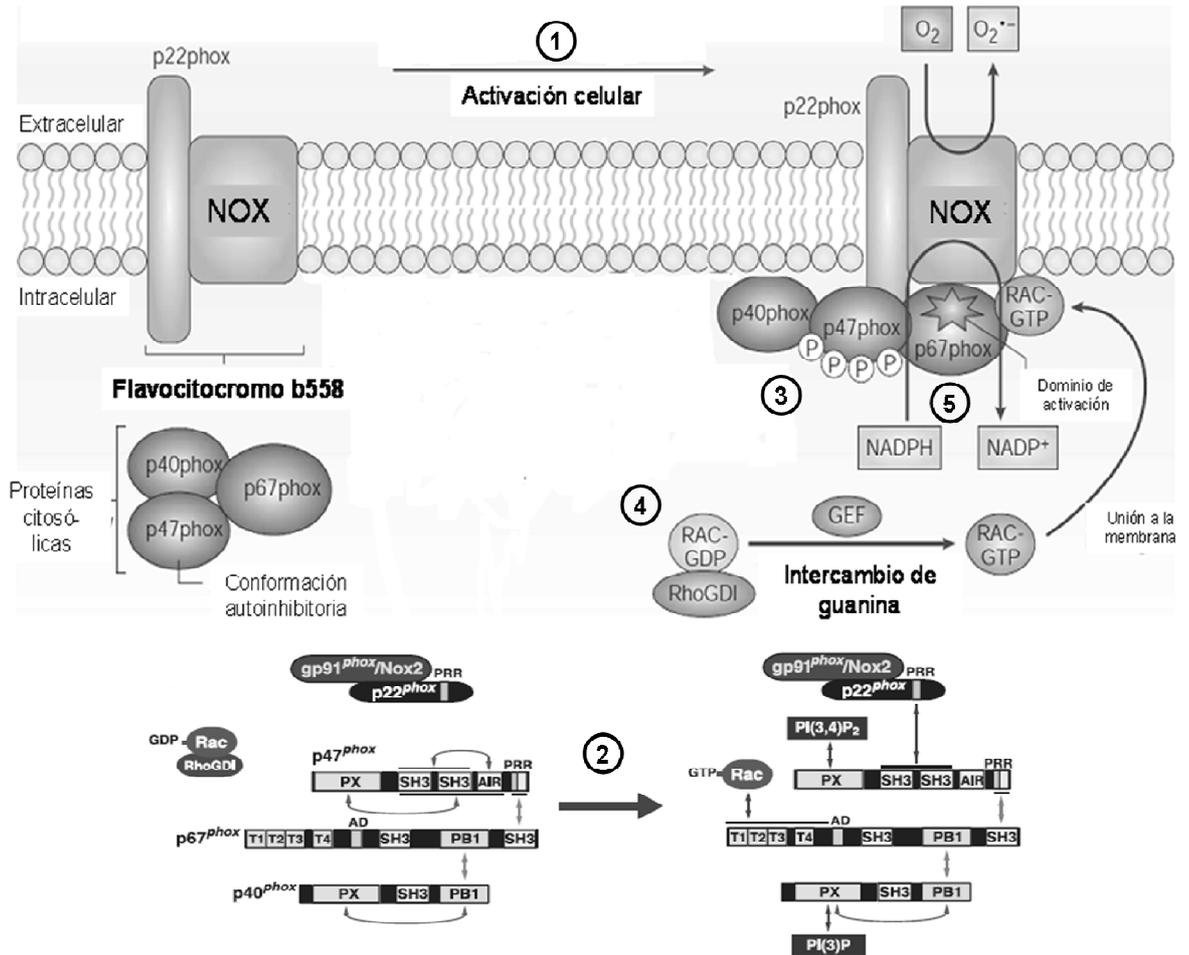


Figura 7. Mecanismo de activación de la NOX2 en macrófagos. 1) La célula recibe una señal de activación que induce la activación de vías de señalización que llevan a la activación de cinasas. 2) La subunidad p47phox se fosforila por cinasas que catalizan varias fosforilaciones de la región autoinhibidora (AIR) de p47phox, liberando su dominio bis-SRC-homología 3 (SH3), que permite enlazar a p22phox. También se favorece la exposición del dominio homología Phox (PX) de p47phox que permite su unión a fosfolípidos de la membrana. Por su parte, p67phox, a través de su dominio SH3 del C-terminal, se asocia a la PRR de p47phox. La subunidad p40phox se fosforila y se desplaza a la membrana junto con el complejo p47phox-p67phox a través de sus dominios Phox/Bem1p (PB1). 3) El complejo de las proteínas citosólicas reguladoras (p40phox/p47phox/p67phox) se translocan al flavocitocromo b558 (NOX2 y p22phox). La interacción de p67phox con NOX2 es fundamental debido a que p67phox contiene dos dominios SH3 necesarios para la activación de la NOX. 4) Por otro lado, las proteínas intercambiadoras de nucleótidos activan a la GTPasa Rac. La unión de GTP promueve cambios conformacionales en RAC que favorece la disociación de RhoGDI y su asociación a la membrana. El cambio conformacional también promueve la unión de RAC al tricodécapéptido (TPR) de p67phox, ayudando al ensamblaje de la enzima y coadyuvando su activación. 5) Una vez formado este complejo, los electrones fluyen del NADPH hacia el FAD de donde se transfieren a los grupos hemo de la subunidad catalítica NOX2 hasta llegar al aceptor final que es el O₂, y cuya reducción conduce a la formación del anión superóxido (Modificada de Sumimoto, 2008).

Además de los dos grupos hemo presentes en la región transmembranal N-terminal, la subunidad catalítica también contiene un sitio de unión a NADPH y otro a FAD en la región citosólica C-terminal, lo que constituye un aparato eficiente para el transporte de electrones del citoplasma al exterior de la célula. Una vez ensambladas las subunidades citoplásmicas y membranales, los electrones fluyen del NADPH unido a NOX hacia el FAD y, mediante los dos grupos hemo que están orientados perpendicularmente a la superficie de la membrana proporcionando un conducto, los electrones pasan a través de la membrana para reducir el oxígeno molecular y formar anión superóxido (Fig. 8) (Lambeth, 2004; Leto y cols. 2009). En un primer paso, los electrones son transferidos al FAD en un proceso regulado por p67phox y generándose NADP y FADH₂; en un segundo paso, un electrón es transferido de FADH₂ al hierro del grupo hemo interno. Para poder recibir un segundo electrón del recién formado FADH, el hemo interno debe pasar el electrón al hemo externo. Para crear una fuerza energéticamente favorable es necesario que el O₂ esté unido al hemo externo, donde el oxígeno recibe el electrón, formando anión superóxido en el borde externo de la membrana. Así, una molécula de NADPH produce dos iones superóxido mediante una transferencia gradual de dos electrones a dos moléculas de oxígeno (Fig. 8) (Leto y cols. 2009, Bokoch y cols 2009, Lambeth, 2000; Cheng y cols, 2001).

Durante la última década se ha demostrado la presencia de NOX en células no fagocíticas. Hasta el momento se han encontrado siete homólogos de la unidad catalítica NOX (NOX1, 2, 3, 4, 5, y DUOX1 y 2), un homólogo de la subunidad p47phox (NOXO1) y uno de p67phox (NOXA1) (Bokoch y Knaus, 2000; Geiszt, 2006; Bedard y Krause, 2007; Li y Shah, 2003). Además, la dependencia de las subunidades citosólicas para generar ERO también varía entre los diferentes miembros de NOX (Fig. 10) (Lambeth y cols, 2000). Las DUOXs son conocidas también como “oxidases duales” ya que contienen la estructura típica del citocromo b558 y un dominio homólogo a las peroxidasa, tales como la mieloperoxidasa y la lactoperoxidasa, que le confiere la propiedad de producir H₂O₂ a partir de anión superóxido producido. Además, las DUOXs tienen dos dominios EF de unión a calcio en el extremo N-terminal. Dado que carecen de las subunidades reguladoras citoplásmicas, estos complejos regulan su activación por calcio a través de del dominio EF mencionado (Leto y cols, 2009, Bokoch, 2009).

Se ha encontrado que NOX1, NOX3, NOX4 y NOX5 están estructuralmente muy relacionadas con NOX2 (Bokoch y Knaus, 2000; Geiszt, 2006), pero funcionalmente tienen ciertas diferencias que incluye: (i) la NOX de células no fagocíticas parece generar

bajos niveles de superóxido, incluso en células no estimuladas; (ii) aunque su actividad puede estar desregulada en algunas condiciones patológicas, la producción de superóxido es mucho menor que la generada por la NOX de neutrófilos activados; (iii) una proporción importante del superóxido que se genera es intracelular, mientras que en los neutrófilos activados el O_2^- se genera en el compartimento extracelular (Brown y Griending, 2009).

Otra diferencia entre los miembros de la familia NOX es la distribución subcelular. NOX1 se ha identificado en caveolas de la membrana plasmática, mientras que NOX2 se encuentra en fagosomas y en los lamelipodios de los conos de crecimiento. Tanto NOX1 como NOX2 se han localizado en "redoxisomas", endosomas responsables de la señalización temprana mediada por receptor en células no fagocíticas. Por otro lado, la NOX3 se ha identificado preferentemente en la membrana plasmática, mientras que NOX4 ha sido identificada en adhesiones focales, núcleo y retículo endoplásmico, donde interactúa con cinasas y fosfatasas distintas a las que se encuentran en la caveola y en los endosomas. Finalmente, NOX5 se ha encontrado en las membranas internas, mientras que DUOX1 / 2 se encuentran básicamente en la membrana plasmática (Sumimoto, 2008).

Los mecanismos de activación de las NOX 1, 2 y 3 son similares que, como se mencionó anteriormente, implican la formación de un complejo conteniendo la subunidad membranal catalítica y las reguladoras citosólicas. La regulación de NOX4 es poco conocida, pero se sabe que en diversos tipos celulares tiene una actividad constitutiva. Su expresión es ubicua, lo que coincide con el hecho de que su secuencia génica posee múltiples bases GC en la región promotora, características de los genes de expresión constitutiva. Por otro lado, también se ha demostrado que la expresión de NOX4 puede ser inducida por algunos factores. Finalmente, la NOX5 y las DUOX1/2 carecen de las subunidades reguladoras y su activación está regulada por Ca^{2+} citosólico (Leto y cols, 2009; Bokoch y Knaus, 2009; Sumimoto, 2008; Katsuyama, 2012). Los genes que codifican para las subunidades NOX solo existen en eucariontes y son evolutivamente antiguos. (Fig.9)

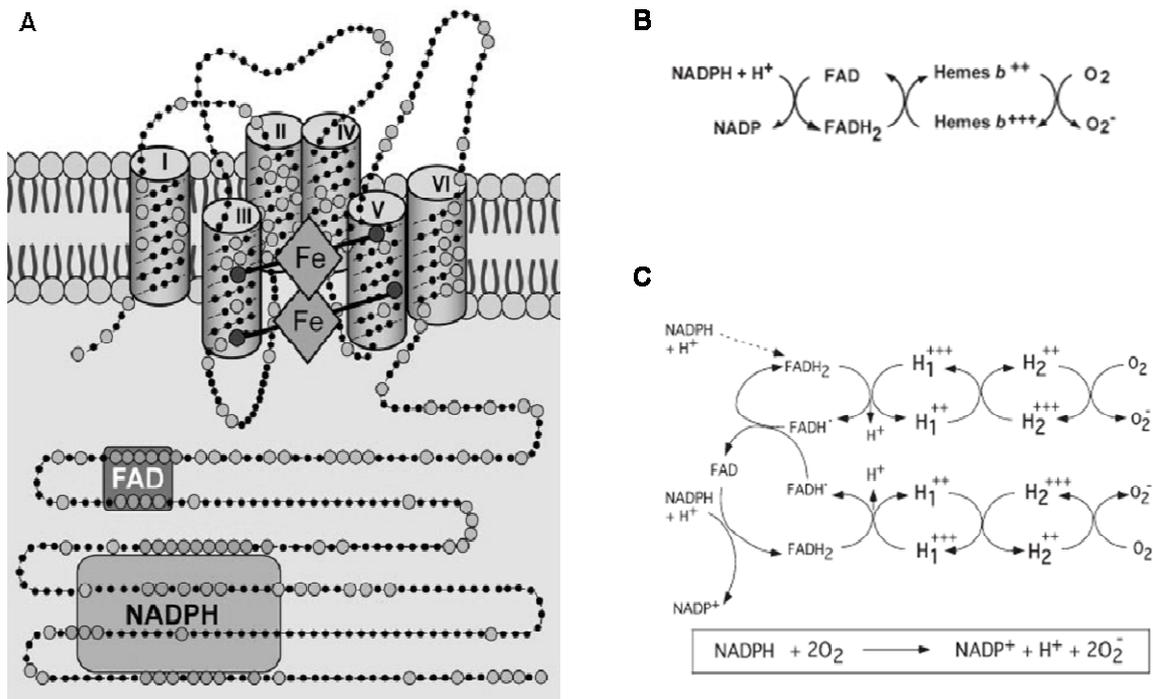


Figura 8. Mecanismo de producción de ERO por NOX. A) La subunidad catalítica de la NOX contiene sitios de unión a NADPH y FAD, así como dos grupos hemo que están orientados perpendicularmente a la superficie de la membrana, proporcionando un conducto para que los electrones puedan fluir. B) La estructura de esta subunidad catalítica permite, en un primer paso regulado por p67phox, que los electrones sean transferidos al FAD y así generar NADP y FADH₂; en un segundo paso, un electrón es transferido de FADH₂ al hierro del grupo hemo interno. Para poder recibir un segundo electrón del recién formado FADH, el hemo interno debe pasar el electrón al hemo externo. Para crear una fuerza energéticamente favorable es necesario que el O₂ esté unido al hemo externo, donde el oxígeno recibe el electrón, formando anión superóxido en el borde externo de la membrana. Así, una molécula de NADPH produce dos iones superóxido mediante una transferencia gradual de dos electrones a dos moléculas de oxígeno. C) De acuerdo a un modelo teórico es necesario un dímero de la NOX y una molécula de NADPH para transferir los electrones a dos moléculas de oxígeno molecular a través de los centros redox de la subunidad catalítica: 1) Por cada dímero se reducen un par de grupos hemo externo (H1) y un par de grupos hemo externo (H2) por acción de un par de FAD (el cual se cicla entre la semiquinona FADH• y el FADH₂) resultando en dos semiquinonas FADH• y un FADH₂. El recién creado FAD es, a su vez, totalmente reducido a FADH₂ por una NADPH + H⁺. Los dos FADH₂ generados son reintroducidos en un nuevo ciclo y para iniciar el ciclo de transporte de electrones se requiere solo un NADPH. En este estado el sitio de unión a NADPH es transitoriamente enmascarado y no funcional en una de las dos cadenas de la subunidad catalítica. Así, una molécula de NADPH produce dos iones superóxido mediante una transferencia gradual de dos electrones a dos moléculas de oxígeno (Modificado de Bedard, et al., 2007 y Vignais, 2002).

Diversos estudios han sugerido que las ERO generadas por las NOX podrían tener un papel fisiológico a través de la modulación de múltiples vías de señalización intracelular sensibles al estado redox de la célula, incluyendo la inhibición de fosfatasa de tirosina, la activación de factores de transcripción y la modulación de la actividad de algunos canales iónicos (Bedard y Krause, 2007). Comparado con otros sistemas de señalización, se propone que la NOX tiene una amplia heterogeneidad en sus procesos de activación. Se ha observado que la NOX se puede activar por factores químicos,

físicos, ambientales y biológicos. Algunos de estos estímulos pueden incrementar la función de la NOX aumentando su expresión génica, mientras que otros pueden también activar directa o indirecta el sistema enzimático sin modificar su transcripción. Algunas moléculas como la angiotensina II (Ang II), la trombina, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) producen alteraciones en la actividad o en la expresión de las NOX y en última instancia, en la cantidad de ERO producidos (Li y Shah 2003, Sumimoto, 2008; Sorce y Krause, 2009).

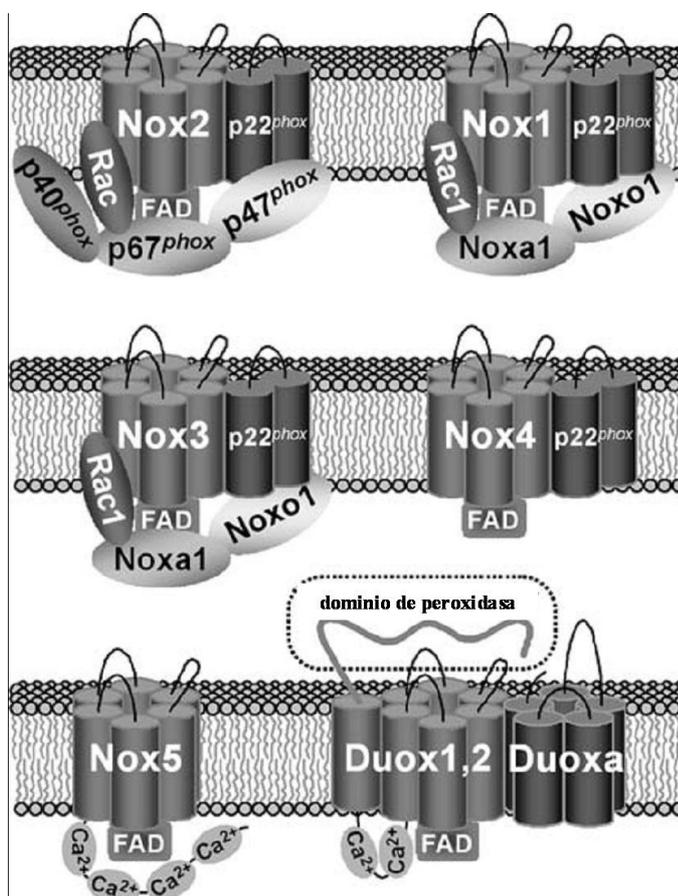


Figura 9. Homólogos de la NOX. Se han identificado 7 homólogos, de los cuales la NOX1, NOX2 y NOX3 requieren de proteínas citosólicas adaptadoras, conocidas como "organizadoras" (p47phox o Noxo1 y p40phox) y "activadoras" (p67phox o Noxa1). También requieren para su activación de la GTP-Rac. La subunidad p22phox forma un complejo heterodimérico estable con las NOX 1-4, favoreciendo la unión de la enzima a la membrana plasmática y proporcionando un sitio de unión para las subunidades organizadoras. La NOX5 y las DUOX son sensibles al calcio debido a que poseen dominios EF de unión a calcio. Las proteínas "activadoras" de DUOX (Duoxa) forman complejos estables con éstas en la membrana plasmática. Las DUOX contienen un dominio de peroxidasa que produce peróxido de hidrógeno a partir del anión superóxido producido previamente. (Modificada de Lambeth, 2004).

Papel fisiológico de las ERO producidas por las NOX

Las NOX regulan muchos procesos fisiológicos fundamentales, como el crecimiento celular, la diferenciación, la apoptosis y la remodelación del citoesqueleto. Además, participan en otros procesos especializadas como la defensa del huésped, el control del tono vascular, la formación de la otoconia en el oído interno y la yodación de la hormona tiroidea, entre otros (Lambeth y cols. 2000; Li y Shah 2003; Lambeth, 2004; Sumimoto, 2008; Leto y cols, 2009; Sorce y Krause, 2009). Se ha encontrado que los distintos homólogos de la NOX participan en procesos diferentes y en distintos tipos celulares.

NOX1

La NOX1, también conocida como Mox1, fue el primer homólogo de NOX2 que se identificó. Es una proteína 56% idéntica a NOX2 (Geiszt, 2006; Bedard y Krause, 2007; Bokoch y Knaus, 2009). Este complejo se expresa marcadamente en el epitelio del colon, donde su papel fisiológico es controversial, habiéndose propuesto que puede participar en la defensa inmune y en la proliferación celular (Sorce y Krause, 2009). La NOX1 también se expresa en células endoteliales, en el útero, en la placenta, en la próstata, en los osteoclastos y en la retina. También se ha demostrado que está presente en las células del músculo liso vascular, donde regula su crecimiento y migración. Por ejemplo, en células del músculo liso del ratón deficiente de NOX1, la migración se altera en respuesta al PDGF o al factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). También se ha propuesto que NOX1 podría ser importante en la regulación de la presión arterial (Lambeth y cols. 2000, Sumimoto, 2008; Leto y cols, 2009; Sorce y Krause, 2009).

NOX1 también se encuentra presente en las células del sistema nervioso central (SNC). Los ratones deficientes de NOX1 presentan una reducción en la sensibilidad al dolor que acompaña a la inflamación (hiperalgesia) mediada por la activación del canal TRPV1. En la microglía se ha sugerido que tiene un papel en la defensa del SNC, mientras que en las neuronas se ha implicado en el crecimiento de las neuritas (Lambeth y cols. 2000; Sumimoto, 2008; Leto y cols, 2009, Sorce y Krause, 2009).

Más recientemente se ha asociado NOX1 a procesos relacionados con cáncer a través de su participación en el control del ciclo celular, en particular de la ciclina D1. La sobreexpresión de NOX1 en células epiteliales de pulmón induce un incremento en la expresión de la ciclina D1 y aumenta la proliferación (Sumimoto, 2008). Por otro lado, en estudios de cáncer de colon humano se demostró una correlación entre las mutaciones de

Ras y NOX1 sobreexpresado. Se ha propuesto que el oncogén Ras activa y regula a NOX1, lo cual es necesario para sus propiedades oncogénicas (Sumimoto, 2008, Sorce y Krause, 2009).

NOX2

Se sabe que NOX2 es esencial en la defensa innata del huésped. Aunque NOX2 está más expresado en los fagocitos, también se ha detectado en el SNC, endotelio, en las células del músculo liso vascular, fibroblastos, cardiomiocitos, músculo esquelético, hepatocitos y en las células madre hematopoyéticas. Las personas que carecen de NOX2 o con mutaciones en otros componentes del complejo enzimático padecen granulomatosis crónica (GC) y son altamente susceptibles a sufrir infecciones debido a una alteración en la actividad de los neutrófilos. Además, los ratones deficientes en NOX2 desarrollan artritis espontáneamente y la gravedad se incrementa proporcionalmente con la edad (Lambeth y cols., 2000; Lambeth, 2004; Covarrubias y cols., 2008; Sumimoto, 2008; Bokoch y Knaus, 2009; Leto y cols., 2009; Sorce y Krause, 2009).

Los datos sobre el posible papel de NOX2 en funciones del SNC se derivan de los estudios en pacientes con GC y ratones GC. Entre los pacientes con GC aumenta la tasa de prevalencia de déficit cognitivo, lo que coincide con los ratones deficientes en p47phox, los cuales muestran problemas de memoria. Por lo tanto, es probable que NOX2 juegue un papel importante en las funciones cognitivas. En apoyo de esta hipótesis, se sabe que las ERO son importantes en la señalización implicada en los mecanismos subyacentes a la plasticidad sináptica y a la formación de la memoria (Sumimoto, 2008, Sorce y Krause, 2009).

NOX3

Este homólogo muestra una similitud de 55% con NOX2. Se expresa principalmente en el oído interno y, en menor grado, en el bazo, riñón y pulmón. También se expresa de manera marcada en el cerebro de fetos de murino, pero sus niveles prácticamente desaparecen en el tejido adulto, lo que puede indicar que NOX3 desempeña un papel importante en el desarrollo. Se ha encontrado que diferentes mutaciones en NOX3 llevan a defectos en el sistema vestibular en ratones. Estos ratones mutantes presentan trastornos motores, de coordinación, orientación y comportamiento. Esto pone en evidencia el grado de especialización de NOX3 y la importancia en procesos fisiológicos del sistema nervioso. También se ha demostrado que la NOX3 tiene una

importancia funcional en las células endoteliales del pulmón. En ratones donde incrementa la actividad de NOX3 se desarrolla enfisema, sin que hasta el momento se conozca el mecanismo involucrado. Otra línea de estudio ha demostrado un nuevo papel de NOX3 en la resistencia a la insulina, en este experimento se utilizó un modelo de ratones diabéticos y se observó que ocurre un incremento en la expresión de NOX3 (Bedard y Krause, 2007; Sumimoto, 2008, Sorce y Krause, 2009).

NOX4

La NOX4 es una proteína de 758 aminoácidos y 39% de identidad con NOX2 y constituye el homólogo de mayor expresión en comparación con otros homólogos de NOX después de la NOX2. En el riñón se le ha asociado a la expresión de genes dependientes de oxígeno. La NOX4 también se ha implicado en otros procesos fisiológicos, incluyendo la senescencia celular, la apoptosis, la supervivencia, la señalización de la insulina, la migración y la diferenciación.

También se ha demostrado que NOX4 es responsable de la producción de O_2^- en osteoclastos, participando en el proceso de reabsorción ósea. Recientemente se encontró que NOX4 se expresa abundantemente en adipocitos. Este homólogo también se ha encontrado en las células musculares lisas, en las células endoteliales, en los fibroblastos, en los queratinocitos, en las neuronas y en los hepatocitos (Lambeth y cols. 2000, Li y Shah, 2003; Bedard y Krause 2007; Sumimoto, 2008; Sorce y Krause, 2009,).

En células del músculo liso vascular (VSMCs) el IGF-I induce migración mediada por NOX4, por un mecanismo desconocido. NOX4 regula el crecimiento y la supervivencia en VSMCs tratadas con el activador del plasminógeno urocinasa o el TGF- β . Los estudios realizados con VSMCs, fibroblastos, adipocitos, y células madre embrionarias muestran que la producción de ERO por NOX4 promueve la diferenciación (Sumimoto, 2008, Sorce y Krause, 2009)

NOX5

NOX5 es un homólogo distante de la familia NOX que presenta solamente un 27% de identidad con NOX2. Está compuesta por 737 aminoácidos y contiene una extensión en el amino terminal con cuatro sitios de unión a calcio: tres dominios EF y un cuarto sitio atípico (Katsuyama y cols., 2012). NOX5 se expresa en las células endoteliales, en el bazo, en el útero, en órganos linfoides y en los testículos (Lambeth y cols. 2000, Sorce y Krause, 2009). En líneas celulares transfectadas con NOX5 se encontró que la

generación de superóxido es dependiente de calcio y que esta enzima también es capaz de actuar como canal de protones. El calcio produce un cambio conformacional en NOX5 a través de una interacción intramolecular que activa a la proteína. Varios autores han propuesto que NOX5 juega un papel en la proliferación celular. Por ejemplo, en VSMCs humanas la proliferación inducida por PDGF está mediada por NOX5. Esto coincide con el hecho de que NOX5 se expresa en varias líneas celulares de cáncer. En este sentido, se ha implicado a NOX5 en la regulación del cáncer de próstata y en el adenocarcinoma de esófago de Barrett. Se ha propuesto que el factor activador de plaquetas (PAF) induce la expresión de NOX5 en estas células. En este contexto, se ha sugerido que la NOX5 está implicada en la malignidad de las células malignas maduras, ya que este complejo no se expresa en las células B normales (Lambeth y cols. 2000; Sumimoto, 2008, Sorce y Krause, 2009). El gen de NOX5 está ausente en los roedores, por lo cual los estudios con genes interrumpidos no son factibles y es poco lo que se conoce sobre la NOX5 en su papel fisiológico (Lambeth y cols. 2000).

DUOX1/DUOX2

Se considera que las DUOX tienen una naturaleza dual debido a su dominio extracelular de peroxidasa y a un dominio similar a NOX2, responsable de la producción de anión superóxido. Como se mencionó, las DUOX se regulan por calcio a través de un dominio EF de unión a Ca^{2+} (Bokoch y cols., 2009; Leto y cols, 2009; Katsuyama y cols., 2012). Estos complejos se expresan en el epitelio de los tejidos de las mucosas de las vías respiratorias y del aparato digestivo y urogenital. También están presentes en glándulas endócrinas y exócrinas como la tiroides, las glándulas salivales, el páncreas, y la próstata. Las DUOX fueron aisladas originalmente en los tirocitos de la tiroides y se asociaron a la producción de H_2O_2 utilizado para la oxidación del yoduro durante la síntesis de la hormona tiroidea. En el pulmón y las glándulas salivales, las DUOX proveen de H_2O_2 a la lactoperoxidasa que convierte los aniones tiocianato en el oxidante hipotiocianato con función microbicida, lo que le confiere un papel esencial en la defensa del huésped. Las DUOX requieren de factores llamados DUOXA, los cuales son proteínas transmembranales esenciales para su actividad. Las mutaciones en el gen de DUOXA2 producen hipotiroidismo congénito.

Particularmente, DUOX2 está vinculada a casos de hipotiroidismo congénito, se cree que es la principal responsable de la síntesis de la hormona tiroidea. Por otro lado, la

DUOX2 es inducible en el colon y en la glándula salival y tiene un papel muy importante en la defensa del huésped en este tejido (Lambeth y cols. 2000; Leto y cols, 2009).

ANTECEDENTES

Durante periodos críticos del desarrollo, las NGC está sujetas a diferentes procesos como migración neuronal, sinaptogénesis, muerte neuronal y diferenciación morfológica y bioquímica. El empleo de sistemas *in vitro*, particularmente de cultivos primarios de NGC, han permitido estudiar con cierto detalle estos mecanismos básicos que ocurren en las neuronas en su desarrollo. Esta preparación refleja en gran medida los fenómenos que ocurren durante el desarrollo *in vivo*. Los cultivos de células neuronales constituyen una preparación aislada y homogénea en la que se puede seguir con exactitud el grado de maduración celular y permite el control farmacológico de algunos eventos fisiológicos como la actividad sináptica neuronal.

Las NGC migran en cultivo y son capaces de diferenciarse y madurar bioquímicamente en respuesta a condiciones tróficas. Se ha propuesto que el KCl mimetiza las influencias tróficas ejercidas *in vivo* por las fibras musgosas de tipo excitador, particularmente glutamatérgicas. Así, se ha demostrado que las NGC cultivadas crónicamente en presencia de concentraciones despolarizantes de KCl (25 mM; K25) o bien de un agonista natural de los receptores glutamatérgicos, NMDA, experimentar una maduración bioquímica, similar a la observada *in vivo* (Moran y Patel, 1989^a, 1989^b, Moran et al., 1999).

Las NGC también tienen una dependencia del KCl y la activación del receptor de glutamato para sobrevivir. Las NGC deben ser cultivadas crónicamente en un medio con KCl 25mM o en presencia de NMDA para que éstas sobrevivan por más de 10-14 DIV. Por otro lado, cuando estas células son transferidas de estas condiciones a un medio idéntico, pero sin NMDA y con KCl 5 mM (K5) las neuronas mueren después de 24-48h. Bajo estas condiciones, las células mueren con características apoptóticas (Morán et al, 1999^a).

Uno de los eventos temprano relacionado con el proceso de muerte de NGC es la producción de ERO alrededor de cuatro horas después de iniciado el estímulo apoptótico. Se ha sugerido que en este modelo la generación de ERO puede funcionar como una señal temprana en el proceso de muerte apoptótica (Valencia y Morán, 2001; Valencia y Morán, 2004). En estos estudios se ha sugerido que el origen de las ERO participantes en la muerte apoptótica de las NGC podría ser el complejo enzimático membranal NADPH-

oxidasa (Coyoy et al; 2008). Esta sugerencia se refuerza por un estudio previo en el que se demostró la presencia de NADPH-oxidasa en neuronas periféricas en cultivo y se asoció a la muerte neuronal apoptótica inducida por la privación del factor del crecimiento nervioso (Tamariello et al, 2000).

En el sistema nervioso, se ha encontrado a la NADPH oxidasa en neuronas hipocampales (Tejeda-Simon et al., 2005), donde se ha propuesto que tiene múltiples funciones en procesos de señalización neuronal (Knapp y Klann, 2002; Thiels et al., 2000). Estudios en diferentes laboratorios han sugerido que las ERO pueden actuar como mensajeros celulares modulando la actividad de proteínas cinasas tal como PKC, MEK/ERK, PTK en cascadas de señalización (Klann y Thiels, 1999). Se ha demostrado que la diferenciación neuronal inducida por NGF involucra la producción de ERO vía NADPH oxidasa (Suzukawa et al., 2000). La NADPH oxidasa también es requerida para la potenciación hipocampal a largo plazo y la memoria dependiente del hipocampo (Knapp y Klann, 2002; Thiel et al., 2000).

En un estudio previo de nuestro grupo en NGC cultivadas encontramos que tanto la muerte como los parámetros de apoptosis inducidos por K5 se inhiben por bloqueadores de la NADPH oxidasa. Estas condiciones apoptóticas inducen la actividad de una NADPH oxidasa. Además, en estas mismas células detectamos, por ensayos de tipo Western blot, la presencia de las 5 subunidades de la NADPH oxidasa (NOX2) y, mediante ensayos de RT-PCR, la presencia de NOX2, p22phox, p67phox, p47phox y p40phox, NOX1 y NOX 4.

De acuerdo a lo anterior se sabe que las NGC del cerebelo expresan los homólogos de la NOX así como sus subunidades, además las ERO generadas por la NOX tienen un papel crítico en diversos procesos que ocurren en el desarrollo como la proliferación, migración, maduración y muerte celular. Sin embargo, se desconoce si durante el desarrollo del cerebelo, las especies reactivas juegan un papel determinante en este proceso y si éstas son generadas por una NOX. Por esta razón, en este estudio se pretende estudiar la expresión de los homólogos de la NOX y de sus subunidades in vitro e in vivo y la generación de ERO durante el desarrollo del cerebelo. Además, emplear antioxidantes e inhibidores de la NOX para determinar si las ERO producidas por la NOX tienen una participación en la migración celular in vitro e in vivo en la morfología del cerebelo, en la actividad motora de las ratas y en la muerte celular durante el desarrollo del cerebelo.

HIPÓTESIS

Durante el desarrollo del cerebelo las ERO generadas por una NOX están involucradas en eventos de migración y muerte celular. La inhibición de ERO y NOX durante el desarrollo afectará la organización estructural del cerebelo y la actividad motora dependiente del cerebelo de la rata.

OBJETIVO GENERAL

Conocer si las ERO están involucradas en eventos del desarrollo del cerebelo de la rata y determinar si estas ERO son producidas por una NOX en un modelo in vitro e in vivo de desarrollo.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la expresión de NOX1, NOX2, NOX4 y de algunas subunidades de la NOX en cerebelos de rata en desarrollo a los P4, P8, P12, P16 y P25.
- Detectar la generación de ERO en cerebelos de rata en desarrollo a P4, P8, P12, P16 y P25.
- Determinar si las ERO generadas en cerebelos de rata en desarrollo a los P4, P8, P12, P16 y P25 son producidas por una NOX.
- Observar el efecto de antioxidantes y de inhibidores de la NOX en la morfología del cerebelo.
- Determinar el efecto de antioxidantes y de inhibidores de la NOX en la actividad motora de las ratas de P25.
- Detectar la producción de ERO en cultivos de NGC de ratas de P0, P4, P8 y P12.
- Determinar la expresión de NOX1, NOX2, NOX4 en cultivos de NGC de ratas de P0, P4, P8 y P12.
- Detectar la producción de ERO en cultivos de NGC que favorecen la migración.
- Utilizar antioxidantes e inhibidores de la NOX y determinar el efecto de estas especies en la regulación de la migración en cultivos de NGC.

MATERIALES Y MÉTODOS

RT-PCR

Se realizó la extracción del RNA total de los cerebelos de rata en diferentes periodos del desarrollo (P4, P8, P12, P16 y P25) y de los cultivos de NGC de ratas de P0, P4, P8 y P12, utilizando la técnica del tiocianato de guanidina-fenol-cloroformo y precipitación con isopropanol (Chomczynski 1987).

1. En tubos nuevos y estériles, se homogenizaron 100 mg de tejido o se rasparon las cajas de 60mm con los CGN con 1 ml de TRIzol a 4°C.
2. Las muestras homogeneizadas se transfirieron a tubos eppendorf de 1.5 ml, se agregaron 200 µl de cloroformo por 1 ml de homogenado, los tubos se taparon y agitaron con vortex por 30 seg.
3. Se mantuvieron en hielo por 5 minutos y se centrifugaron a 15 000 rpm a 4°C por 15 minutos. Al final se obtuvieron dos fases: la inferior de color rojo compuesta por fenol:cloroformo y la porción superior acuosa incolora. El RNA quedó en esta última fase, mientras que el DNA y las proteínas se encontraron en la interfase y en la fase orgánica respectivamente.
4. La fase acuosa se transfirió a otro tubo eppendorf y se agregó un volumen equivalente de isopropanol. La muestra se mantuvo a 4°C durante toda la noche.
5. Las muestras se centrifugaron por 15 minutos a 15,000 rpm a 4°C y el RNA se encontró en una pastilla blanca amarillenta.
6. El sobrenadante se removió, el precipitado se lavó con etanol al 75% y se centrifugó a 7,500 rpm a 4°C durante 8 minutos.
7. El sobrenadante se removió y el precipitado se lavó nuevamente con etanol al 80%. Posteriormente se centrifugó a 7,500 rpm durante 8 minutos a 4°C.
8. El sobrenadante se removió y se colocaron los tubos boca abajo sobre una gasa estéril para evaporar el etanol.
9. Se disolvió la pastilla de RNA en 40 µl de H₂O-DEPC estéril.
10. Se hicieron diluciones 1:500 y se leyó la absorbancia de estas muestras a las siguientes longitudes de onda: 260 y 280 nm. Se determinó la concentración de RNA mediante la siguiente fórmula: µg/µL de RNA = 1 unidad de absorbancia a 260 nm X factor de dilución (500) x 40 / 1000.

Para determinar la integridad del RNA extraído, éste se analizó en geles de agarosa al 1% en condiciones desnaturizantes.

Solamente se utilizaron las muestras en las que el RNA estuviera íntegro, es decir donde se observaran claramente las bandas correspondientes a los RNAs ribosomales 18S y 28S y no se encontrara RNA degradado, ni presencia de DNA.

La técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha sido muy utilizada para estudiar la regulación de genes de baja expresión amplificándolos a partir de sus secuencias de RNA. Esta técnica requiere de la conversión del RNA total a DNA complementario (cDNA) por medio de un a Transcripción Reversa (RT) y amplificación del DNA complementario por PCR (RT-PCR) (Rappolee et. al. 1988, Kawasaki 1989).

Se realizó la transcripción reversa del RNA total. Para esto se preparó la siguiente mezcla para la reacción:

Reactivos	Concentración Final
RNA Total	4 µg (en un volumen de 10 µl)
Buffer RT (5X)	50 mM Tris-HCl pH=8.3 75 mM KCl 3 mM MgCl ₂
DTT (100 mM)	10 mM
dNTPs (10 mM)	0.5 mM de cada dNTP
RT ii Super Scrip	400 unidades
Oligo d-T	0.05 µg

La reacción se incubó en un termociclador Perkin Elmer Cetus Modelo 9600 a 38°C por una hora.

El perfil de los ciclos para amplificar los genes de NOX1, NOX2, NOX4, p22 phox fue el siguiente: Una etapa de desnaturalización a 95°C por 2 min; 30 ciclos de: 95°C, 30 s; 58 °C, 40 s; 72°C, 2 min. Un paso de extensión final fue realizado a 72°C por 5 min. En todos los experimentos se incluyeron controles negativos sin RNA y con RNA sin reacción de RT.

La secuencia de oligonucleótidos utilizada para amplificar los genes de NOX1, NOX2, NOX4, p22 phox, y GAPDH fue la siguiente:

GENES	SECUENCIAS
NOX1	Sentido 5'-[CCTTCTGGGAAACCTGCCTTTAG]-3' Antisentido 5'-[TGTTGGTCACACTGGATGATAAGC]-3'
NOX2	Sentido 5'-[TGGAGTGGTGTGTGAATGCCAGAG]-3' Antisentido 5'-[CGATGGTTTTGAAAGGGTGCG]-3'
NOX4	Sentido 5'-[AGCCAAGATTCTGAGATTCTGCC]-3' Antisentido 5'-[CCGAGGACGCCCAATAAAAAG]-3'
p22 phox	Sentido 5'-[CTTGGATGATAGCACTGCAC]-3' Antisentido 5'-[CTTCATCTGAAGCTCAATGG]-3'
GAPDH	Sentido 5'-[CCT GCA CCA CCA ACT GC]-3' Antisentido 5'-[CAA TCG CAG CCC CAG CA]-3'

Las condiciones de PCR utilizadas en todos los experimentos fueron las siguientes:

<i>Reactivos</i>	<i>Concentración Final</i>
Buffer PCR 10 X	20 mM Tris-HCl pH=8.4 50 mM KCl
MgCl ₂ (50 mM)	1.0 Mm
dNTPs (10 mM)	0.2 Mm
Oligo sentido	0.5 μ M
Oligo antisentido	0.5 μ M
Taq DNA polimerasa	2.5 unidades

Una vez que se realizó el RT-PCR, se llevó a cabo una electroforesis de los productos obtenidos. Se separaron 35 μ l de producto de RT-PCR con Amortiguador de carga 6X para DNA en un gel de agarosa al 2% preparado con TBE 1 X.

Los productos de amplificación se observaron en un transiluminador de rayos UV y se fotografiaron e imprimieron con una película Polaroid 665.

PCR en tiempo real

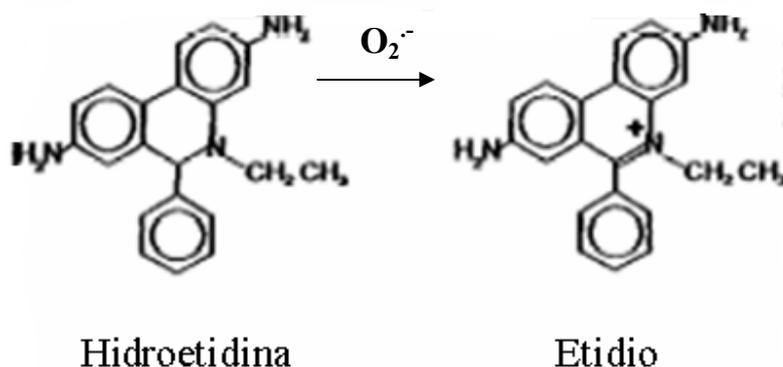
Un microgramo del ARN aislado se convirtió a cDNA utilizando M-MLV RT (Invitrogen, CA, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La expresión relativa del gen se cuantificó en un Applied Biosystems 7000 (Applied Biosystems, Reino Unido) usando Master Mix 2X TaqMan (Applied Biosystems, EE.UU.) y las sondas TaqMan para NOX1 Rn00586652_m1, NOX2 Rn00576710_m1, NOX4 Rn00585380_m1, Rn00577357_m1 p22phox, p47phox Rn00586945_m1 y GAPDH Rn01775763_g1 (Applied Biosystems, EE.UU.). La cuantificación relativa se evaluó mediante el uso de la fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ y normalizando la cantidad del gen diana con la expresión del gen control GAPDH.

Inmunoblots

El cerebelo de ratas de P4, P8, P12, P16 y P25 o los cultivos de NGC de las ratas de P0, P4, P8 y P12, se homogenizaron en una solución tampón a 4 °C la cual contenía 25 mM de Tris, 50 mM de NaCl, 2% de Igepal, 0,2% de SDS, y Complete (Roche), ajustado a un pH de 7.4. Los homogenados se centrifugaron a 15.000 rpm durante 30 min, y el sobrenadante se almacenó a -20°C hasta su análisis. La concentración de la proteína se cuantificó por el método de Bradford. Los homogenados (60 µg proteína por carril) fueron sometidos a SDS-PAGE. Las proteínas resueltas se transfirieron a una membranas de PVDF (Millipore) a 100 V durante 1 h. Las membranas fueron bloqueadas durante 1 h a temperatura ambiente con 5% de leche seca libre de grasas en TBS (100 mM de Trizma, 150 mM de NaCl, pH 7,5), se lavó con TTBS (0,1% de Tween en TBS). Después se pusieron los anticuerpos primarios contra NOX1, NOX4, p22phox, p67phox (Santa Cruz), NOX2 o GAPDH (Millipore), a una concentración de 1:100 durante toda la noche a 4°C. Después se trataron con un anticuerpo secundario anti-goat 1:12500 (ZyMax) acoplado a fosfatasa alcalina durante 1 h a temperatura ambiente. GAPDH se utilizó como un control interno. Las bandas se visualizaron usando quimioluminiscencia (CDP-Star, Bio Labs), siguiendo el protocolo del fabricante, las membranas se expusieron a la película Kodak Biomax Light. El análisis densitométrico se realizó con el programa Image J (NIH Image versión 1.38) y los resultados se expresaron como la relación de las subunidades entre GAPDH.

Detección de ERO

Se determinó la producción de ERO mediante microscopía de fluorescencia usando dihidroetidina. La dihidroetidina al ser oxidada por el O_2^- se transforma en etidio, éste se intercala con el ADN, lo que permite observar el núcleo de la célula de color rojo.

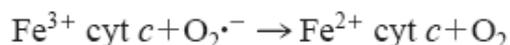


Las evaluaciones in vivo se realizaron con ratas de P4, P8, P12, P16 y P25, las cuales fueron tratadas IP con dihidroetidina (27 mg/Kg) (Hu, et al., 2006), 4 h después se anestesiaron con pentobarbital, se profundieron con PBS y paraformaldehído al 4%. Posteriormente se disecaron los cerebelos y se mantuvieron en paraformaldehído 24 h, se realizaron cortes sagitales de 30 μ m con el crióstato. Los cortes se contratiñeron con H \ddot{o} chst 0.001% durante 12 min, se lavaron tres veces con PBS y los cubreobjetos se montaron con fluoromont-agua 1:1 v/v. La preparación se observó en un microscopio de fluorescencia y/o cofocal usando el filtro de excitación = 546 nm y emisión = 590 nm.

En el caso de los estudio in vitro, las NGC se cultivaron sobre cajas de 35mm y se incubaron a 37 °C con dihidroetidina (3.2 μ M) durante 25 min. La preparación se observó en un microscopio de fluorescencia (Nikon Diaphot TMD, Nikon Corporation, Japón) usando el filtro de excitación = 546 nm y emisión = 590 nm.

Actividad de NADPH-oxidasa

La actividad de NADPH-oxidasa se midió utilizando la técnica descrita por Shpungin y colaboradores (1989). La técnica mide indirectamente la actividad de la enzima NADPH-oxidasa, en presencia de FAD y NADPH, mediante la reducción de citocromo c por el anión O $_2^{\cdot-}$ formado.



Los tejidos se homogenizaron con 300 μ l del amortiguador salino [KCl 150 mM y NaCl 150 mM (pH 7.4) suplementado con MgCl $_2$ 1 mM, EGTA 1 mM, NaN $_3$ 2 mM y DTT 1 mM] más Complete (Roche) y glicerol 1% (v/v). El homogenizado se incubó (100 μ l) a 24°C durante 90 s con el amortiguador, citocromo c (86 μ M), FAD (10 μ M) y SDS (100 μ M). Después de la incubación, se adicionó 0.2 mM de NADPH, y la reducción de citocromo c se midió espectrofotométricamente a 550 nm por 120 s. Finalmente se ajustó el resultado de la actividad enzimática con la cantidad de proteína total por muestra. Los resultados se expresan como la diferencia en la absorbencia por hora por mg de proteína. La concentración de proteínas fue determinada por el método de Bradford (1976).

Inmunohistoquímica

GFAP

Los cortes de los cerebelos de las ratas de P4, P8, P12, P16 y P25 tratadas con MnTMPyP, apocinina y con vehiculo se lavaron con PBS 0,1 M durante 10 min y luego se incubaron en una solución de bloqueo (PBS 0,1 M, Tween 20 al 0.5% y 10% de suero normal de cabra) durante 24 horas a 4 ° C. Después se enjuagaron con PBS 0,1 M,

posteriormente los cortes fueron incubados con el anticuerpo primario contra GFAP (dilución 1:500) en la solución de bloqueo durante 48 horas a 4 ° C. A continuación las laminillas se incubaron con el anticuerpo secundario hecho en cabra anti-conejo conjugado con FITC (Zymed) (dilución 1:250) en la solución de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente. Se hicieron tres lavados de las laminillas y se montaron con Vectashield H1200 el cual contiene DAPI. Las imágenes fueron obtenidas utilizando microscopia confocal con el microscopio un Fluoview FV 1000 (Olympus). Las imágenes se visualizaron y procesaron con el programa FV10-ASW 1.6 (Olympus). Las laminillas sin anticuerpo primario no mostraron tinción.

Caspasa 3 activa

Los cortes de los cerebelos de las ratas de P16 tratadas con MnTMPyP, apocinina y con vehículo se lavaron en PBS 0,1 M durante 10 min y luego se incubaron en una solución de bloqueo (PBS 0,1 M, Tritón X-100 3% y 3% de suero normal de cabra) durante 24 horas a 4 ° C. Después se enjuagaron con PBS 0,1 M, posteriormente los cortes fueron incubados con el anticuerpo primario contra caspasa-3 activa (Cell Signaling)) (dilución 1:200) en la solución de bloqueo durante 48 horas a 4 ° C. A continuación las laminillas se incubaron con el anticuerpo secundario hecho en cabra anti-conejo IgG conjugado con Alexa 488 (Molecular Probes) (dilución 1:200) durante 2 h a temperatura ambiente. Las imágenes fueron obtenidas utilizando microscopia confocal con el microscopio Fluoview FV10i. El análisis de imágenes se realizó con el programa ImageJ. Las células positivas se contaron de la capa molecular y de la granular interna. Los resultados se expresan como el número de células positivas por mm².

Evaluación de migración neuronal

Los cultivos de neuronas granulares de cerebelo (NGC) fueron obtenidos de ratas de 7 días postnatales; las células fueron disociadas y cultivadas a una densidad de 5x10⁶ células/ml. Las células se dejaron crecer por 72h en un medio de cultivo que contenía medio basal Eagle suplementado con 10% v/v de suero de caballo, 2 mM de glutamina, 5 mM de KCl, 50 U/ml penicilina y 50 µg/ml de estreptomicina. Los cultivos se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda al 95% de aire y 5% de CO₂. A los cultivos se les administró el antioxidante MnTMPyP o los inhibidores de la NOX el AEBSF, DPI o la apocinina, a continuación las cajas con el cultivo se colocaron en un microscopio de epifluorescencia acoplado a un sistema con platina que controla la temperatura y el CO₂, así se mantuvieron las mismas condiciones de la incubadora en los cultivos. Posteriormente se tomó video durante 3 a 4 horas de los cultivo y se determinó la distancia recorrida de la

neurona migrante y el tiempo para posteriormente determinar la velocidad de migración de estas células.

Medición de la actividad locomotora

La actividad locomotora se determinó en ratas de P25 tratadas desde P2 con MnTMPyP, apocinina o vehículo. La prueba del Rotarod (Columbus Instruments) se utilizó para analizar la capacidad de la rata para correr en un cilindro giratorio y proporciona información sobre diferentes parámetros motores, tales como la coordinación motora, la marcha, el equilibrio, el tono muscular y la motivación para correr (Rozas et al., 1997). Las ratas se colocan en un cilindro giratorio y se midió el tiempo que permanecían en este cilindro. El cilindro se programó a una aceleración de 0,2 rpm / s y una velocidad de 10 rpm, y se anotó el tiempo que permanecieron las ratas en dicho cilindro durante 120s.

La evaluación de la coordinación motora y el equilibrio simple se determinó midiendo el desplazamiento de la rata en una barra. El aparato consistía en una varilla horizontal de madera (50 cm de largo y 1,5 cm de diámetro), situado a 25 cm por encima de una plataforma para amortiguar la caída eventual de los animales. Los animales se colocaron al inicio de la varilla, y su cuerpo en eje perpendicular a la varilla. Durante la prueba se tomó el tiempo en el cual los animales se desplazaban hasta el final de la barra, se les dio un tiempo de tolerancia de 3min para atravesar la barra. Se realizaron tres ensayos sucesivos para cada rata separados por una pausa de 3 min.

Evaluación del comportamiento locomotor también se llevó a cabo utilizando el Open Field Starter Package ENV-515 (MED Associates).

El sistema mide la actividad de los animales mediante la interrupción de un haz de luz infrarroja el cual es monitoreado a lo ancho, largo y alto de toda la superficie donde las ratas se desplazan. Estos datos fueron evaluados como tiempo estereotipado, número de movimientos estereotipados, tiempo en posición vertical, cuentas verticales, velocidad media de desplazamiento, tiempo de ambulatorio, cuentas ambulatorias, episodios ambulatorios y la distancia total recorrida (cm). Las ratas se colocaron en la caja del ensayo y permanecieron 10 min en periodo de adaptación del medio antes de empezar la prueba.

La actividad locomotora se evaluó durante 30 min. Todos los experimentos se realizaron entre las 9:00 y las 12:00 h. El tiempo ambulatorio es el tiempo que el sujeto pasa en estado de movimiento ambulatorio. El tiempo y la distancia recorrida se utilizan para determinar velocidad media. El recuento ambulatoria es el número de interrupciones

(cuentas) del paso del haz de luz durante el estado de movimiento ambulatorio. El tiempo estereotípico es el tiempo que el sujeto está detenido interrumpiendo el paso de haz de luz. Las cuentas estereotipadas son el número total de interrupciones del haz. El tiempo de reposo es el tiempo en el que el individuo está detenido sin nuevas interrupciones en el haz. Las cuentas verticales son el número de periodos de interrupciones continuas del haz de luz reportadas por "Z" I / R. El tiempo en vertical es el tiempo total interrumpiendo el haz de luz en "Z". La cuantificación de saltos es el número de veces que el animal deja de tocar la caja durante un período de tiempo. El tiempo de saltos es el tiempo que permanece en coordenadas 0,0, lo que indica un salto, de tal forma que el censor registra de todos los haces de luz pasan a través de sus piernas. Episodios ambulatorios es el número de veces que el sujeto se desplaza en el área definida o predeterminada antes de descansar.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron con el programa OriginPro 7.0. Los datos se presentan como la media \pm desviación estándar, y una significancia estadística determinada mediante un análisis estadístico de varianza (ANOVA) de una cola, seguido por la prueba de Tukey post hoc, con parámetros de significancia de $p < 0.05$., indicando el número de experimentos.

RESULTADOS

Como se mencionó en trabajos previos del laboratorio, se encontró que los cultivos de las NGC de ratas de P8 y 8 días in vitro expresan NOX1, NOX2 y NOX4; sin embargo en cultivos obtenidos de ratas de P0, P4, P8 y P12 no se sabía la expresión ni del mRNA, ni de la proteína en los cultivos de las NGC obtenidos de estos animales. Se encontró mediante RT-PCR que la expresión de Nox1 aumentó en el cultivo de las ratas de P8 en relación a P0, mientras que los otros homólogos no cambiaron su expresión (Fig.10). Respecto a la expresión de la proteína de Nox1, Nox2 y Nox4, en los cultivos antes mencionados se encontró que Nox1 aumentó a P8, lo cual coincide con el aumento en la expresión del mRNA de NOX1 mencionado. Los niveles de proteína de NOX2 y NOX4 presentan una tendencia a disminuir con el tiempo (Fig. 10).

Se determinó la generación de ERO utilizando DHE en los CGN de ratas de P0, P4, P8 y P12 como se describió en Materiales y Métodos y encontramos que hay producción de ERO a todas las edades estudiadas (Fig 11).

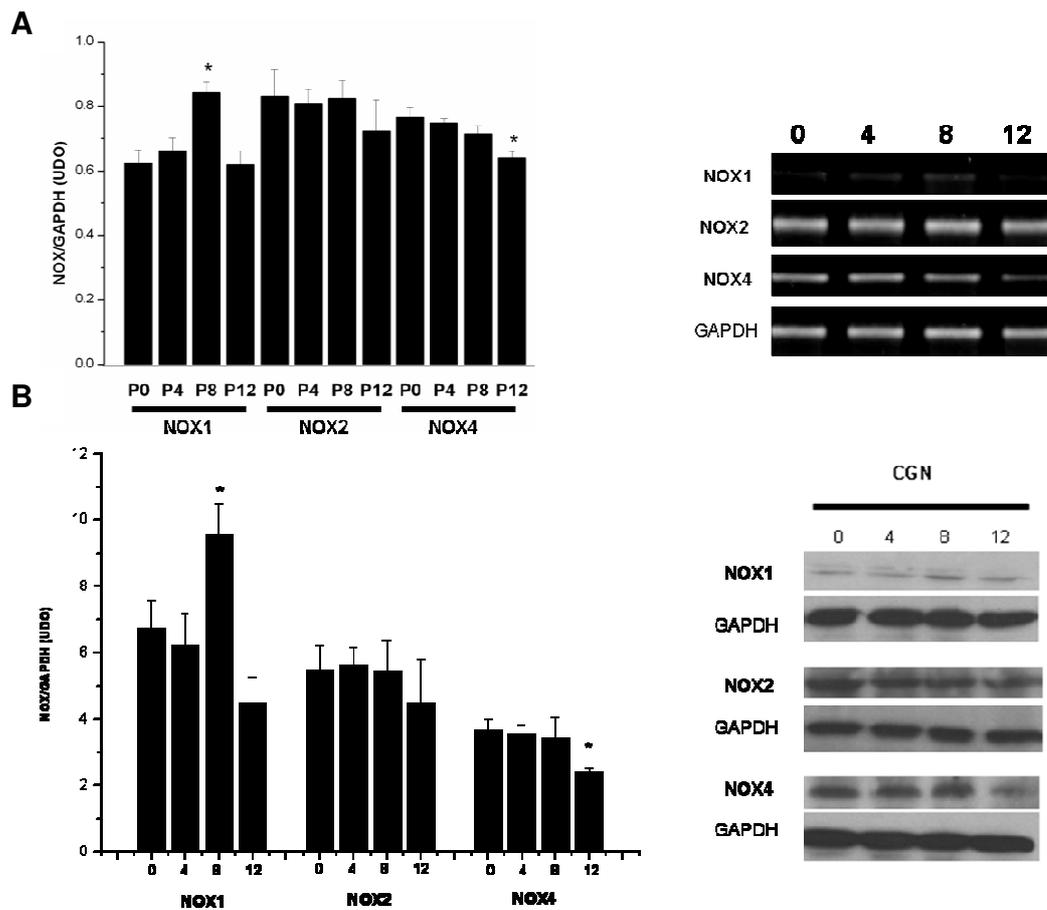


Figura 10. Expresión de la NADPH oxidasa en cultivos de neuronas granulares de ratas de P0, P4, P8 y P12. (A) Expresión del mRNA de Nox1, Nox2, Nox4, determinada mediante RT-PCR. Los valores corresponden a las unidades de densidad óptica (UDO) normalizado con el gen control GAPDH. Los datos son la media \pm SD de 5 experimentos independientes. * Significativamente diferente de P0. (B) Niveles de la proteína de Nox1, Nox2 y Nox4 en cultivos de neuronas granulares (CGN) de ratas de P0, P4, P8 y P12 determinados mediante Western blot. Las barras muestran los valores densitométricos de la relación de Nox / GAPDH expresada como UDO. * Significativamente diferente de P0. El análisis estadístico fue realizado mediante el análisis de Tukey $p < 0,05$.

Después de determinar que los NGC expresan los distintos homólogos de NOX y que hay una generación de ERO en cultivo, evaluamos el papel de las ERO en el proceso de migración en un modelo de migración de NGC in vitro. Mediante el uso de DHE encontramos que estos cultivos también generan ERO. Pero como era conocido que las ERO se producen en un proceso de muerte, se evaluó la viabilidad celular y se encontró que las NGC en estas condiciones no comprometen su viabilidad medida con diacetato de fluoresceína (FDA) (Fig.12).

Para demostrar si las ERO producidas en el cultivo de las NGC en migración eran importantes para este proceso, el cultivo fue tratado con el antioxidante MnTMPy P y

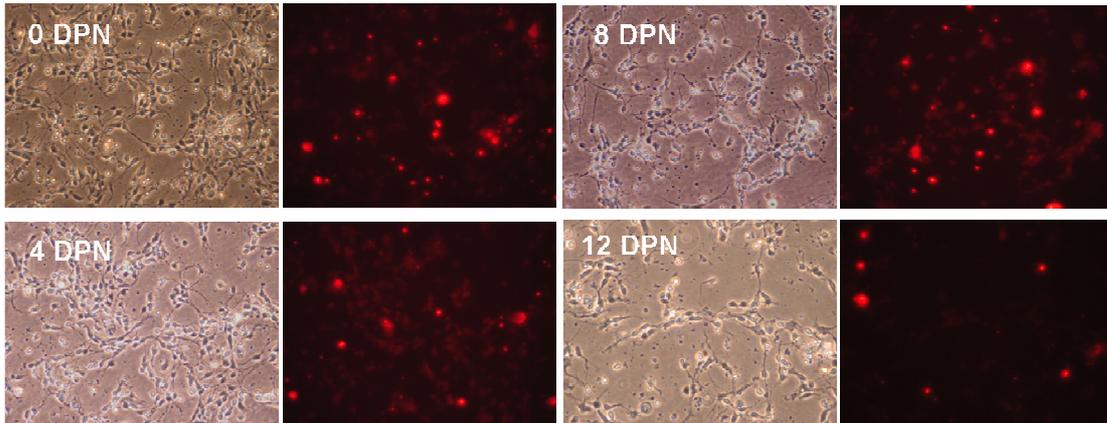


Figura 11. Producción de ERO en cultivos de neuronas granulares de cerebelo de ratas de P0, P4, P8 y P12. A los cultivos se les administró dihidroetidina (DHE) para la detección de las ERO. Las fotografías en campo claro muestran los somas y algunos procesos de las neuronas granulares del cerebelo de la rata en el día postnatal 0, 4, 8 y 12. Las fotografías con fluorescencia roja muestran los somas de las células positivas a DHE.

para determinar si estas ERO las generaba una NOX, el cultivo se trató con inhibidores de la NOX con AEBSF, DPI y Apo (inhibidores de la NOX). Con éstos tratamientos observamos que el MnTMPy P redujo más del 50% la velocidad de migración de estas células (Fig. 13). Por otro lado, los tres inhibidores de NOX redujeron entre 60 y 80% la velocidad de migración de las neuronas granulares de cerebelo en cultivo (Fig. 13).

De acuerdo a los resultados anteriores, se sabe que las NGC del cerebelo de las ratas de P0, P4, P8 y P12 expresan los homólogos de la NOX, además generan ERO y tienen un papel crítico en el proceso de migración. Sin embargo, se desconoce si en el cerebelo durante el desarrollo las ERO tienen un papel determinante en este proceso y si éstas son generadas por una NOX. Para ello, en primer lugar se determinó la expresión

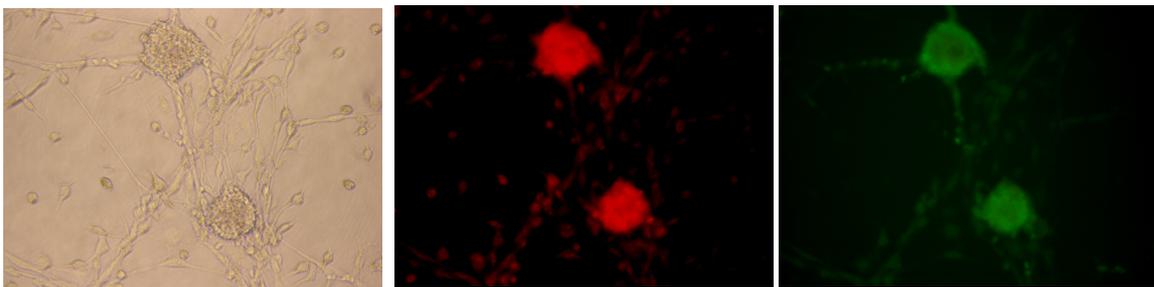


Figura 12. Determinación de ERO en cultivos de neuronas granulares que favorecen la migración de estas neurona. A) Fotografía en campo claro donde se observa cúmulos de neuronas, procesos a algunas neuronas migrando sobre el proceso. B) Al cultivo se le administró DHE y se encontró que este cultivo generan ERO (rojo). C) Al cultivo se le agregó FDA (diacetato de fluoresceína) para determinar si las neuronas en este cultivo estaban vivas (verde).

Migración

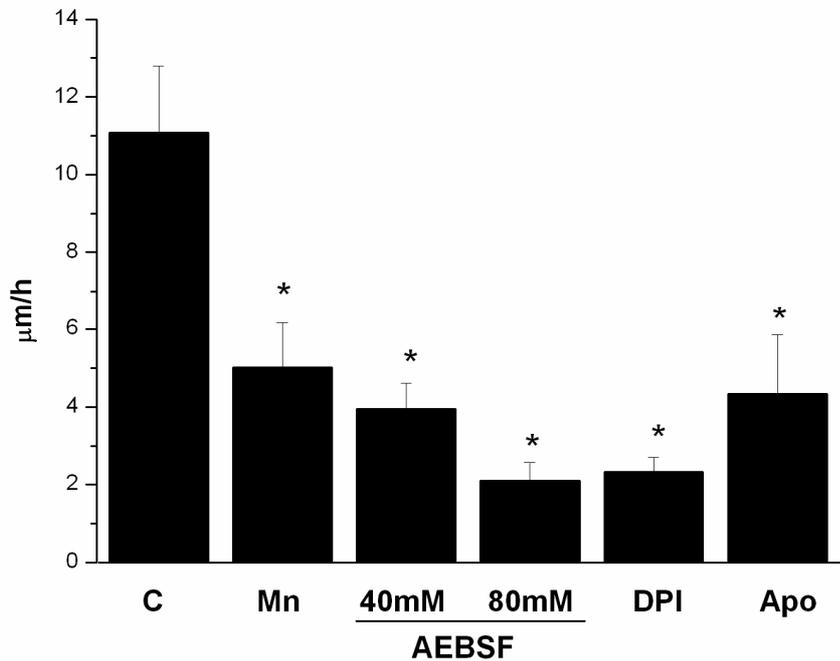


Figura 13. Efecto de inhibidores de la NADPH-oxidasa y un antioxidante en la velocidad de migración en el cultivo de las neuronas granulares. A los cultivos de neuronas granulares que favorecen la migración de éstas se trataron con MnTMPyP (Mn), AEBSF, DPI, apocinina (Apo) y control (C). Las barras muestran la velocidad de migración de la media \pm SD de 3-6 experimentos independientes. * Significativamente diferente de C. El análisis estadístico fue realizado mediante el análisis de Tukey $p < 0,05$.

del mRNA de los homólogos de la NOX (NOX1, NOX2 y NOX4) mediante QPCR en cerebelos de ratas de 4, 8, 12, 16 y 25 días posnatales (P). Los resultados obtenidos muestran que el mRNA de NOX1 aumenta en P16 y P25 respecto a las demás edades. En el caso de NOX2, la expresión del mRNA incrementa a partir de P12 y se mantiene constante. Finalmente el mRNA de NOX4 disminuye desde P16 hasta P25 (Fig. 14). Respecto al mRNA de las subunidades p22 phox, p47 phox y p67 phox, en general su expresión es mayor en P4 y menor en P12, P16 y P25 (Fig. 14A).

También se determinó la expresión de la proteína en los cerebelos de estos animales. Se encontró que la proteína de NOX1 disminuye gradualmente desde P4 hasta P25, mientras que en el caso de NOX2, ésta aumenta de manera transitoria a P8 y P16. La proteína de NOX4 disminuye gradualmente desde P4 hasta P5, como ocurre con su mRNA. Respecto a p22 phox y p67 phox también se observa una disminución en su expresión, alcanzando un mínimo a P25 (Fig. 14B,C).

Por otro lado, determinamos la actividad de la NOX durante el desarrollo del cerebelo y encontramos que la actividad es más alta a P4 y disminuye gradualmente a

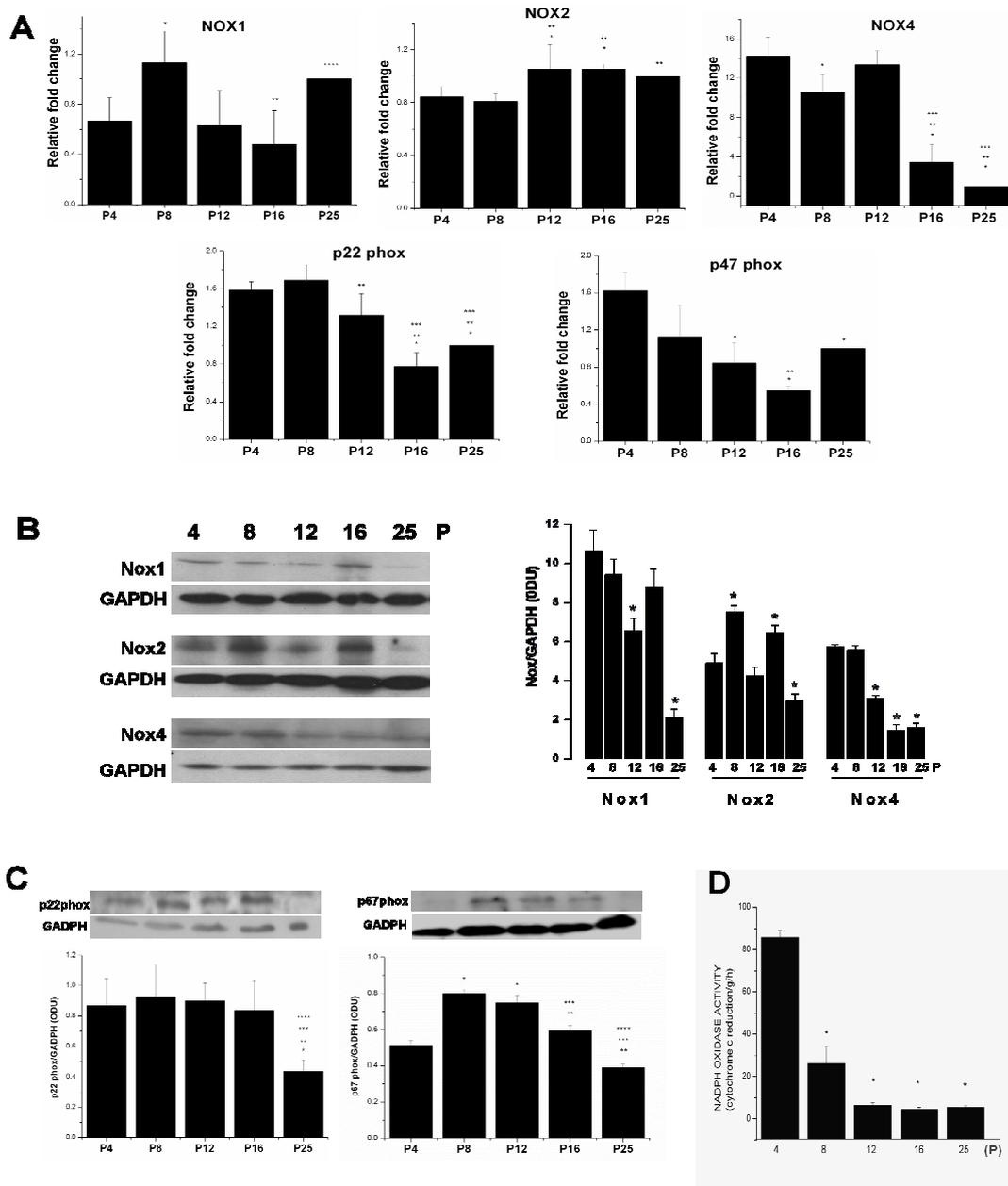


Figura 14. Expresión y actividad de la NADPH oxidasa durante el desarrollo del cerebro de la rata. (A) Expresión del mRNA de Nox1, Nox2, Nox4, p22phox y p47phox determinada mediante PCR en tiempo real en el cerebro de ratas a 4, 8, 12, 16 y 25 días posnatales (P). Los valores corresponden a la cantidad de RNAm normalizado con el gen control GAPDH. El valor medio de inducción del gen a P25 se estableció como 1, y el valor medio de las otras edades se expresó respecto a P25. Los datos son la media \pm SD de 3-5 experimentos independientes. * Significativamente diferente de P4, ** de P8, *** de P12 o **** de P16. (B) Niveles de la proteína de Nox1, Nox2 y Nox4 en el cerebro de la rata a 4, 8, 12, 16 y 25 días posnatales (P) determinados mediante Western blot. Las barras muestran los valores densitométricos de la relación de Nox / GAPDH expresada como ODU. * Significativamente diferente de P4. (C) Niveles de la proteína de p22phox y p67phox en el cerebro de ratas de 4, 8, 12, 16 y 25 días posnatales (P) detectados por Western blot. Las barras muestran los valores densitométricos de la relación de las subunidades de NOX / GAPDH expresadas como ODU, los valores mostrados son la media \pm SD de 5 experimentos independientes. *Significativamente diferente de P4, ** de P8, *** de P12 o **** de P16. (D) Actividad de la NADPH oxidasa, los valores son la media \pm desviación estándar de 4 experimentos independientes. * Significativamente diferente de P4. El análisis estadístico fue realizado mediante el análisis de Tukey $p < 0,05$.

partir de P12 (Fig. 14D). Esta actividad corresponde a la actividad total de NOX y no distingue entre los distintos homólogos.

Para determinar si las EOR son generadas durante el desarrollo del cerebelo de la rata, se les administró DHE a ratas de P4, P8, P12, P16 y P25 como se describió en los Materiales y Métodos. Por medio de microscopía de fluorescencia se encontró que todos los animales presentan un alto porcentaje de células que generan ERO en la corteza del cerebelo a todas las edades estudiadas, sin embargo la cantidad producida varía dependiendo de la edad y las capas del cerebelo. Los animales de P4 presentan un aumento en la intensidad de las células marcadas con DHE en la capa granular externa (CGE), mientras que a P8 el aumento se observa en la capa granular interna (CGI). En los animales de P12 la intensidad de la fluorescencia disminuye en las tres capas de la corteza del cerebelo. En los animales de P16 aumentan las células positivas en la CGI. Los cerebelos de animales de P25 presentan muy pocas células positivas en la CM, sin embargo el número de células positivas a la marca con DHE en la CGI continua siendo alta como en P4, P8 y P16 (Fig. 15, Tabla 1). Los datos muestran que, en todas las preparaciones, las ERO parecen estar generadas por las neuronas, mientras que la glía parece tener una generación de ERO muy limitada (Fig. 15).

Para determinar si un antioxidante y un inhibidor de la NOX reducían o eliminaban las ERO detectadas con DHE en los cerebelos de las ratas, estudiamos el efecto de MnTMPyP o apocinina administrado desde P2 y observamos que ambos tratamientos disminuyeron marcadamente la intensidad de la DHE a P12 en todas las capas del cerebelo (Fig. 16). Observamos resultados a P4, P8 y P16 (no mostrados).

De manera interesante, en los animales tratados con apocinina o con MnTMPyP se presentaron cambios en el patrón de foliación del cerebelo. Las folias más afectadas en estos animales fueron las folias II, III, IV, V, VI y IX (Fig. 17). Los cambios en la foliación se aprecian desde P4 y son más evidentes a P16 y P25 (Fig. 17). El área total de las folias II, IX y X a P12 no presentó cambios a ninguna edad, excepto a P25 cuando observamos un incremento en algunas de las folias de animales tratados con ambos compuestos (Fig. 18). También encontramos que el área de la IGL en estas folias solo se modificó a P12 con apocinina. Para intentar explicar cuáles eventos del desarrollo del cerebelo podrían estar modificándose con los tratamientos administrados, se midió el grosor de las capas de la corteza del cerebelo en las folias II, IX y X. En la EGL no se encontró ningún cambio., mientras que en la folia II, la ML disminuyó en P25 con apocinina y MnTMPyP. En P12 solo el MnTMPyP redujo el grosor de esta capa y a P16 el

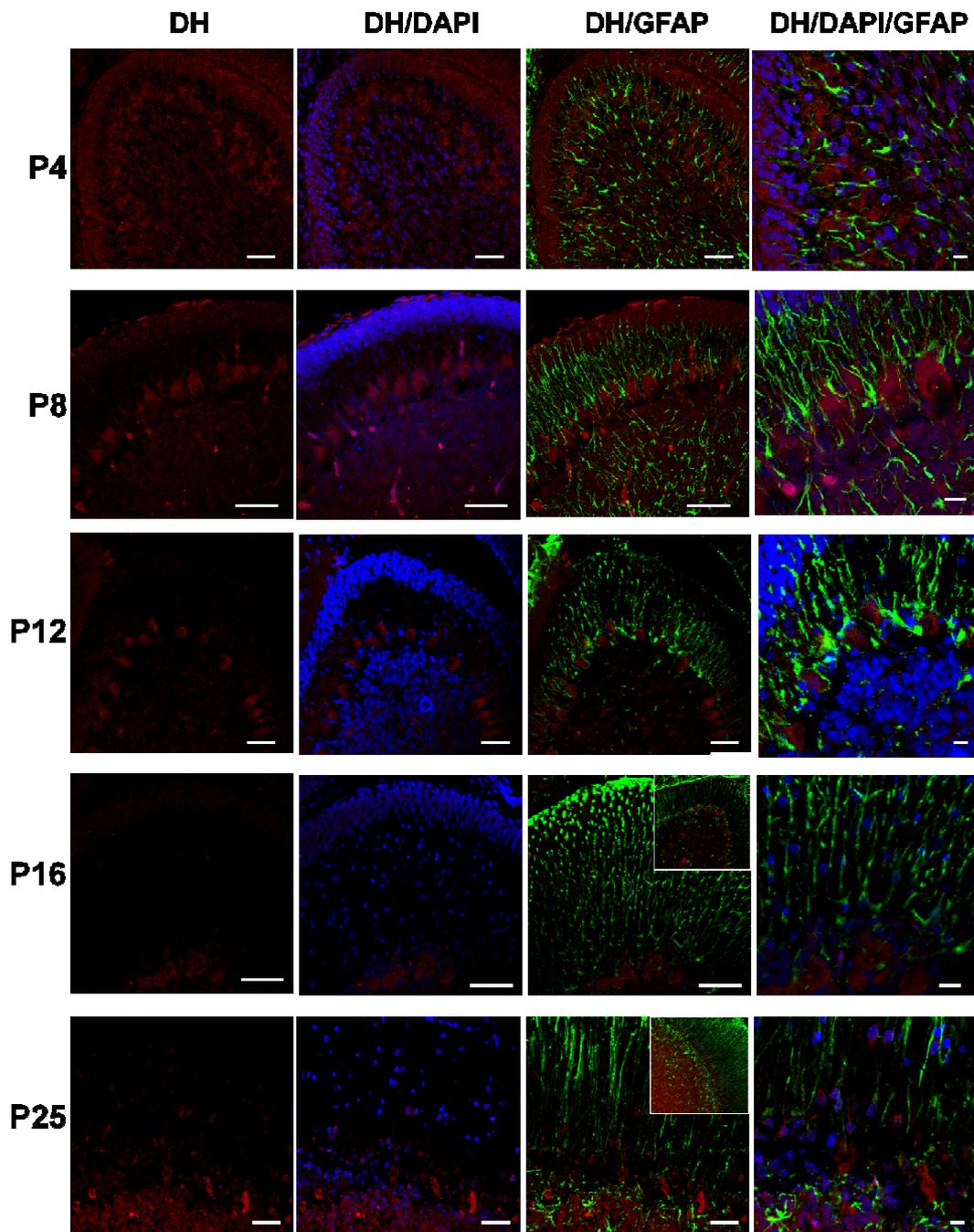


Figura 15. Generación de ERO en el desarrollo del cerebelo de la rata. A los animales se les administró dihidroetidina (DHE) para la detección de las ERO in vivo y se realizó un análisis inmunohistoquímico de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP). Las fotografías muestran el cerebelo de la rata en el día postnatal 4, 8, 12, 16 y 25 (P4, P8, P12, P16 y P25). Los insertos en P16 y P25 muestran microfotografías que ilustran aumentos menores para mostrar la capas granular interna de la corteza cerebelosa. DHE (rojo), DAPI (azul) y GFAP (verde). La barra corresponde a 40 μm en todas las columnas, excepto para la columna de DH / DAPI / GFAP que representa 20 μm .

Tabla 1. Niveles de ERO en el cerebelo de la rata en desarrollo. Efecto de la apocinina y del MnTMPyP

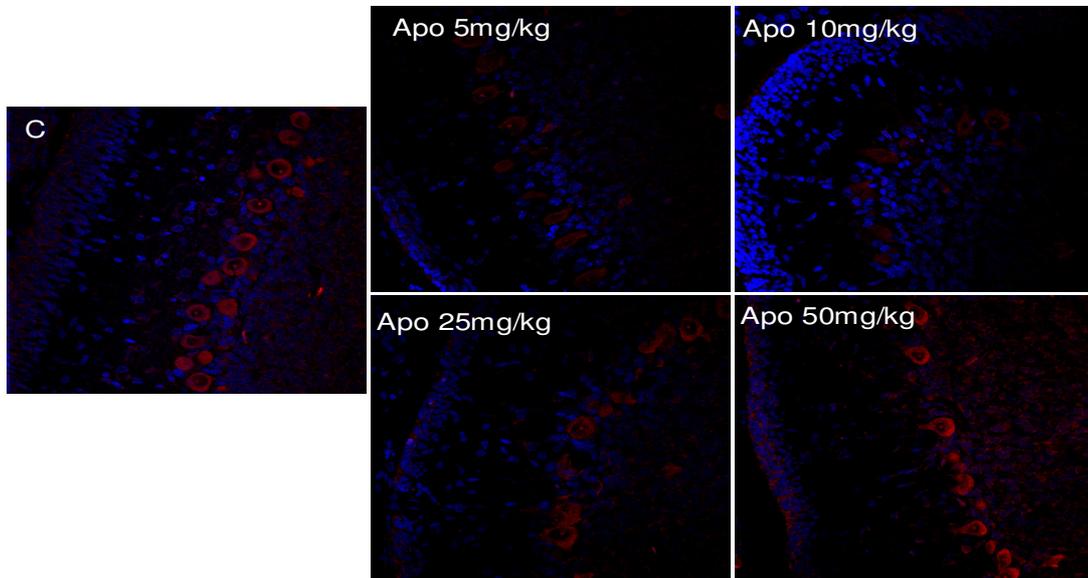
Edad	Células positivas a DHE (%)		
	CGE	CM	CGI
P4	87.3 ± 1.9	67.8 ± 5.3	86.1 ± 1.4
P8	65.2 ± 6.7*	56.3 ± 1.8*	87.7 ± 1.4
P12	56.9 ± 3.4*	47.5 ± 2.3*	67.0 ± 2.1*
P16	46.8 ± 6.5*	29.5 ± 4.5*	88.7 ± 2.1
P25	-	35.2 ± 3.1*	91.4 ± 2.9
P12 MnTMPyP	11.45 ± 1.53**	9.57 ± 1.81**	10.2 ± 1.55**
P12 Apo	15.53 ± 2.53**	13.47 ± 6.4**	14.28 ± 1.69**

La detección de las ERO de los cerebelos de las ratas de P4, P8, P12, P16 y P25 se realizó como se mencionó en la sección de materiales y métodos. Las ratas a P12 las cuales fueron tratadas con 10 mg/kg de apocinina (Apo), con 10 mg/kg de MnTMPyP o sin tratamiento desde P2 se les determinó la producción de las ERO en sus cerebelos usando DHE y microscopia confocal. Los datos presentados son el porcentaje del número de células positivas a DHE del total de células por campo en la capa granular externa (CGE), en la capa molecular (CM) y en la capa granular interna (CGI). Los valores son la media ± S.E.M. de 3-4 experimentos independientes. *Significativamente diferente de P4 y ** de P12. El análisis estadístico se realizó usando el análisis estadístico de Tukey con $p < 0.05$.

grosor de la ML incrementó con ambos tratamientos. En la folia IX el grosor de ML a P25 disminuyó con apocinina; sin embargo, a P12 el grosor de la ML incrementó con este mismo tratamiento. En la IGL la apocinina indujo un incremento en el grosor a los P12, P16 y P25, al igual que el MnTMPyP (Fig 19).

Como se mencionó anteriormente, se sabe que las ERO participan en diversos procesos celulares como la muerte apoptótica, dicho proceso también ocurre en el desarrollo del cerebelo y es determinante para que dicho órgano tenga una estructura y funcionalidad adecuada. En este estudio evaluamos el efecto del antioxidante y el inhibidor de la NOX en la muerte apoptótica que ocurre normalmente en las células del cerebelo durante el desarrollo. Para ello, se realizó una inmunohistoquímica en los cerebelos de las ratas contra caspasa 3, la cual es un marcador de muerte apoptótica, a

A



B

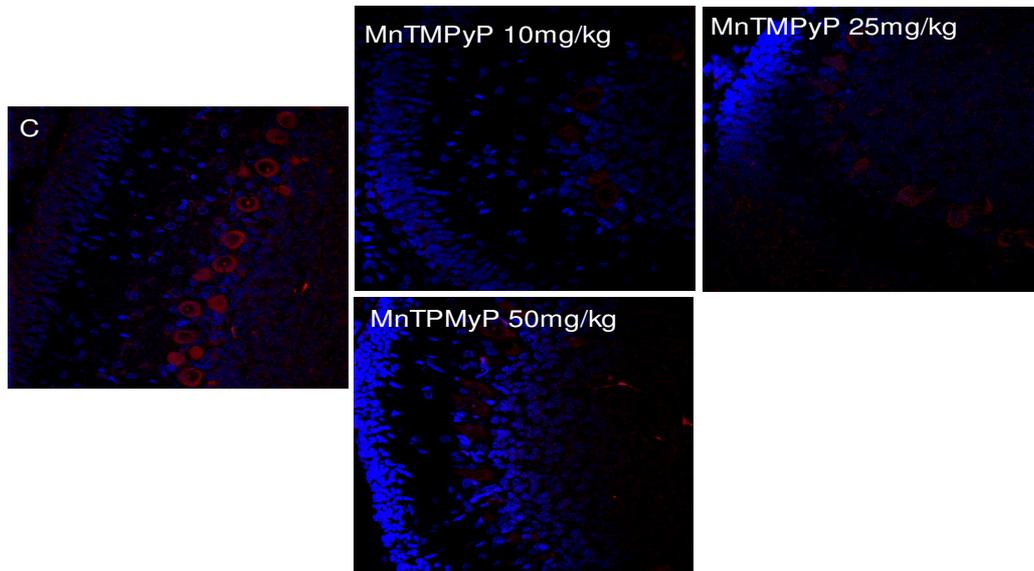


Figura 16. Efecto de un inhibidor de la NADPH oxidasa y un antioxidante en la generación de ERO en el cerebelo de rata. A los animales se les administró dihidroetidina (DHE) para la detección de las ERO in vivo y los cortes se tiñeron con DAPI. A) Fotografías del cerebelo de la rata en P12 tratadas con 5, 10, 25 ó 50 mg / kg de apocinina (Apo), o con B) 10, 25 y 50 mg / kg de MnTMPyP o sin tratamiento (C). n=7.

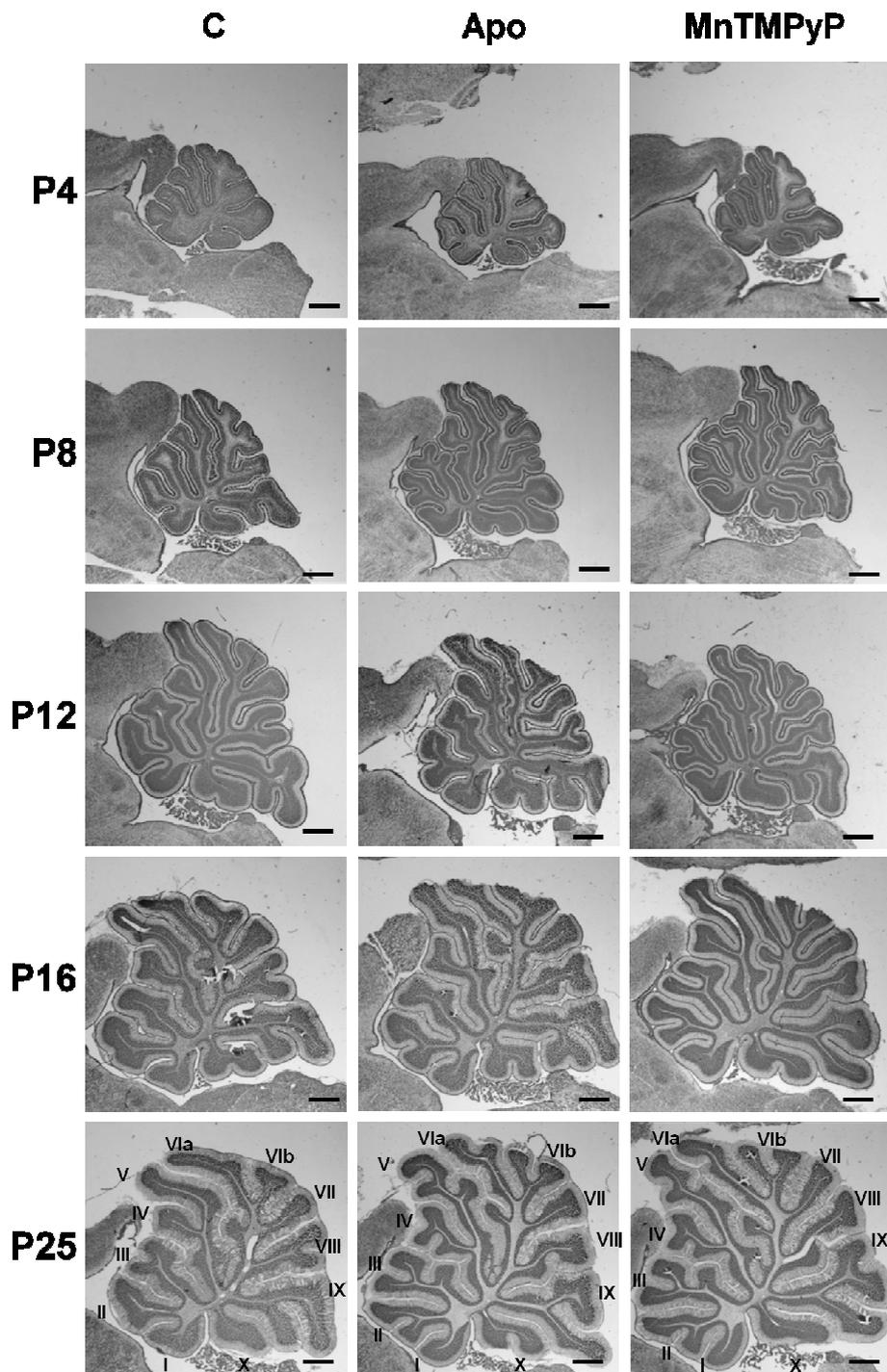


Figura 17. Efecto de un inhibidor de la NADPH oxidasa y un antioxidante de la histología del cerebelo de rata en desarrollo. Las imágenes muestran el patrón de foliación de cortes sagitales en el cerebelo de la rata a 4, 8, 12, 16 y 25 días posnatales (P) tratadas con apocinina (Apo) 10 mg / kg, MnTMPyP (10 mg / kg) y sin tratamiento (C). Fotografías representativas de cerebelo de ratas de 12 experimentos independientes.

P16, una edad que se ha reportado un índice elevado de muerte programada (Altman, 1972a, b). La mayor parte de las células positivas a caspasa-3 se encontró en la capa molecular alrededor de los somas de las células de Purkinje (Fig. 20). El número de células positivas se evaluó en las folias I, IX y X en los animales tratados con apocinina y MnTMPyP. En estas condiciones no se encontró ninguna diferencia significativa en el número total de células positivas a caspasa 3 entre los animales controles y los tratados (Tabla 2).

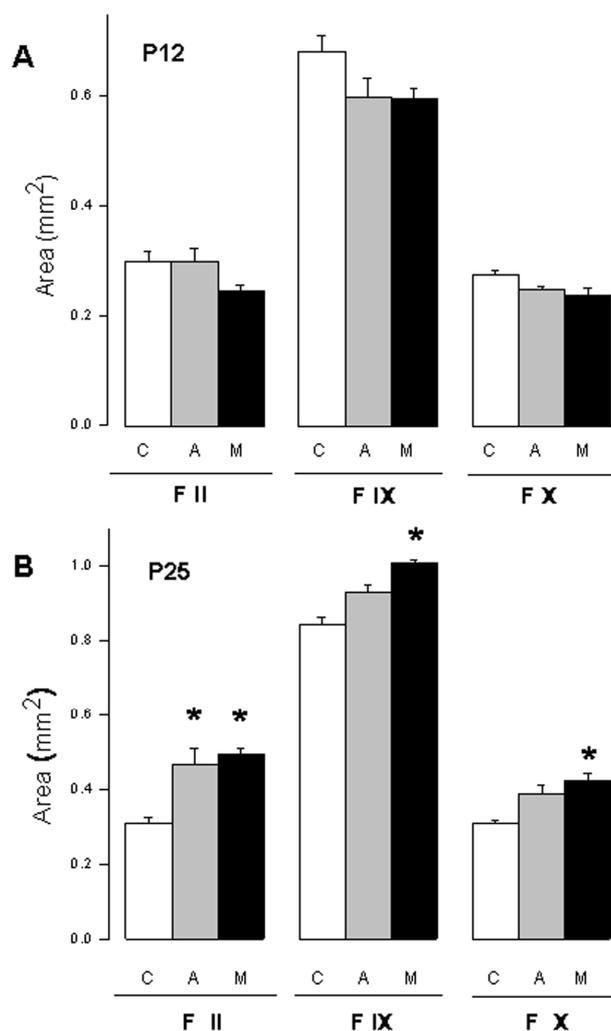


Figura 18. Efecto de un inhibidor de la NADPH oxidasa y un antioxidante en el área de las folias. El área total de las folias II, IX y X del cerebelo de la rata en P12 (A) o P25 (B) tratadas con 10 mg / kg apocinina (A), 10 mg / kg de MnTMPyP (M) o sin tratamiento (C). Las barras son la media \pm SD de 8 experimentos independientes. *Significativamente diferente de C. (p < 0,05).

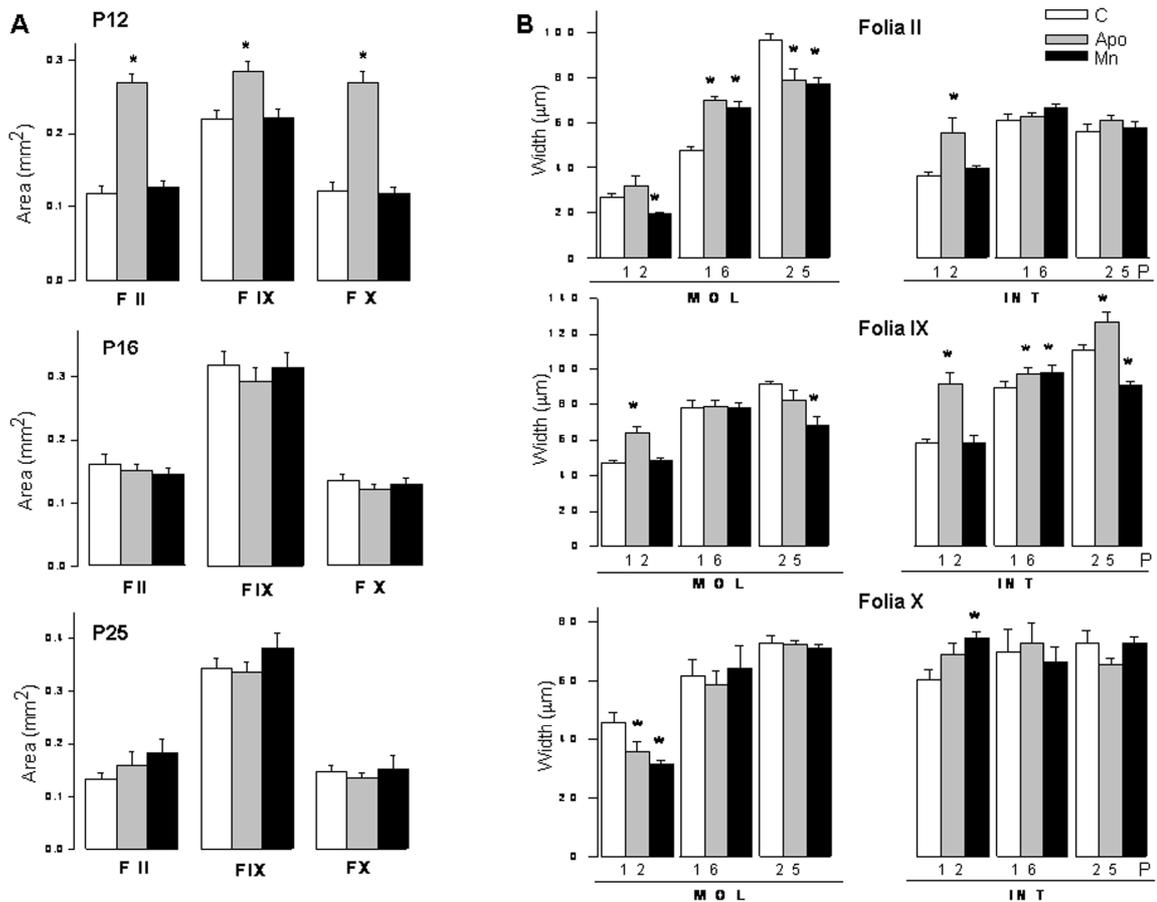


Figura 19. Efecto de un inhibidor de la NADPH oxidasa y un antioxidante en el área de la capa granular interna y en el grosor de las capas del cerebelo. Área de la capa granular interna del cerebelo (A), grosor de la capa molecular (MOL) y de la capa granular interna (INT) del cerebelo (B) de ratas a P12, P16 y P25 tratadas con 10 mg / kg apocinina (barras grises), 10 mg / kg de MnTMPyP (barras negras) o sin tratamiento (barras blancas). Las barras son la media \pm SD de 8-16 experimentos independientes. *Significativamente diferente de C ($p < 0,05$).

Se evaluó la actividad motora y la coordinación de las ratas de P25 tratadas con el MnTMPyP y la apocinina. Por un lado, se evaluó el tiempo que los animales tardaban en cruzar una barra de madera desde un sitio iluminado a uno en la oscuridad. La figura 21 A muestra que el grupo tratado con Apo o MnTMPyP tardó entre 2 y 3 veces más tiempo en cruzar la barra de madera comparado con el grupo control.

También utilizamos la prueba del Rota rod que mide el tiempo en el que el animal permanece en un cilindro girando. Esta prueba mostró una diferencia significativa entre los grupos control y los tratados tanto con Apo o MnTMPyP. Los animales control tardaron casi el doble del tiempo en caer del cilindro giratorio en comparación con los animales q tratados con el antioxidante y el inhibidor de la NOX (Fig. 21 B).

Finalmente, como se muestra en la Tabla 3, la actividad locomotora de las ratas en campo abierto se vio afectada por la Apo y el MnTMPyP. La distancia recorrida, los recuentos ambulatorios y el tiempo de ambulatorio disminuyeron aproximadamente un 50% en Apo y MnTMPyP. El número de saltos y el tiempo de saltos disminuyeron aproximadamente un 70% en las ratas tratadas con Apo y MnTMPyP. Por último, sólo el antioxidante afectó el tiempo en que el animal permanece en posición vertical y la cuenta de movimientos estereotipados.

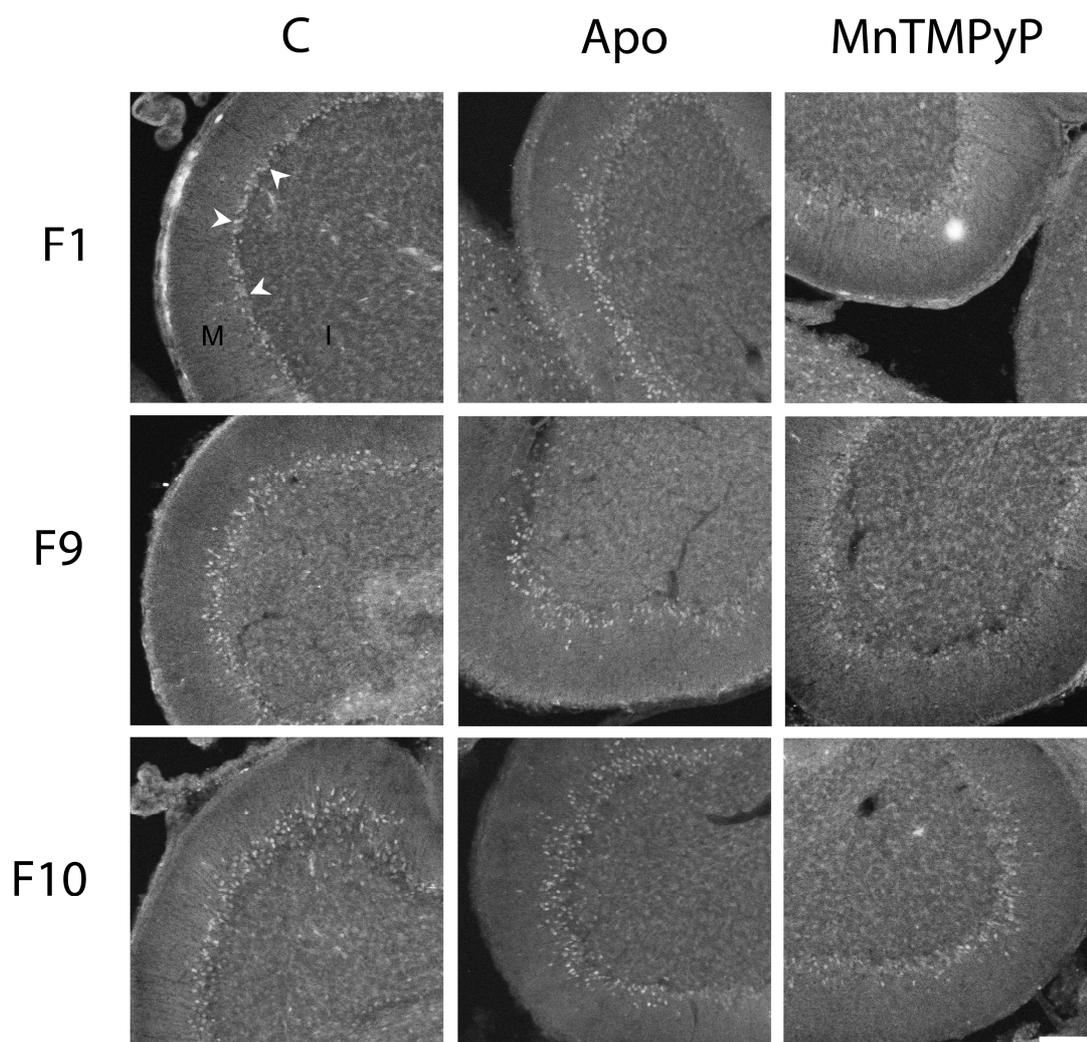


Figura 20. Efecto de la apocinina y del MnTMPyP en la activación de la caspasa-3 en el cerebelo de la rata en desarrollo. Las microfotografías muestran las folias I, IX y X del cerebelo de las ratas a P16 tratadas con apocinina (Apo), MnTMPyP o control (C). Las células positivas se señalan con puntas de flecha. (M) indica la capa molecular e (I) indica la capa granular interna. La barra corresponde a 100 μ m.

Tabla 2. Efecto de la apocinina y del MnTMPyP en la activación de la caspas-3 in en el desarrollo del cerebelo.

Cerebellar folia	Molecular layer						Internal granular layer					
	F1		F9		F10		F1		F9		F10	
		<i>P</i>		<i>P</i>		<i>P</i>		<i>P</i>		<i>P</i>		<i>P</i>
Control	845.2 ± 77.3		872.2 ± 42.6		1155.9 ± 69.3		163.3 ± 47.5		180 ± 24.7		191 ± 57.8	
Apocynin	934.2 ± 72.3	0.37868	931.2 ± 62.8	0.51565	1013 ± 76.1	0.42837	204.4 ± 50.8	0.50089	170.2 ± 49.3	0.84398	203.9 ± 25.1	0.80646
MnTMPyP	717.3 ± 27.1	0.21903	701 ± 84.9	0.07921	855.6 ± 175.6	0.09029	178.8 ± 9.9	0.79673	223.7 ± 34.5	0.34784	209.8 ± 29.1	0.72943

El tratamiento de los animales y la inmunohistoquímica de la caspasa 3 activa se realizó como se describieron en materiales y métodos. El número de células positivas por capa se determinaron contando el número total de células por mm² en la capa molecular y en la capa granular interna de la folia I, IX y X. Los valores presentados son el promedio ± S.E.M. de 3 a 5 experimentos independientes.

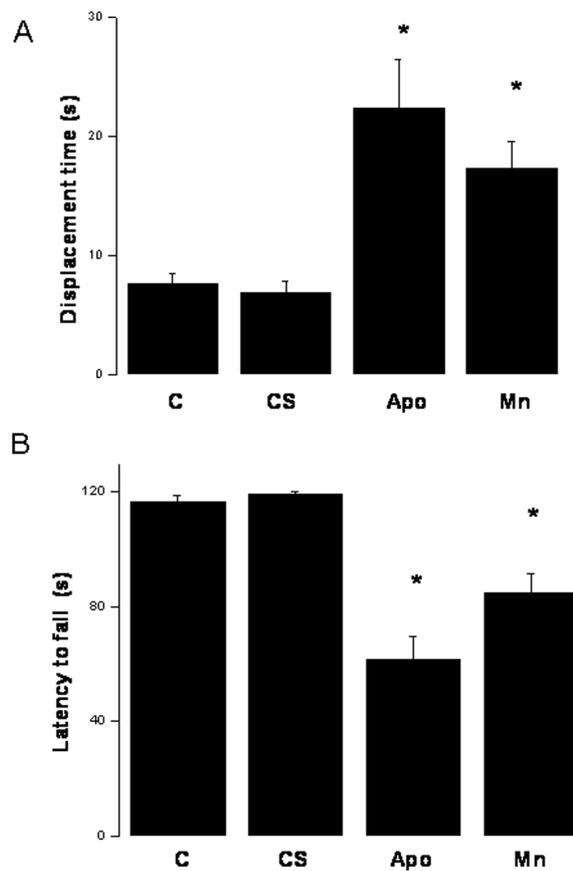


Figura 21. Efecto de un inhibidor de la NADPH oxidasa y un antioxidante en la coordinación motora de la rata. (A) Tiempo de desplazamiento en la barra de las ratas a P25 tratadas con apocinina (Apo) 10 mg / kg, MnTMPyP (Mn) 10 mg/kg, vehículo (CS) o sin tratamiento (C). (B) Tiempo en caer del cilindro giratorio de las ratas a P25 tratadas con apocinina (Apo) 10 mg / kg, MnTMPyP (Mn) 10 mg/ kg, vehículo (CS) o sin tratamiento (C). Las barras son la media \pm SD de 8-11 experimentos independientes. * Significativamente diferente del CS. El análisis estadístico se realizó a través de la prueba de Tukey con $p < 0,05$.

Tabla 3. Efecto de la apocinina y el MnTMPyP en el comportamiento locomotor de las ratas en el campo abierto

Tratamiento	Distancia recorrida (cm)	Tiempo estereotipado (s)	Número de movimientos Estereotipados	Tiempo en posición vertical (s)	Cuentas verticales	Velocidad promedio	Tiempo ambulatorio (s)	Cuentas ambulatorias	Episodios ambulatorios	Tiempo de reposo (s)	Número de saltos	Tiempo de saltos (s)
CC	987±113	124±21	1328±108	1020±102	548±47	11.32±0.5	123±23	1224±207	62.1±10	1528±56	54.7±16	24.5±3.6
CS	1035±122	148±24	1413±100	1423±104	422±80	11.54±0.4	108±29	1346±307	74.8±8	1526±49	40.9±14	17.3±4
Apo	494±53*	113±12	1248±120	1001±110	578±53	10.93±1	58±7*	504±69*	57.9±7	1622±22	14.3±2*	4.2±1*
MnTMPyP	348±43*	83±10*	916±116*	808±102*	354±55	9.59±1	45±9*	423±95*	37.2±7*	1664±21	17.9±8*	6.3±2*

La actividad locomotora en campo abierto se estudió en ratas a P25 (CC) tratados con solución salina (CS), 10 mg / kg apocinina (Apo) o 10mg/kg MnTMPyP. Los parámetros evaluados fueron la distancia recorrida, el tiempo estereotipado, número de movimientos estereotipados, tiempo en posición vertical, cuentas verticales, velocidad promedio, el tiempo ambulatorio, cuentas ambulatoria, tiempo de reposo, número de saltos y tiempo de saltos, como se detalla en Materiales y Métodos. Los datos son las medias ± S.D. de diez experimentos independientes. * Significativamente diferente de CS. El análisis estadístico se realizó mediante el análisis unidireccional de la varianza con Tukey $p < 0,05$. Valor F, 41.82.

DISCUSION

Se ha demostrado que las ERO pueden regular procesos fundamentales como la proliferación, la diferenciación, migración y muerte celular durante el desarrollo en diferentes tipos celulares incluyendo músculo liso (Rao y Berk, 1992), fibroblastos (Burdon y Rice-Evans, 1989) células endoteliales aórticas (Ruz-Gines 2000), PC12 (Katoh et al., 1997; Katoh et al., 1999; Suzukawa et al., 2000), etc. En células progenitoras neuronales, las ERO generadas endógenamente promueven la actividad proliferativa (Masanori, 2010). En neuronas hipocampales se observan niveles altos de anión superóxido (Bindokas et al., 1996) que parecen modular la plasticidad neuronal (Hongpaisan et al., 2004; Knapp and Klann, 2002). Además, los niveles de ERO en el sistema nervioso parecen estar regulados por el estado de desarrollo. Tsatmali y Cols (2006) demostraron que en cultivos celulares de corteza embrionaria de rata, las células progenitoras multipotenciales contienen bajos niveles de ERO, mientras que las células con altos niveles de ERO correspondieron a las neuronas diferenciadas. A su vez, la proporción de los dos tipos de neuronas derivados de las células progenitoras multipotenciales depende del tratamiento antioxidante. En el presente trabajo encontramos que durante el desarrollo del cerebelo de rata existe una generación diferencial de ERO a P4, P8, P12, P16 y P25. La mayor cantidad de ERO se detectó a P4 en la mayoría de las neuronas en las tres capas de la corteza cerebelar.

Se sabe que a P4 las neuronas granulares (NG) presentan una alta actividad mitótica, algunas empiezan a migrar de la capa granular externa a la granular interna y algunas están muriendo. Además, durante este periodo las células de Purkinje se alinean en una monocapa y algunas de estas neuronas mueren. Es posible que las ERO detectadas a P4 podrían estar participando en alguno de estos procesos como se ha sugerido en otras preparaciones (Valencia and Moran 2004).

En el cerebelo de la rata a P8 la generación de las ERO es menos intensa comparada con P4, sin embargo dicha generación sigue siendo alta en prácticamente todas las capas de la corteza cerebelar. En este tiempo, se aprecia que la capa granular interna (IGL) presenta una alta cantidad de células condensadas con niveles mayores de ERO que en las células no condensadas. Trabajos previos informaron que en este momento del desarrollo del cerebelo hay un aumento en la muerte de la NGC en la CGI (Wood et al., 1993). Se sabe también que algunas NG en la capa granular interna continúan proliferando (Uzman 1960, Fukita 66), lo que apoyaría la idea de que las ERO

son importantes durante la proliferación. En este tiempo se aprecia también un nivel alto de ERO en los somas de la célula de Purkinje que podrían participar en el desarrollo de estas células, así como en el desarrollo general de la corteza cerebelar.

En contraste, a la marca alta de células positivas a DHE a P4 en CGI se redujo gradualmente desde P12 hasta P16. Alrededor de P12, aumenta el número de contactos sinápticos funcionales, así como la actividad de migración radial de las NG (Hager G, 1995), además se ha reportado recientemente, que las ERO están implicadas en la migración celular como ocurre con los fibroblastos y de algunas otras células (Svineg 2008, Taddei 2007), así que las ERO observadas a esta edad podrían depender en parte de este proceso.

Por otro lado, parte de las ERO observadas en la CGI en este periodo podrían asociarse al proceso de eliminación de las neuronas granulares del cerebelo que ocurre en este momento (Wood et al, 1993; Alavez et al, 2006). En P16, ni la apocinina ni el tratamiento con MnTMPyP modificó significativamente los niveles de caspasa 3 activa. Estos compuestos disminuyeron los niveles de células positivas a DHE, es posible especular que los niveles de ERO no están relacionados con la muerte apoptótica en esta edad en las folias del cerebelo.

En P25 muchos de los procesos implicados en el desarrollo del cerebelo han concluido, no obstante aun se observa una generación de ERO tanto en la capa molecular como en la capa granular interna. Esto podría estar relacionado con cambios en la cantidad de enzimas antioxidantes, en homogenados de cerebelo de rata a P30 se encontró que la catalasa y la glutatión peroxidada disminuyen (Bhanja y Chainy, 2010). Interesantemente, las células de Purkinje fueron positivas a DHE a través de todo el desarrollo del cerebelo. Estos resultados coinciden con estudios previos que muestran niveles elevados de ERO en las células de Purkinje del cerebelo in vitro (Rápido y Dugan, 2001). Durante el desarrollo de las células Purkinje el desarrollo de sus árboles dendríticos comienza desde P6 hasta P30 (Sotelo y Dusart, 2009). Además las neuronas de Purkinje continúan alineándose verticalmente y estableciendo contactos sinápticos, para lo cual también podrían utilizar o producir ERO.

La familia de la NOX produce anión superóxido y está constituida por varios homólogos, nombrados por sus subunidades catalíticas NOX1-5. En el sistema nervioso, la mayoría de estos homólogos han sido identificados ((Infanger et al., 2006), particularmente en neuronas (Tammariello et al, 2000; Vallet et al, 2005; Haorah et al, 2008; Coyoy et al, 2008) y en astrocitos en cultivo (Abramov et al, 2005; Reinehr et al,

2007; Zhu et al, 2009.). Se ha demostrado un papel fisiológico de la NOX, incluyendo una participación en el crecimiento neuronal (Munnamalai y Suter, 2009; Ibi et al, 2006), la muerte neuronal programada (Tammariello et al, 2000; Coyoy et al., 2008), la proliferación y diferenciación neuronal (Tsatmali et al., 2005, 2006; Dickinson, 2010).

En este trabajo describimos por primera vez la expresión diferencial de estos homólogos durante el desarrollo del cerebelo de la rata. Además, detectamos la presencia de algunos homólogos de la NOX, particularmente Nox1, Nox2 y Nox4 y p22phox, p47phox, p67phox y NOXO1 en homogenados de cerebelo a diferentes edades. Estos resultados coinciden con estudios previos en donde se detectó a estos homólogos en CGN (Coyoy et a., 2008). Encontramos que la expresión del mRNA de Nox1 incrementó a P8 y que Nox2 incrementó a P12 y P16. En contraste, el mensajero de Nox4 muestra una reducción en su expresión a partir del 16 DPN. Esta disminución de Nox4 coincide con los niveles de proteína, los cuales fueron significativamente diferentes desde P12, sugiriendo una regulación traduccional. Por otro parte, las subunidades moduladoras p22phox, p47phox, p67phox y NOXO1 también redujeron su expresión a partir de P8 hasta P12.

En general, los niveles de proteína de Nox1, Nox2 y Nox4, así como de p22phox y p67phox fueron mayores en P4 que en P25. El patrón de disminución en la proteína de las subunidades antes mencionadas coincide con la actividad de la NOX y los niveles de ERO, es mayor a P4 y menor en P25. Particularmente, la proteína de NOX2 incrementó a P8 y P16, a P12 esta proteína disminuyó en relación a P8 y esta reducción coincide con la actividad de NOX y los niveles de ERO, pero el incremento a P8 y P16 no coincide con la actividad de la NOX. En contraste, el nivel de la proteína correlaciona con la actividad de la NOX, las ERO producidas en todas las edades estudiadas. Dicha correlación puede deberse a que NOX4 es constitutiva (Hace et al, 2004; Paravicini et al, 2004) mientras NOX1 y NOX2 requieren ser activadas. Así que, los diferentes factores tróficos podrían modular la actividad de NOX1, NOX2 y/o NOX4 durante el desarrollo. También es interesante notar que el nivel de proteína de p67 phox mostró un incremento a P8 y P12 en contraste a la disminución observada a P4, sugiriendo que esta subunidad podría ser regulada a nivel traduccional.

NOX 2 como se mencionó, muestra un mayor nivel de la proteína a P4 que a P25, presentando un incremento a P8 y P16 DPN. Se podría especular que este incremento podría ser ocasionado por NF- κ B, el cual promueve la expresión de NOX2; en el cerebelo de ratón la expresión de dicho factor aumenta en P7 y disminuye a P12, lo cual coincide con el aumento de NOX2 a los P8 y P16. El incremento en la expresión de la proteína de

NOX2 a los P8 y P16 no coincide con la actividad detectada de la NOX ya que en P16 hay una reducción en la actividad, lo cual podría sugerir que la Nox2 en este periodo tiene otra función además de producir ERO, o bien que la enzima no está activa a pesar de que exista la proteína y/o que la contribución de NOX2 a la actividad total detectada sea baja.

Por otro lado, NOX1 muestra una disminución en P12, igual que NOX4. NOX1 se ha implicado en el crecimiento neurítico (Ibi et al; 2006) y en la migración celular. De tal manera que aunque disminuye la cantidad de proteína de este homólogo sigue presente en el cerebelo de la rata y no se descarta que la NOX1 pueda tener un papel importante en el desarrollo del cerebelo regulando procesos tan especializados como los antes mencionados. Por otro lado, en P12 todos los homólogos estudiados disminuyen la cantidad de la proteína, lo que coincide con procesos como la migración y maduración, por lo que dichos procesos podrían requerir niveles menores de ERO producidos por la NOX, mientras que otros procesos más tempranos como la proliferación podrían necesitar de niveles mayores de ERO.

Para determinar si la NOX es una de las fuentes de ERO detectadas, se administró apocinina (Apo), un inhibidor de esta enzima. Reportes previos han demostrado la eficiencia de dicho compuesto para inhibir la NOX tanto in vitro como in vivo ((Tang et al, 2008; Kelly et al, 2009; Hernández-Enríquez et al, 2011). En nuestro estudio encontramos que la Apo disminuyó notablemente la producción de las ERO en todas las capas del cerebelo en las edades analizadas. Sin embargo, el decremento en la marca fue parcial y esto se observa en todas las capas, sugiriendo que existen otras fuentes de ERO.

De manera similar, la administración de MnTMPyP, un antioxidante mimético de SOD y catalasa que atraviesa la barrera hemato-encefálica y que entra en la célula, redujo la generación de ERO en todas las capas de la corteza cerebelar; sin embargo, tampoco se eliminó por completo la marca positiva a DHE, apoyando la idea de que se estén generando otras ERO que el MnTMPyP no elimina y a las cuales la DHE puede ser sensible.

Uno de los datos más sorprendentes encontrados en los animales tratados con apocinina y MnTMPyP, fue el efecto observado en la foliación. Con este tratamiento se encontró que la corteza del cerebelo muestra una lobulación normal, pero la sublobulación es irregular en todas las edades estudiadas, siendo más evidente a P25. La complejidad de la foliación del cerebelo sugiere una regulación genética muy precisa, sin embargo se conoce muy poco de los factores que determinan este proceso.

La foliación en el cerebelo de los roedores es generado en distintas fases (Altman 1997). Gran parte del patrón de foliación se realiza en las tres primeras semanas después del nacimiento. Se ha demostrado que una condición de hipotiroidismo o un exceso de la señal de Sonic hedgehog (Shh) resulta en una formación adicional de folias, una prolongada proliferación de las GC en la capa granular externa (CGE) y un aumento en el área total de las folias (Corrales et al, 2004, 2006; Hasebe et al, 2008).

En el presente trabajo, al inhibir la actividad de la NOX o la producción de ERO se observa un efecto similar que cuando aumenta Shh. Una posibilidad es que de tal forma que los ERO podrían participar en las vías de señalización de Shh y de esta forma inducir una mayor proliferación de las GCE que llevaría a un aumento en la sublobulación del cerebelo. Sin embargo, cuando se examinó la histoarquitectura del cerebelo encontramos que, aunque se observa una formación adicional de folias, el área total de las folias no cambia a P12 en los animales tratados con MnTMPyP y Apo, a pesar de que ya se observan cambios en la foliación en este periodo del desarrollo. Por otro lado, se ha sugerido que las células de Purkinje marcan el anclaje de las fisuras en la foliación en edades tempranas, por lo que el cambio en la foliación observado desde edades tempranas podría atribuirse a estas células. En contraste, a los P25 sí hay un aumento en el área total de dichas folias, a diferencia de lo que ocurre a P12. De tal forma que después de P12, una vez definida la foliación, los procesos críticos del desarrollo son la migración y la muerte de las NGC, los cuáles al ser alterados con el inhibidor de la NOX o con el antioxidante podrían producir un aumento en el área en estas folias en P25.

A P12 observamos que el área de IGL aumenta con la Apo, lo cual podría implicar una mayor migración de GC y/o una menor muerte, sin embargo el MnTMPyP no produjo dicho cambio, lo cual podría implicar otras funciones de la Nox no relacionadas con la producción de ERO, como se ha demostrado en otros modelos. El aumento en el área ocasionada con los tratamientos en la IGL a P12 deja de ser significativa a P16 y P25, de tal forma que probablemente la NOX y los ERO ya no sean determinantes para conformar la estructura del cerebelo en este periodo. Además existen otros factores implicados en los niveles de ERO como los niveles de enzimas antioxidantes, cuya actividad aumenta a partir del 16 DPN y así disminuir los niveles de ERO a partir de esa edad.

Por otro lado, se ha visto que las ERO están implicadas en el proceso de proliferación. Dicho proceso podría también influir en el cambio de área observada. A los 12 DPN observamos que el grosor de IGL aumenta con la Apo en la folia II y IX, lo cual coincide con el aumento en el área de la IGL, sin embargo, en 16 y 25 DPN, dicho

aumento ya no se observa en la folia II, pero si en la folia IX, de tal forma que la inhibición de la Nox es variable entre las folias.

En la capa molecular de la folia II a los 16 DPN aumenta el grosor con el tratamiento de apo y Mn, dicho aumento podría deberse por un aumento en la cantidad de fibras paralelas, en contraste a los 25 DPN el grosor disminuye, así que los tratamientos podrían estar afectando directamente en la maduración de las Purkinje y éstas a su vez a la maduración de las neuronas.

Los estudios de somatotopía muestran que el lóbulo anterior del cerebelo es la región que controla los movimientos finos de las extremidades posteriores (Manni y Petrosini 2004). De tal forma que una alteración en la lobulación podría producir las alteraciones en la coordinación motora observada. Por otro lado, se ha demostrado, que diversos cambios en la densidad o morfología neuronal pueden alterar la función del cerebelo como ocurre en diversos tipos de ataxia espinocerebelosa (Yang et al 2000). Así, al afectar el desarrollo del cerebelo de manera temprana la conformación total y funcional se altera, reflejando alteraciones en la locomoción y conducta de los seres vivos.

Uno de los resultados más interesantes del estudio consistió en la observación de que los tratamientos alteraron prácticamente todas las pruebas locomotoras. Un efecto importante observado en las ratas tratadas con Apo y MnTMPyP fue en la prueba de campo abierto, en donde hubo una reducción significativa en la distancia recorrida, en el tiempo de ambulatoria y en el número de saltos que representa parámetros de coordinación motora. Aunque la prueba de campo abierto es una herramienta importante para el análisis de la actividad, el comportamiento está influenciado por la motivación para explorar, así como por la emocionalidad /ansiedad. Parece poco probable que el tratamiento con Apo puede alterar la motivación ya que la actividad en vertical no se afectó, pero con MnTMPyP se observó que la actividad en vertical si se modificó, por lo tanto una alteración en la motivación no puede ser excluida con este tratamiento. Los tratamientos con Apo y MnTMPyP también disminuyeron el rendimiento de las ratas en las pruebas de equilibrio y del Rota rod lo que indica una alteración en la coordinación motora. Así, estos tratamientos provocaron marcadas modificaciones en la coordinación motora, lo que pone de manifiesto el papel fundamental de las ERO y la NOX durante los períodos críticos del desarrollo del cerebelo.

SUMARIO Y CONCLUSIÓN GENERAL

En el presente trabajo concluimos que las ERO y la NOX son importantes durante el desarrollo del cerebelo de la rata. Esto se basa en la observación de que la inhibición de las ERO y de la NOX durante el desarrollo del cerebelo modifica el patrón de foliación y alteran la actividad motora. Las ERO son generadas por las neuronas del cerebelo en las tres capas dependiendo del estado de desarrollo. Las ERO también parecen participar en la migración neuronal. Los resultados también sugieren que alguna NOX podría ser responsable de la generación de ERO que participan en el proceso del desarrollo del cerebelo ya que al inhibir esta enzima disminuyen los niveles de ERO

ARTÍCULO PUBLICADO



Role of reactive oxygen species and NADPH-oxidase in the development of rat cerebellum

Angélica Coyoy, Mauricio Olguín-Albuerno, Patricio Martínez-Briseño, Julio Morán*

División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México, DF, México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 June 2012
Received in revised form 10 March 2013
Accepted 15 March 2013
Available online 25 March 2013

Keywords:

NOx
Cerebellar granule neurons
Programmed cell death
Antioxidants

ABSTRACT

Experimental evidence suggests that reactive oxygen species (ROS) could participate in the regulation of some physiological conditions. In the nervous system, ROS have been suggested to act as signaling molecules involved in several developmental processes including cell differentiation, proliferation and programmed cell death. Although ROS can be generated by several sources, it has been suggested that NADPH oxidase (NOX) could be critical in the production of ROS acting as a signal in some of these events. It has been reported that ROS production by NOX enzymes participate in neuronal maturation and differentiation during brain development. In the present study, we found that during rat cerebellar development there was a differential ROS generation at different ages and areas of the cerebellum. We also found a differential expression of NOX homologues during rat cerebellar development. When we treated developing rats with an antioxidant or with apocynin, an inhibitor of NOX, we found a marked decrease of the ROS levels in all the cerebellar layers at all the ages tested. Both treatments also induced a significant change in the cerebellar foliation as well as an alteration in motor behavior. These results suggest that both ROS and NOX have a critical role during cerebellar development.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Cerebellar shaping is the result of a highly coordinated process during development that involves cell proliferation, cell differentiation, neuronal migration and programmed cell death. In the immediate postnatal period, the outermost layer of cerebellum, the external granule layer (EGL), contains dividing granule neuron progenitors. These granule cells migrate inwards, guided by Bergmann radial glial fibers through the molecular layer (ML), pass through the Purkinje neuron layer (PL) and soma of the Bergmann glia, and finally settle into the internal granular layer (IGL), where they exit the cell cycle and complete cell differentiation (Altman, 1972a, 1972b; Altman and Bayer, 1985; Burgoyne and Cambray-Deakin, 1988; Hatten, 1993; Miale and Sidman, 1961; Alder et al., 1996). Around the end of the third postnatal week, the rat cerebellum development finishes. Although most of

the cellular events during cerebellar development are well known, many of the molecular mechanisms involved are only partially understood.

Experimental evidence suggests that ROS could participate in the regulation of some physiological conditions by modulating cell signaling (Kamata and Hirata, 1999; Finkel and Holbrook, 2000; Allen and Tresini, 2000). Recently, a genetic screen in *Drosophila* identified a thioredoxin peroxidase gene as essential in cell migration (DeGennaro and Lehmann, 2007). Endothelial cell migration is also regulated by redox balance (Harfouche et al., 2005). In addition, low levels of ROS stimulate proliferation of smooth muscle cells (Rao and Berk, 1992), fibroblasts (Burdon and Rice-Evans, 1989), amnion cells (Ikebuchi et al., 1991) and aortic endothelial cells (Ruiz-Ginés et al., 2000), among others. Besides, osteoclast and adipocyte differentiation is also modulated by ROS (Lee et al., 2005; Carrière et al., 2004). Using embryonic stem cells, it has been shown that cardiomyogenesis is also regulated by the cellular redox state (Li et al., 2006; Sauer et al., 2000). Finally, higher concentrations of ROS can temporarily arrest growth, probably mediated by the housekeeping gene expression halted and the induction of stress-related genes (Davies, 1999). It is interesting to note that the expression of antioxidant enzymes show a dramatic change during early differentiation (Cho et al., 2006).

In the nervous system, the oxidative conditions also seem to be essential for cell differentiation. ROS play a key role in the nerve

Abbreviations: Apo, 4-hydroxy-3-methoxy-acetophenone; CGN, cerebellar granule neuron; DHE, dihydroethidium; EGL, external granule layer; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; IGL, internal granular layer; JNK, C-Jun amino-terminal kinase; MAPK, mitogen-activated protein kinase; ML, molecular layer; MnTMPyP, Mn(III)tetrakis(1-methyl-4-pyridyl)porphyrin pentachloride; NGF, nerve growth factor; NOX, NADPH-oxidase; NOX2, phagocyte NOX; P, postnatal day; PL, Purkinje neuron layer; ROS, reactive oxygen species.

* Corresponding author. Tel.: +52 55 56 22 56 16; fax: +52 55 56 22 56 07.

E-mail address: jmoran@ifc.unam.mx (J. Morán).

growth factor (NGF) induced differentiation of PC12 cells (Kamata et al., 2005b), and may influence mesencephalic (Studer et al., 2000), neural crest (Morrison et al., 2000) and oligodendrocyte type-2 (Smith et al., 2000) precursor cell differentiation. In addition, progenitor cells showing high levels of endogenous ROS acquire the phenotype of neurons, but not astrocytes (Tsatmali et al., 2005, 2006). In this model, antioxidant treatment changes the proportion of the two different types of neurons produced (Tsatmali et al., 2006).

On the other hand, ROS have been shown to participate as signaling molecules during the process of cell death. Different ROS levels can result in different types of cell death. In general, low levels of ROS promote apoptosis; at intermediate levels, ROS induce autophagy (Scherz-Shouval and Elazar, 2007); and at the highest concentrations, ROS provoke necrotic cell death (Bras et al., 2005). ROS have been shown to act as early signaling molecules in the apoptotic death of cerebellar granule neurons (CGN) induced by staurosporine or potassium deprivation (Valencia and Morán, 2001; Coyoy et al., 2008). Natural death of motoneurons during spinal cord development is also regulated by ROS (Sánchez-Carbente et al., 2005). Redox regulation of several members of the MAPK pathway has been shown to influence the outcome in the ROS-mediated cell death mechanism (Shen and Pervaiz, 2006). During apoptotic death of CGN induced by potassium deprivation and staurosporine, ROS regulate the activation of both p38 and c-Jun amino-terminal kinase (JNK) pathways (Ramiro-Cortés and Morán, 2009; Ramiro-Cortés et al., 2011). Although ROS can be generated by several sources, it has been suggested that NADPH-oxidase (NOX) could be critical in the production of ROS acting as a signal in some of these events.

Recent data indicates that NOX enzymes are widely expressed in the Central Nervous System, possibly fulfilling a large range of physiological functions. The best known member of the NOX family is the phagocyte NOX (NOX2) (Quinn and Gauss, 2004; Bedard and Krause, 2007). This protein produces ROS by the interaction with the transmembrane protein, p22phox, as well as the cytosolic subunits, p47phox, p67phox, p40phox, and one of the small Rho GTP-binding proteins, Rac1 or Rac2. Recently, the presence of homologues of NOX2, named NOX1, NOX3, NOX4 and NOX5 has also been described (Bokoch and Knaus, 2003; Lambeth, 2004, 2007). The presence of NOX1, NOX2, NOX3 and NOX4 transcripts has been identified in total brain samples (Infanger et al., 2006), particularly in neurons, astrocytes and microglia (Marín-Teva et al., 2004; Coyoy et al., 2008; Hur et al., 2010; Zhu et al., 2009). It is well documented that NOX enzymes are involved in several physiological processes of the nervous system as well as neurological and psychiatric diseases (for review see Sorce and Krause, 2009).

In this study we evaluated the role of ROS and NOX in the development of rat cerebellum. We analyzed the levels of ROS using dihydroethidium (DHE) and characterized the presence of the homologues of the NADPH oxidase catalytic subunits (NOX1, NOX2 and NOX4). In order to understand the role played by both ROS and NOX in the development of cerebellum, we tested the effect of the antioxidant MnTMPyP as well as apocynin, which has been suggested to inhibit NOX when administered in vivo (Wang et al., 2007; Choi et al., 2012; Kim et al., 2013.), although in some in vitro studies it has been suggested to be an antioxidant (Heu-müller et al., 2008; Wind et al., 2010). Under these experimental conditions, we found that both of these conditions decreased ROS levels and induced a significant change in the cerebellar foliation as well as alterations in motor behavior. These results suggest that both ROS and NADPH-oxidase have a critical role during cerebellar development.

2. Materials and methods

2.1. Animal treatment

All animals used for the experimentation described in the present study were treated in accordance with the accepted standards of animal care and with the procedures approved by the local Committee of Research and Ethics of the Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. The protocol used followed the Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience as well as guidelines released by the Mexican Institutes of Health Research and the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals. All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used. Pups of Wistar rats aged 2 (P2) to 25 postnatal day (P25) were used throughout the study. Litters were treated with the NADPH-oxidase inhibitor Apo (4-hydroxy-3-methoxy-acetophenone), with the antioxidant SOD/catalase mimetic MnTMPyP (Mn(III)tetrakis(1-methyl-4-pyridyl)porphyrin pentachloride) or with vehicle solution (0.9% saline). Apo (Sigma-Aldrich) (10 mg/kg), MnTMPyP (Enzo Life Science) (10 mg/kg) or vehicle solution were intraperitoneally (i.p.) administered daily from P2 and the animals were sacrificed at P4, P8, P12, P16 and P25 and brains were prepared for histological evaluation.

2.2. Histological evaluation

Animals were anesthetized with sodium pentobarbital and transcardially perfused with 4% paraformaldehyde. Brains were postfixed with 4% paraformaldehyde for 3 days and the brains were transferred to 20% sucrose solutions for 2 days. Parasagittal sections of 35 μ m were obtained in a cryostat and stained with cresyl violet.

2.3. In vivo detection of ROS using dihydroethidium

To identify superoxide formation in the cerebellum in vivo we used dihydroethidium (DHE; Molecular Probes) as previously described (Hu et al., 2006). Briefly, rats were given intraperitoneal injections of DHE (200 μ l, 27 mg/kg). After 4 h, the rats were anesthetized and perfused with 4% paraformaldehyde. Brains were postfixed with 4% paraformaldehyde for 2 days and brains were transferred to a 20% sucrose solution for 2 days. Parasagittal sections of 35 μ m were obtained. Some sections were mounted with Vectashield H1200 containing DAPI (Vector Laboratories) and others were used to GFAP immunohistochemistry. Slices were evaluated for ethidium fluorescence (Ex λ = 488 nm, Em λ > 590 nm) and DAPI (Ex λ = 405 nm, Em λ = 420–480 nm). Confocal images were obtained using a Flouview FV 1000 laser confocal system (Olympus) attached/interfaced to an Olympus IX81 inverted light microscope with a 40 \times glycerol-immersion objective. Confocal images were viewed and processed using a FV10-ASW 1.6 software (Olympus).

2.4. Immunohistochemistry for GFAP

Slices were rinsed in 0.1 M PBS for 10 min and then were incubated in 0.1 M PBS containing 0.5% Tween 20 and 10% normal goat serum for 24 h at 4 $^{\circ}$ C. After rinse with 0.1 M PBS, sections were incubated with an antibody against GFAP raised in rabbit (Dako) (1:500 dilution in 0.1 M PBS containing 0.5% Tween 20 and 10% normal goat serum) for 48 h at 4 $^{\circ}$ C. Tissue sections were incubated with goat anti-rabbit FITC conjugate (Zymed) secondary antibody (diluted 1:250 in the same buffer as the primary antibody) for

1 h at room temperature and sections were mounted with Vectashield H1200 containing DAPI. Slices were evaluated for FITC and DAPI. Confocal images were obtained using a Fluoview FV 1000 laser confocal system (Olympus) attached/interfaced to an Olympus IX81 inverted light microscope with a 40× glycerol-immersion objective. Confocal images were viewed and processed using a FV10-ASW 1.6 software (Olympus). Sections incubated without primary antibody showed no staining.

2.5. Immunohistochemistry for active caspase-3

Slices were rinsed in 0.1 M PBS for 10 min and then were incubated in blocking solution containing 0.1 M PBS, 0.3% Triton X-100 and 3% normal goat serum for 24 h at 4 °C. After rinse with 0.1 M PBS, sections were incubated with primary antibody against cleaved caspase-3 (Cell Signaling) (1:200 dilution) in blocking solution for 48 h at 4 °C. Tissue was incubated with an Alexa 488 conjugated goat anti-rabbit IgG secondary antibody (Molecular Probes) (1:200 dilution) for 2 h at room temperature. Confocal images were obtained using the Fluoview FV10i confocal microscope system. Images analysis was performed in ImageJ and the stitching of the images was made with a plugin obtained from Preibisch et al. (2009). Positives cells were counted in a delimited area of both, molecular and internal granule layer. Results are expressed as the total number of positive cells per mm². Sections incubated without primary antibody showed no staining.

2.6. Western blotting

The rat cerebella from P4, P8, P12, P16 and P25 were homogenized in ice-cold buffer containing 25 mM Tris, 50 mM NaCl, 2% Igepal, 0.2% SDS, and Complete protease inhibitors (Roche), pH 7.4. Homogenates were centrifuged at 15,000×g for 30 min, and the supernatant were stored at –20 °C until analysis. Protein concentration was quantified by the Bradford's method. The homogenates (60 µg protein per lane) were subjected to SDS-PAGE. The resolved proteins were transferred to PVDF membranes (Millipore) at 100 V for 1 h. Blots were blocked with Tris-buffered saline (100 mM Trizma, 150 mM NaCl, pH 7.5) containing 5% nonfat dry milk for 1 h, washed with TTBS (0.1% Tween in TBS), and incubated overnight at 4 °C with a primary antibody against NOX1, NOX4, p22^{phox}, p67^{phox} (Santa Cruz), NOX2 or GAPDH (Millipore) followed by incubation with secondary antibody coupled to alkaline phosphatase for 1 h at room temperature. GAPDH was used as an internal control. Blots were processed for visualization with a chemiluminescence system according to the manufacturer's recommendations (CDP-Star) and exposed to Kodak Biomax Light film. Densitometric analysis was done with the program Image J (NIH Image version 1.38×) and results were expressed as the subunits/GAPDH ratio.

2.7. RT-PCR

Total RNA was isolated of rat cerebellum from P4, P8, P12, P16 and P25 with the single-step method based on guanidine isothiocyanate/phenol/chloroform extraction using Trizol reagent (Gibco-BRL). RNA concentration was determined by absorbance at 260 nm and its integrity was verified by electrophoresis on 1.1% denaturing agarose gels in the presence of 2.2 M formaldehyde. Total RNA was reverse transcribed to synthesize single strand cDNA. 4 µl of RT reaction were subjected to PCR in order to amplify p67^{phox} and NOXO1 and the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) that was used as an internal control. The sequences of the specific primers for NOXO1 were 5'-(CCT CTA CCA TTC CTC ACA CAG ACG)-3' in the sense primer and 5'-(TAC ATA GCT TTC CAC CAC CCC C)-3' in the antisense; for p67^{phox}

were 5'-(TTC GCA GTG GCT TAC TTC CAG C)-3' in the sense primer and 5'-(CAA GAC AAA GAC GAT GTT CCC G)-3' in the antisense. Forty-five microlitres of PCR products were separated in 1.5% agarose gel and were stained with ethidium bromide. The image was captured under a UV transilluminator with a Type 665 negative film (Polaroid Co). The intensity of bands was quantified by densitometry using the Image J Program (NIH Image version 1.38×). NOXO1 and p67 expression levels were normalized to GAPDH levels.

2.8. Total mRNA extraction and quantitative real-time RT-PCR

Total RNA was extracted from rat cerebellum developmental stage (P4, P8, P12, P16 and P25, n = 3–5 per age group) using Trizol Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. RNA quality was assessed on denaturing agarose gel and with NanoDrop2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, USA). One microgram of isolated RNA was then converted into cDNA using M-MLV RT (Invitrogen, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. Relative gene expression was quantified on an Applied Biosystems 7000 (Applied Biosystems, UK) using TaqMan[®] 2X Master Mix (Applied Biosystems, USA) and TaqMan[®] Assay reagent for NOX1 Rn00586652_m1, NOX2 Rn00576710_m1, NOX4 Rn00585380_m1, p22^{phox} Rn00577357_m1, p47^{phox} Rn00586945_m1 and GAPDH Rn01775763_g1 (Applied Biosystems, USA). Relative quantification was assessed by using the formula 2^{-ΔΔCT} and by normalizing the amount of the target gene to the housekeeping gene GAPDH.

2.9. Measurement of NOX activity

The activity of NOX was evaluated as superoxide production measured as the reduction of ferricytochrome c in a quantitative kinetic assay (Shpungin et al., 1989). The rat cerebella from P4, P8, P12, P16 and P25 were homogenized in a NOX assay buffer (150 mM KH₂PO₄, 150 mM Na₂HPO₄, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 2 mM NaN₃; pH 7.4) containing complete protease inhibitor cocktail in 2% glycerol (v/v). The homogenates (50 µl) were incubated at 24 °C during 90 s with a reaction mixture containing NOX buffer (pH 6.8) plus 0.1 mM cytochrome c, 10 µM FAD, 0.1 mM DTT and 100 µM SDS. The activity was initiated with the addition of 0.2 mM NADPH and was followed spectroscopically by measuring the reduction of cytochrome c at an excitation wavelength of 550 nm during 120 s. NOX activity was identified as the reduction of ferricytochrome C that is inhibited by SOD and its specificity was evaluated inhibiting the activity with the NOX inhibitor diphenylene iodonium (DPI). Protein was determined by the method of Bradford and results are expressed as the change in absorbance/h/g.

2.10. Measurement of locomotor activity

The locomotor activity was performed in P25 rats. Rotarod test (Columbus Instruments) was used to analyze the ability of the rat to run on a rotating cylinder and provides information on different motor parameters such as motor coordination, gait, balance, muscle tone and motivation to run (Rozas et al., 1997). An automated rotarod method for quantitative drug-free evaluation of overall motor deficits in rat models of parkinsonism, *Brain Res. Brain Res Protoc.* 2 (1997), pp. 75–84. Article [PDF (426 K)] View Record in Scopus [Cited By in Scopus (52) (Rozas et al., 1997)]. Briefly, rats were placed on a rotating drum and the time spent on the rod was measured. Rats walked on an accelerating (0.2 rpm/s) rod at 10 rpm speed, and the time before falling was scored with a cutoff of 120 s.

The evaluation of motor co-ordination and simple equilibrium was carried out by measuring the displacement of the rat on a rotating rod. The apparatus consisted of a wooden horizontal rod (50 cm long and 1.5 cm in diameter) located 25 cm above a landing platform to cushion the eventual fall of the animals. Animals were placed on the middle of the rod, its body axis perpendicular to the rod's long axis. During the test, the length of time for which the animal traveled the distance to the end of the rod was measured. Three successive trials separated by a 3 min pause were performed for each rat.

Assessment of locomotor behavior was also carried out using the Open Field Starter Package ENV-515 (MED Associates). The activity of animals was observed by the interruption of an infrared beam along the spatial dimensions of the monitor. These data were computed as time stereotypic, stereotypic counts, vertical time, vertical counts, average velocity, time ambulatory, ambulatory counts, ambulatory episodes and total distance traveled (cm). Rats were placed into the test cage and subjected to locomotor activity assessment after 10 min of habituation period. Locomotor activity was evaluated during 30 min. All experiments were performed between 9:00 and 12:00 h.

Time ambulatory is the time the subject spends in ambulatory movement status. The time and distance are used to determine average velocity. Ambulatory count is the number of photo beam breaks (counts) during the ambulatory movement status. Time stereotypic is the time that the subject spends breaking beams. Stereotypic count is the total number of beam breaks. Time resting is the time spent with no new beam breaks. Vertical count is the number of periods of continuous beam breaks reported by the "Z" I/R array strips. Time vertical is the total time breaking "Z" beams. Jump count is the number of jumps when the animal leaves the photo-beam array for a period of time. Jump time is the time spent with 0,0 coordinates, which indicate a jump, under the beams or standing against the wall with all photo-beams passing through their legs. Ambulatory episode is the number of times that the subject leaves the box and travels beyond the user-defined "ambulatory trigger" (number of photo beams) before the "resting delay" criteria are fulfilled.

2.11. Statistical analysis

The data were analyzed and the figures prepared using either OriginPro 7.0 or Image J software (OriginLab Co., Northampton, MA). Data are given as mean values \pm SD, and statistical significance of the results was determined by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test post hoc, with statistical significance set at $p < 0.05$, indicating the number of experiments.

3. Results

3.1. Cerebellum expresses NADPH-oxidase homologues during development

The expression of NADPH-oxidase subunits was evaluated by real time-PCR analysis in rat cerebellum. Fig. 1A shows the presence of mRNA of five different NADPH-oxidase subunits, Nox1, Nox2 and Nox4, p22phox and p47phox in rat cerebellar homogenates from postnatal day (P) 4, P8, P12, P16 and P25. No differences were detected in mRNA Nox1 and Nox2 levels at the different postnatal days as compared to P4, except for NOX1 at P8, where occurred an increase and for NOX2 where a slight increase was observed at P12 and P16 (Fig. 1A). In contrast, the levels of mRNA Nox4 showed a decrease at P8 and a marked reduction at P16 and P25 compared to P4. The level of mRNA p22phox and p47phox was also significantly decreased from P12 as compared to P4 (Fig. 1A).

When we evaluated the expression of p67phox and the p47 homologue for NOX1 (NOXO1) by RT-PCR, we found that both p67phox and NOXO1 were significantly reduced as compared to P4 (Supplementary Fig. 1).

We also studied NADPH-oxidase protein levels by Western blot analysis using antibodies directed against Nox1, Nox2 and Nox4. We found that in all cases, the subunits were expressed in rat cerebellum (Fig. 1B). Under these conditions we observed that NOX1 decreased the protein level at P12 and P25, Nox2 protein increased at P8 and P16 and NOX4 levels decreased from P12. In all cases the lowest levels were detected at P25. Fig. 1C shows that the protein levels of the subunits p22phox and p67phox were decreased at P25, but only in the case of p67phox there was an increase at P8 and P12. It is possible that the observed differences between RNA and protein data could have been due in part to the different procedures, as they have different sensitivities.

When we evaluated the NADPH-oxidase activity in homogenates of the whole cerebellum of rats from P4 to P25, we found that the activity of NADPH-oxidase decreased during cerebellar development (Fig. 1D).

3.2. The developing cerebellum produces reactive oxygen species

ROS production was evaluated with dihydroethidium, a probe used to detect ROS, preferentially superoxide anion (Peshavariya et al., 2007). Fig. 2 shows oxidized DHE in rat cerebellum at P4, P8, P12, P16 and P25. At P4 ROS production was higher than at P8, P12, P16 and P25. At P12 ROS production decreases slightly respect to the other ages evaluated. At P8 some condensed cells were detected and merged with oxidized DHE. Table 1 shows the number of positive cells to DHE. The Purkinje cell layer showed more ROS production than other cerebellar layers at all evaluated ages. Although a variety of well-defined cell types within the cerebellum exist, a potential source for ROS could be glial cells; however, the immunolabeling revealed that ROS positive cells were not immunoreactive to GFAP antibody suggesting that glial cells do not produce significant levels of ROS (Fig. 2). At all ages tested, we found ROS production in all the cerebellar layers (Table 1). At P4, all layers were more labeled with DHE as compared to other ages. The positive cells in the molecular layer gradually decreased from P8 to P25 (Fig. 2, Table 1). Similarly, in the IGL the labeling of DHE was high at P4 and it was gradually reduced until P12 and P16, then an increase at P25 was observed (Fig. 2). At P8 some condensed cells in the IGL were also positive to DHE. This was also observed at P12–P25, but in a lesser extent and in a decreasing proportion with age (Fig. 2). Insets in Fig. 2 show details of the labeling in the IGL at P16 and P25.

3.3. NADPH-oxidase inhibitor and an antioxidant decrease ROS production in the cerebellum

Fig. 3 shows that the treatment with both MnTMPyP, an antioxidant, and apocynin, an NADPH-oxidase inhibitor, markedly reduced the ROS production in a dose dependent manner. Although in some *in vitro* studies apocynin has been suggested to act as an antioxidant (Heumuller et al., 2008; Wind et al., 2010), in several *in vivo* studies it seems to act as a NOX inhibitor (Wang et al., 2007; Choi et al., 2012; Kim et al., 2013). The number of positive cells to DHE is markedly reduced by both treatments in all the evaluated layers (Table 1). The ROS levels in Purkinje cells were also markedly reduced, but DHE label was still observed even at higher doses tested (Fig. 3). These results suggest that NADPH-oxidase could be involved in the observed production of ROS during cerebellum development.

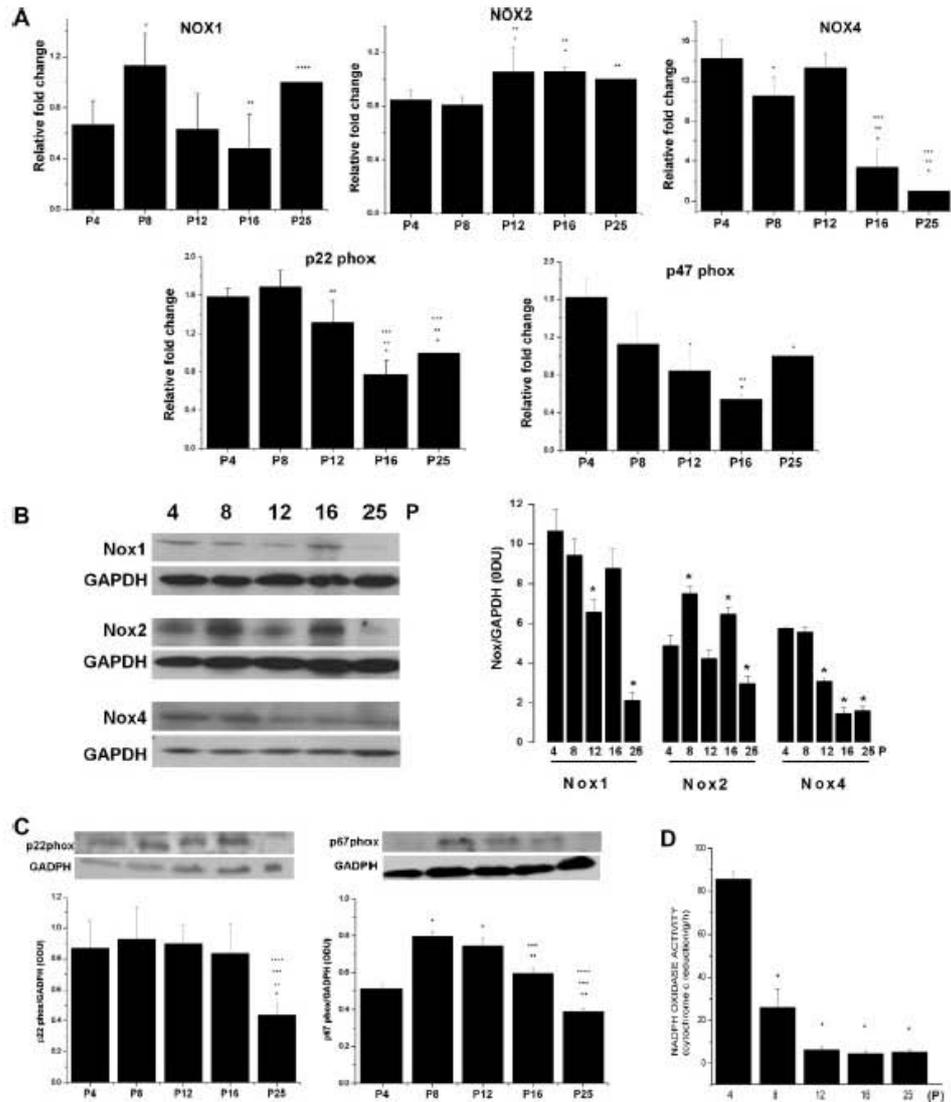


Fig. 1. Expression and activity of NADPH oxidase during rat cerebellum development. (A) Expression of Nox1, Nox2, Nox4, p22phox and p47phox mRNA assayed by real time-PCR in rat cerebella at 4, 8, 12, 16 and 25 postnatal day (P) according to Section 2. Values correspond to the amount of mRNA normalized to the housekeeping gene GAPDH. Mean value of P25 was set to 1-fold induction, and mean values of all other ages were related to P25. Data are means \pm SD of 3–5 independent experiments. * Significantly different from P4, ** from P8, *** from P12 or **** from P16. Statistical analysis was performed using the Tukey one-way analysis of variance with $p < 0.05$. F values for NOX1, 8.14; NOX2, 5.12; NOX4, 52.79; p22phox, 31.52 and p47phox, 14.23. (B) Protein levels of Nox1, Nox2 and Nox4 detected by Western blot analysis according to Section 2. Bars show the densitometric values of the ratio of Nox/GAPDH expressed as ODU and are means \pm SD of 4–7 independent experiments. * Significantly different from P4. Statistical analysis was performed using the Tukey one-way analysis of variance with $p < 0.05$. F values for NOX1, 50.23; NOX2, 3.3; NOX4, 14.33; p22phox, 31.52 and p47phox, 14.23. (C) Protein levels of p22phox and p67phox of rat cerebellum at 4, 8, 12, 16 and 25 postnatal day (P) detected by Western blot analysis according to Section 2. Bars show the densitometric values of the ratio of Nox subunits/GAPDH expressed as ODU and are means \pm SD of 5 independent experiments. * Significantly different from P4, ** from P8, *** from P12 or **** from P16. Statistical analysis was performed using the Tukey one-way analysis of variance with $p < 0.05$. F values for p22phox, 38.9 and p67phox, 4.93. (D) NADPH oxidase activity was evaluated as detailed in Section 2. Values are means \pm SD of 4 independent experiments. * Significantly different from P4. Statistical analysis was performed using the Tukey one-way analysis of variance with $p < 0.05$. F value, 36.52.

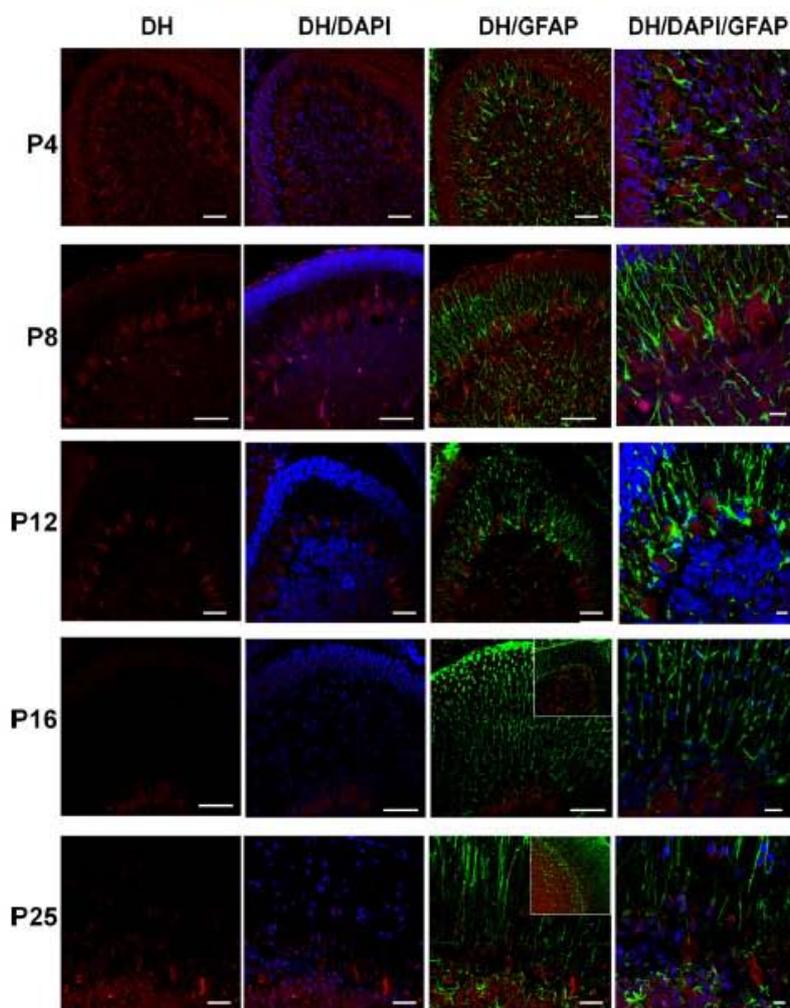


Fig. 2. Generation of ROS in developing rat cerebellum. Animal treatment for *in vivo* ROS detection with dihydroethidium (DHE) and immunohistochemistry analysis of glial fibrillary acidic protein (GFAP) was carried out as detailed in Section 2. Representative photomicrographs show rat cerebella at postnatal day 4, 8, 12, 16 and 25 (P4, P8, P12, P16 and P25). The insets in P16 and P25 show representative photomicrographs illustrating lower magnifications to show the internal granule layers of cerebellar cortex. DHE (red), DAPI (blue) and GFAP (green). Bars correspond to 40 μm in all columns, except for the DH/DAPI/GFAP column that represents 20 μm .

3.4. NADPH-oxidase inhibitor and an antioxidant change cerebellar foliation

To investigate the effect of NADPH-oxidase inhibitor and antioxidant on the cerebellum histoarchitecture, parasagittal sections at P4, P8, P12, P16 and P25 were examined by Cresyl violet staining. Histological abnormalities were observed in terms of the foliation pattern of the cerebellum. In the cerebellar vermis at P25, Apo and MnTMPyP administrated daily to rats from P2 changed the foliation in the lobules II, III, IV, V, VI and IX as compared to control cerebella (Fig. 4). Both treatments induced a protrusion of these lobules (Fig. 4). The observed changes in the foliation were appreciable from P4 and they were more evident at P16 and P25

(Fig. 4). It is important to note that around 25% of treated animals did not show alteration in all the mentioned folia, but in all cases we observed significant alterations in at least one of these folia (data not shown).

The total area of folia IX and X at P12 showed a tendency to decrease by both treatments, however these changes were not significant (Fig. 5A). The total area of lobules II, IX and X in the vermis at P25 increased with Apo and MnTMPyP treatment, this change was significant in folia II, IX, X by MnTMPyP. Only in folium II the Apo increased significantly the total area (Fig. 5B).

The area of the IGL was increased only by Apo at P12 in folia II, IX, X (Fig. 6A). At P16 and P25 neither Apo nor MnTMPyP altered the area of IGL in folia II, IX, X (Fig. 6A). When animals were treated

Table 1
ROS levels in developing rat cerebellum. Effect of apocynin and MnTMPyP.

Age	DHE positive cells (%)		
	EGL	ML	IGL
P4	87.3 ± 1.9	67.8 ± 5.3	86.1 ± 1.4
P8	65.2 ± 6.7*	56.3 ± 1.8*	87.7 ± 1.4
P12	56.9 ± 3.4*	47.5 ± 2.3*	67.0 ± 2.1*
P16	46.8 ± 6.5*	29.5 ± 4.5*	88.7 ± 2.1
P25	–	35.2 ± 3.1*	91.4 ± 2.9
P12 MnTMPyP	11.45 ± 1.53**	9.57 ± 1.81**	10.2 ± 1.55**
P12 Apo	15.53 ± 2.53**	13.47 ± 6.4**	14.28 ± 1.88**

Animal treatment and *in vivo* ROS detection with dihydroethidium (DHE) staining in rat cerebella at postnatal day 4, 8, 12, 16 and 25 (P4, P8, P12, P16 and P25) were carried out as detailed in Section 2. Rats at P12 treated with 10 mg/kg apocynin (Apo), with 10 mg/kg MnTMPyP or without treatment were assayed for ROS generation using confocal microscopy. Data are the percent of the number of DHE positive cells from total cells per field in external granule layer (EGL) molecular layer (ML) and internal granule layer (IGL). Values are mean ± SEM of 3–4 independent experiments. *Significantly different from P4 and ** from P12. Statistical analysis was performed using the Tukey one-way analysis of variance with $p < 0.05$. *F* values for EGL, 85.45; ML, 86.45 and IGL, 64.90.

with Apo and MnTMPyP we did not find a significant change in the width of the EGL at P12, P16 and P25 as compared to rats treated with saline (data not shown).

The thickness of ML in folium II decreased at P25 with Apo and MnTMPyP. Only MnTMPyP at P12 reduced the width in this layer (Fig. 6B). However, at P16 the width of the cerebellar ML increased with both treatments (Fig. 6B). The cerebellar internal layer showed an increment in the thickness at P12 by Apo treatment in folium II (Fig. 6B). The thickness of molecular layer in IX folium showed a tendency to decrease with Apo at P25. MnTMPyP showed a significant reduction of this folium at this age. However at P12 the width of the cerebellar ML increased with Apo. The thickness of the folium X in this layer decreased in animals treated with Apo and MnTMPyP only at P12 (Fig. 6B).

The internal granule layer (IGL) showed an increment in the thickness at the level of folium IX at P12 in animals treated with Apo (Fig. 6B). At P16 the width of the cerebellar IGL increased with both treatments (Fig. 6B). At P25, the Apo treatment increased the width of IGL. In contrast, MnTMPyP diminished the thickness of

IGL (Fig. 6B). The width of folium X in the IGL increased only at P12 with MnTMPyP (Fig. 6B).

In order to determine whether the morphological changes observed in cerebellar folia are caused by an alteration in the cell death, it was performed an immunohistochemical analysis of active caspase-3, which is a marker of apoptosis. Evaluation was performed at P16 when there is an important amount of dying cerebellar neurons (Altman, 1972a,b). Most of the caspase-3 positive cells were found in the surroundings of Purkinje cells bodies, mainly in the molecular layer (Supplementary Fig. 2). The number of positive cells was evaluated in cerebellar folia 1, 9 and 10 in animals treated with apocynin and MnTMPyP. Under these conditions it was not found any significant difference in the total number of caspase-3 positive cells in any of the cerebellar folia analyzed among the different groups (Table 2).

3.5. NADPH-oxidase inhibitor and antioxidant affect motor behavior

Motor activity and coordination were evaluated by rod walking and rotarod tests. Rats treated with Apo or MnTMPyP were tested for balance and coordination by assessing the time walking in wood rod (30 cm) and the time to remain in rotarod before to fall. Fig. 7A shows that the group treated with Apo and MnTMPyP displayed a significant increment in the time to cross the rod as compared to control animals. Approximately 40% of the evaluated animals treated with Apo and MnTMPyP fell before crossing the rod (data not shown).

The rotarod test revealed a significant difference between the groups treated with Apo or MnTMPyP and control rats. Post hoc analysis indicated that control animals showed a longer latency to remain on the rotating bar as compared to the groups treated with the NADPH-oxidase inhibitor or the antioxidant (Fig. 7B). As shown in Table 3, open-field locomotor activity was affected by Apo and MnTMPyP treatment. The distance traveled, ambulatory counts and time ambulatory decreased about 50% in Apo and MnTMPyP group. Jump counts and time jumping decreased about 70% in rats treated with Apo and MnTMPyP. Finally, only the antioxidant affected the vertical time and stereotypic counts, Apo treatment did not have any effect on these behaviors.

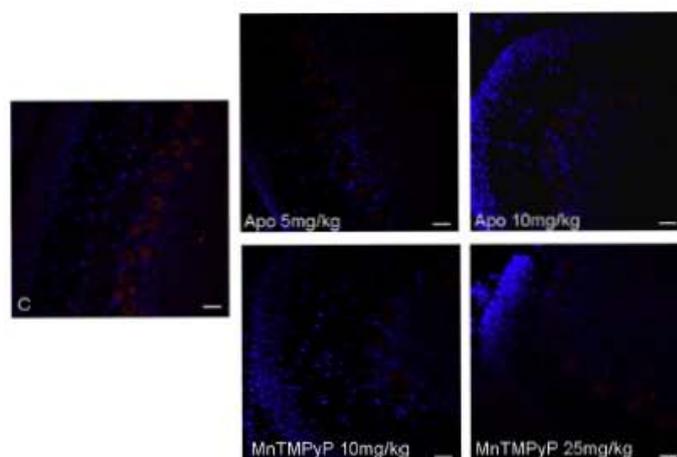


Fig. 3. Effect of a NADPH oxidase inhibitor and an antioxidant on the generation of ROS in rat cerebellum. Animal treatment for *in vivo* ROS detection with dihydroethidium (DHE) and DAPI staining were carried out as detailed in Section 2. Rats at P12 treated with 5 or 10 mg/kg apocynin (Apo), with 10 and 25 mg/kg MnTMPyP or without treatment (C) were assayed for ROS generation using confocal microscopy. Representative fluorescence photographs of rat cerebellum from 7 independent experiments. Bars correspond to 20 μ m.

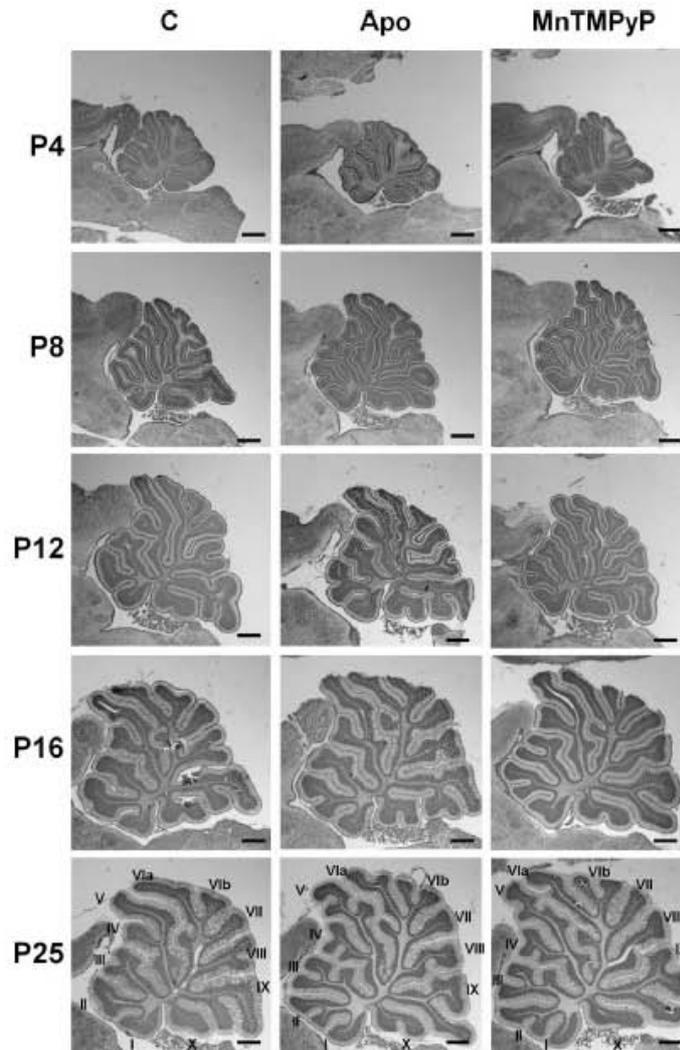


Fig. 4. Effect of a NADPH oxidase inhibitor and an antioxidant on the histology of developing rat cerebellum. Animal treatment and histological procedures were carried out as detailed in Section 2. Images show the foliation pattern of sagittal sections at 4, 8, 12, 16 and 25 postnatal day (P) in rat cerebellum treated with apocynin (Apo) 10 mg/kg, MnTMPyP (10 mg/kg) and without treatment (C). Representative photographs of rat cerebella of 12 independent experiments.

4. Discussion and conclusion

It has been shown that ROS regulate a variety of physiological processes such as proliferation, differentiation, migration and cell death during development in different cell types, including smooth muscle (Rao and Berk, 1992), fibroblasts (Burdon and Rice-Evans, 1989) aortic endothelial cells (Ruiz-Ginés et al., 2000), PC12 (Kato et al., 1997, 1999; Suzukawa et al., 2000), etc. In neural progenitor cells, ROS endogenously generated promote proliferative activity (Yoneyama et al., 2010). In hippocampal neurons, the observed high levels of superoxide anion (Bindokas et al., 1996) appear to modulate neuronal plasticity (Hongpaisan et al., 2004; Knapp and Klann, 2002). Furthermore, the levels of ROS in the nervous system appear to be regulated by the stage of development. Tsatmali and

Cols (2006) demonstrated that in cell cultures of embryonic rat cortex, multipotent neural progenitor cells contain low levels of ROS, while those with high levels of ROS corresponded to differentiated neurons. In turn, the proportion of the two types of neurons derived from the multipotent progenitor cells depended on the antioxidant treatment (Tsatmali et al., 2006).

In the present study, we found that during rat cerebellar development there was a differential ROS generation at different ages and regions of the cerebellum. The higher ROS levels were observed at P4 in most of the neurons of the three cerebellar layers. At P8, ROS production is also present in the three cerebellar layers, but in a lesser extent than at P4. At this time, the internal granule layer (IGL) shows a considerable number of condensed cells with higher levels of ROS than those detected in not condensed cells.

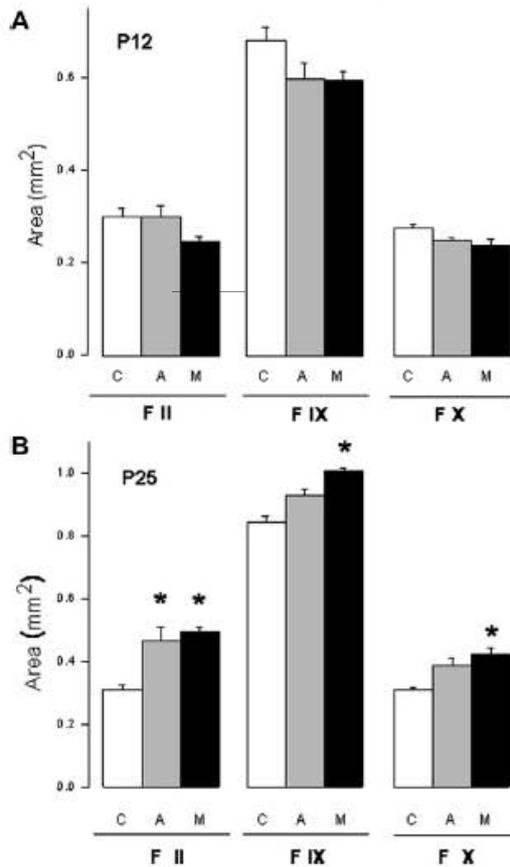


Fig. 5. Effect of a NADPH oxidase inhibitor and an antioxidant on the folia area. Animal treatment and histological procedures were carried out as detailed in Section 2. Total area of folia II, IX and X of rat cerebella at P12 (A) or P25 (B) treated with 10 mg/kg apocynin (A), 10 mg/kg MnTMPyP (M) or without treatment (C). Bars are means \pm SD of 8 independent experiments. * Significantly different from C. Statistical analysis was performed using the Tukey one-way analysis of variance with $p < 0.05$. F values for P12: folia 2, 2.86; folia 9, 2.87; folia 10, 4.84 and for P25: folia 2, 12.11; folia 9, 25.8 and folia 10, 9.33.

Previous papers reported that at this time there is an increase of the death of granule neurons in the IGL (Wood et al., 1993). The detected high levels of ROS at this age could be implicated, at least in part, in the apoptotic death of these cells, according to previous observations in an in vitro model (Valencia and Morán, 2004). At P12 and P16, ROS levels decreased in most of the cells of the external and molecular layer. In contrast, in the IGL the labeling of DHE was high at P4 and was gradually reduced until P12 and P16. At around P12 there is a raise in the radial migration of granule neurons (Hager et al., 1995). On the other hand, part of the ROS observed in the IGL at this time could be associated with the process of cerebellar granule neuron (CGN) elimination that still occurs at this time (Wood et al., 1993; Alavez et al., 2006). At P16, neither apocynin nor MnTMPyP treatments significantly modified the levels of active casp3 levels. As antioxidants clearly reduced DHE levels, it is possible to speculate that ROS levels are not related to apoptotic death at this age in those folia. At P25,

most of the processes involved in the development of the cerebellum are already completed; nevertheless, we observed ROS generation in the IGL. This could be related to changes in the levels of the antioxidant systems as it has been shown in homogenates of cerebellum at P30, where catalase and glutathione peroxidase are significantly decreased (Bhanja and Chainy, 2010).

Interestingly, the Purkinje cells were markedly labeled throughout the entire development of the cerebellum. These results are in agreement with previous studies showing elevated superoxide levels in cerebellar Purkinje cells in vitro (Quick and Dugan, 2001) as well as the expression of NOX2 and NOX4 in these cells. During development Purkinje cells start the growth of their dendritic trees from P6 to P30 (Sotelo and Dusart, 2009).

The NADPH-oxidase (NOX) complex generates superoxide anion and is constituted by several homologues, named by its catalytic subunits NOX1–5. In the nervous system, most of these homologues have been identified (Infanger et al., 2006), particularly in neurons (Tammariello et al., 2000; Vallet et al., 2005; Hao-rah et al., 2008; Coyoy et al., 2008) and astrocytes in culture (Abramov et al., 2005; Reinehr et al., 2007; Zhu et al., 2009). It has been demonstrated a physiological involvement of NOX in neuronal growth (Munnamalai and Suter, 2009; Ibi et al., 2006), programmed neuronal death (Tammariello et al., 2000; Coyoy et al., 2008) and neuronal proliferation and differentiation (Tsatmali et al., 2005, 2006). In the present study we described for the first time a differential expression of NOX homologues during rat cerebellar development. We detected the presence of mRNA and protein of Nox1, Nox2 and Nox4 as well as p22phox, p47phox, p67phox and NOXO1 in homogenates of cerebella at different ages. Our results coincide with previous studies in cultured CGN (Coyoy et al., 2008). We found that the mRNA expression of Nox1 was increased only at P8 and that Nox2 showed a slight increase at P12 and P16. In contrast, Nox4 mRNA showed a notable reduction from P16. This is partially in agreement with the observed reduction in the levels of Nox4 protein that was significant from P12 suggesting a translational regulation of NOX4 from this time. On the other hand, the modulator subunits p22phox, p47phox, p67phox and NOXO1 also reduced their expression from 8P to 12P.

In general, the protein levels of Nox1, Nox2 and Nox4 as well as p22phox and p67phox protein were higher at P4 than P25. This pattern coincided with the Nox activity and ROS levels. Particularly Nox2 protein increased at P8 and P16. At P12 Nox2 protein decreased in relation to P8 and this reduction coincided with Nox activity and ROS levels but the increase in Nox2 protein at P8 and P16 did not coincide with the activity of NOX. In contrast, Nox4 protein levels correlate with the measured levels of protein, NOX activity and ROS production at all ages measured. The observed differences could be due to the fact that the activity of NOX4 is constitutive (Ago et al., 2004; Paravicini et al., 2004), while NOX1 and NOX2 require to be activated. Thus, suggesting that different trophic conditions could modulate the activity of Nox1, Nox2 and/or 4 during development. It was also interesting to note that the protein levels of p67phox showed an increase at P8 and P12 that is in contrast to the observed reduction in its expression from P4, suggesting that this subunit could be regulated at a translational level. We cannot discard the possibility that part of the observed differences between RNA and protein are due to the different procedures, as they have different sensitivities.

To determine if NOX is a source of ROS in the cerebellum, we administrated apocynin (Apo), an inhibitor of this enzyme that has been previously tested in vitro and in vivo (Tang et al., 2008; Kelly et al., 2009; Hernández-Enríquez et al., 2011). In the present work, we found that Apo markedly decreased the ROS production in all the cerebellar layers at the ages tested. The administration of MnTMPyP, a mimetic of SOD/catalase that crosses the hemato-encephalic barrier and enters to the cells, produced similar effects.

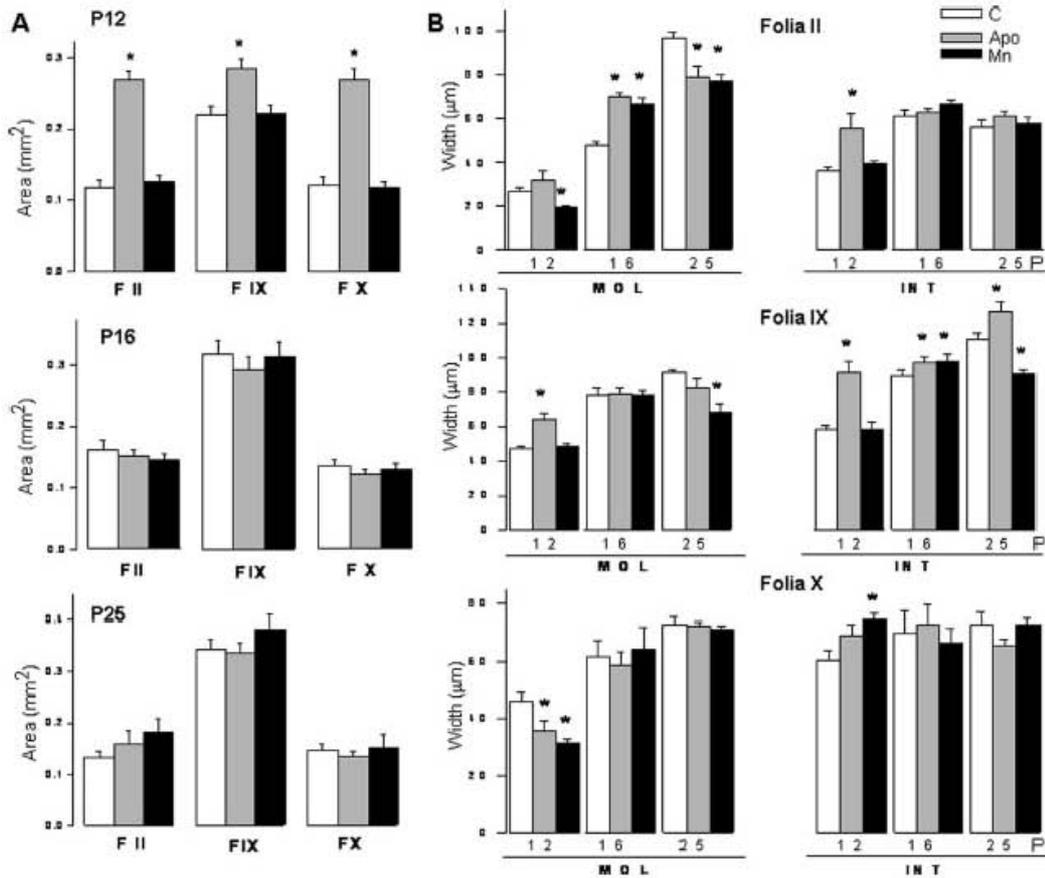


Fig. 6. Effect of a NADPH oxidase inhibitor and an antioxidant on the area of the internal granule layer and the thickness of cerebellar layers. Animal treatment and histological procedures were carried out as detailed in Section 2. Area of internal granule layer of cerebella (A) and thickness of molecular (MOL) and internal granule (INT) layers from cerebella (B) at P12, P16 and P25 rats treated with 10 mg/kg apocynin (gray bars), 10 mg/kg MnTMPyP (black bars) or without treatment (white bars). Bars are means \pm SD of 8–16 independent experiments. *Significantly different from C ($p < 0.05$). Statistical analysis was performed using the Tukey one-way analysis of variance.

Apocynin is considered an inhibitor of NOX (Stefanska and Pawliczak, 2008; Stolk et al., 1994; Tang et al., 2008; Kelly et al., 2009; Touyz, 2008; Johnson et al., 2002; Touyz et al., 2002; Barbieri et al., 2004). However, some studies in vitro suggest that apocynin could be an antioxidant rather than a NOX inhibitor (Heumuller et al.,

2008; Wind et al., 2010; Petrônio et al., 2013). It is well documented that apocynin is a prodrug that may be converted by peroxidase-mediated oxidation to a dimer, which has been suggested to be the active form of apocynin for inhibiting NOX (Johnson et al., 2002; Mora-Pale et al., 2009; Simons et al., 1990). The dual action

Table 2
Effect of apocynin and MnTMPyP on the activation of caspase-3 in developing rat cerebellum.

Cerebellar folia	Molecular layer						Internal granular layer					
	F1		F9		F10		F1		F9		F10	
	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	
Control	845.2 \pm 77.3		872.2 \pm 42.6		1155.9 \pm 69.3		1633 \pm 47.5		180 \pm 24.7		191 \pm 57.8	
Apocynin	934.2 \pm 72.3	0.37868	931.2 \pm 62.8	0.51565	1013 \pm 76.1	0.42837	2044 \pm 50.8	0.50089	170.2 \pm 49.3	0.84398	203.9 \pm 25.1	0.80646
MnTMPyP	717.3 \pm 27.1	0.21903	701 \pm 84.9	0.07921	855.6 \pm 175.6	0.09029	178.8 \pm 9.9	0.79673	223.7 \pm 34.5	0.34784	209.8 \pm 29.1	0.72943

Animal treatment and immunohistochemistry analysis of cleaved caspase-3 were carried out as detailed in Section 2. The number of positive cells per layer was determined counting the total number of cells per mm² in both molecular and internal granule layer of folia 1, 9 and 10. Values are mean \pm SEM of 3–5 independent experiments. No statistical differences were found in the number of positive cells for active caspase-3 between the control and experimental groups in any of the evaluated folia. The *F* values for each group of molecular layer are: F1, 2.3230; F9, 3.3920; F10, 1.8010. The *F* values for each group of internal granular layer are: F1, 0.2620; F9, 0.6670; F10, 0.0465.

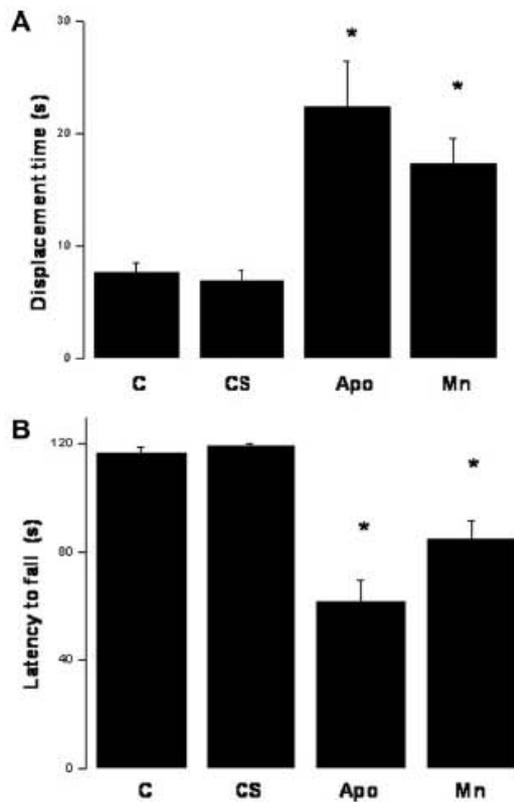


Fig. 7. Effect of a NADPH oxidase inhibitor and an antioxidant on the rat motor coordination. Animal treatment and behavioral evaluation were carried out as detailed in Section 2. (A) Displacement time in the rod of rats at P25 treated with 10 mg/kg apocynin (Apo), 10 mg/kg MnTMPyP (Mn), vehicle solution (CS) or without treatment (C). (B) Latency to fall from the rotarod of rats at P25 treated with 10 mg/kg apocynin (Apo) 10 mg/kg MnTMPyP (Mn), vehicle solution (CS) or without treatment (C). Bars are means \pm SD of 8–11 independent experiments. *Significantly different from CS. Statistical analysis was performed using the Tukey one-way analysis of variance with $p < 0.05$. *F* values for displacement, 7.77; latency, 10.9.

of apocynin seems to be restricted to *in vitro* rather than *in vivo* conditions, where this compound seems to be inhibitor of NOX. This has been explained by the fact that not all cells own the

enzymatic machinery for apocynin metabolism and therefore in some cell types in culture, it does not inhibit NOX activity (Heumüller et al., 2008; Wind et al., 2010). In contrast, several reports show that apocynin administered *in vivo* mediates its effect through the inhibition of NOX activity (Virdis et al., 2004; Kahles et al., 2007). Particularly, in the nervous system *in vivo*, apocynin has been reported to act as a NOX inhibitor as demonstrated in different models, including NOX2 deficient mice, and with diverse techniques, such as p67phox or p47phox translocation and p47phox phosphorylation, among others (Wang et al., 2007; Tang et al., 2007, 2008; Jackman et al., 2009; Kim et al., 2013; Choi et al., 2012; Song et al., *in press*; Kumar et al., 2012). In this regard, it is suggested that in *in vivo* studies the active form of apocynin, produced by cells able to metabolize it, may be exported to other tissues. Besides, it has been shown that myeloperoxidase (MPO) can be released from some cells and it can be taken up by other cells (Astern et al., 2007). Thus, apocynin can be metabolized extracellularly or by cells that do not express MPO, resulting in the presence of its active form in most tissues *in vivo* (see Touyz, 2008). Considering these arguments and previous results in cerebellar neurons where apocynin inhibits NOX activity (Hernández-Enríquez et al., 2011) we suggest that under our experimental conditions, apocynin could be acting mainly as a NOX inhibitor; however, we cannot discard the possibility that part of the observed effect could be due to an antioxidant action of this compound.

It remains to be determined the involvement of other sources of ROS such as the mitochondria. There is evidence showing a signaling link between the mitochondria and NOX for ROS generation in several experimental models, including cell death (Lee et al., 2006), the responses to angiotensin II (Wosniak et al., 2009) and the differentiation of mesencephalic precursors cells (Parga et al., 2010). Thus, the role of the mitochondrial ROS cannot be ignored in this study.

One interesting data was the effect in the foliation produced by Apo and MnTMPyP. These treatments induced an irregular sublobulation of the cerebellar cortex at all ages studied, being more evident at P25. Cerebellar foliation can be altered by different conditions such as hypothyroidism or an overexpression of sonic hedgehog (Corrales et al., 2004, 2006; Hasebe et al., 2008). Our results suggest that ROS could be also one of the factors implicated in foliation. One possibility is that ROS could participate in the cerebellar sublobulation through the control of some process such as the programmed death, as it has been demonstrated in several preparations (Valencia and Morán, 2001; Coyoy et al., 2008; Scherz-Shouval and Elazar, 2007; Sánchez-Carbente et al., 2005; Shen and Pervaiz, 2006; Ramiro-Cortés and Morán, 2009; Ramiro-Cortés et al., 2011). Our present results do not support this possibility as any of the antioxidant conditions modified the number of apoptotic cells in any of the evaluated folia. These studies were carried out at P16, therefore it remains to be evaluated the

Table 3
Effect of apocynin and MnTMPyP on locomotor behavior of rats in open field.

Condition	Distance traveled (cm)	Time stereotypic (s)	Stereotypic count	Time vertical (s)	Vertical count	Average velocity	Time ambulatory (s)	Ambulatory count	Ambulatory episodes	Time resting (s)	Jump count	Time jumping (s)
CC	987 \pm 113	124 \pm 21	1326 \pm 108	1020 \pm 102	548 \pm 47	11.32 \pm 0.75	123 \pm 23	1224 \pm 207	62.1 \pm 10	1526 \pm 56	54.7 \pm 16	24.5 \pm 3.6
CS	1035 \pm 122	148 \pm 24	1413 \pm 100	1423 \pm 104	422 \pm 80	11.54 \pm 0.44	108 \pm 29	1346 \pm 307	74.8 \pm 8	1526 \pm 49	40.9 \pm 14	17.3 \pm 4
Apo	494 \pm 53*	113 \pm 12	1248 \pm 120	1001 \pm 110	576 \pm 53	10.93 \pm 1	58 \pm 7*	504 \pm 63*	57.9 \pm 7	1622 \pm 22	14.3 \pm 2*	4.2 \pm 1*
MnTMPyP	346 \pm 43*	83 \pm 10*	916 \pm 116*	808 \pm 102*	354 \pm 55	9.59 \pm 1	45 \pm 9*	423 \pm 95*	37.2 \pm 7*	1664 \pm 21	17.9 \pm 8*	6.3 \pm 2*

Open-field locomotor activity was studied in rats at P25 (CC) treated with saline solution (CS), 10 mg/kg apocynin (Apo) or 10 mg/kg MnTMPyP. The parameters evaluated were distance traveled, time stereotypic, stereotypic count, time vertical, vertical count, average velocity, time ambulatory, ambulatory count, time resting, jump count and time jumping as detailed in Section 2. Data are means \pm SD of 10 independent experiments. *Significantly different from CS. Statistical analysis was performed using the Tukey one-way analysis of variance with $p < 0.05$. *F* value, 41.82.

possibility that the involvement of apoptosis in this process could take place earlier in development.

When we examined the cerebellar histoarchitecture of animals treated with MnTMPyP and Apo, we found that the total area of II, IX and X folia did not change at P12 with both treatments. In contrast, at P25 the total area of these folia was increased, especially with MnTMPyP. After P12, CGN continue migrating, and the process of maturation and cell death increases; therefore, the observed increase in the area of these folia occurring at P25 could be due to an alteration of any of these processes produced by a reduction in the levels of ROS.

The somatotopic studies show that the anterior lobe of cerebellum is the region that controls the fine movements of posterior extremities (Manni and Petrosini, 2004). This is in agreement with the observed alterations on the motor coordination of animals treated with Apo and MnTMPyP that induced alterations in these lobules, particularly lobules II and III, as well as the VI and IX lobules. A prominent effect observed in Apo and MnTMPyP treated rats in the open field was a significant reduction in the distance traveled, time ambulatory and jump count that represent parameters of locomotor coordination. Although the open field is an important tool for analyzing activity, the corresponding behavior is influenced by motivation to explore as well as by emotionality/anxiety. It seems unlikely that Apo treatment can alter the motivation to explore since vertical activity was not affected, but with the MnTMPyP we observed that the vertical activity was affected, thus an alteration in motivation cannot be excluded.

The Apo and MnTMPyP treatments were found to impair the performance of rats on the accelerating rotarod test that also indicates an alteration in motor coordination, thereby, these treatments change the foliation pattern and probably these alterations induce modifications on motor coordination.

In conclusion, ROS and NOX are important during cerebellar development. The ROS are generated by the neurons in the cerebellum on the three layers and the Apo and MnTMPyP decreased this production. The ROS and NOX inhibition during cerebellar development changed the foliation pattern and altered locomotor behavior. These results emphasize the important role of ROS and NOX during critical periods of cerebellar development.

Acknowledgments

The authors are grateful to Guadalupe Dominguez, Sitlali Ojguín-Reyes and Teresa Montiel for excellent technical assistance. This work was supported by DGAPA-UNAM (IN218310 and IN206213) and CONACYT (179234). Angélica Coyoy was supported by a CONACYT fellowship.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2013.03.009>.

References

- Abramov, A.Y., Jacobson, J., Wientjes, F., Hotherhall, J., Canevari, L., Duchon, M.R., 2005. Expression and modulation of an NADPH oxidase in mammalian astrocytes. *J. Neurosci.* 25, 9176–9184.
- Ago, T., Kitazono, T., Ooboshi, H., Iyama, T., Han, Y.H., Takada, J., Wakisaka, M., Ibayashi, S., Utsumi, H., Iida, M., 2004. Nox4 as the major catalytic component of an endothelial NAD(P)H oxidase. *Circulation* 109, 227–233.
- Alavez, S., Blancas, S., Morán, J., 2006. Effect of NMDA antagonists on the death of cerebellar granule neurons at different ages. *Neurosci. Lett.* 398, 241–245.
- Alder, J., Cho, N.K., Hatten, M.E., 1996. Embryonic precursor cells from the rhombic lip are specified to a cerebellar granule neuron identity. *Neuron* 17, 389–399.
- Allen, R.C., Tresini, M., 2000. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 463–499.
- Altman, J., 1972a. Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. 3. Maturation of the components of the granular layer. *J. Comp. Neurol.* 145, 465–513.
- Altman, J., 1972b. Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. I. The external germinal layer and the transitional molecular layer. *J. Comp. Neurol.* 145, 353–397.
- Altman, J., Bayer, S.A., 1985. Embryonic development of the rat cerebellum. I. Delineation of the cerebellar primordium and early cell movements. *J. Comp. Neurol.* 231, 1–26.
- Astern, J.M., Pendergraft, W.F., Falk, R.J., Jennette, J.C., Schmaier, A.H., Mahdi, F., Preston, G.A., 2007. Myeloperoxidase interacts with endothelial cell surface cytokeratin 1 and modulates bradykinin production by the plasma kallikrein-kinin system. *Am. J. Pathol.* 171, 349–360.
- Barbieri, S.S., Cavaka, V., Elgini, S., Brambilla, M., Caiati, A., Tremoli, E., Colli, S., 2004. Apocynin prevents cyclooxygenase 2 expression in human monocytes through NADPH oxidase and glutathione redox-dependent mechanisms. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 156–165.
- Bedard, K., Krause, K.H., 2007. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* 87, 245–313.
- Bhanja, S., Chai, G.B., 2010. PTH-induced hypothyroidism modulates antioxidant defence status in the developing cerebellum. *Int. J. Dev. Neurosci.* 28, 251–262.
- Bindokas, V.P., Jordan, J., Lee, C.C., Miller, R.J., 1996. Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. *J. Neurosci.* 16, 1324–1336.
- Bokoch, G.M., Kraus, U.G., 2003. NADPH oxidases: not just for leukocytes anymore! *Trends Biochem. Sci.* 28, 502–508.
- Bras, M., Queaman, B., Susin, S.A., 2005. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. *Biochemistry (Moscow)* 70, 231–239.
- Burdon, R.H., Rice-Evans, C., 1989. Free radicals and the regulation of mammalian cell proliferation. *Free Radic. Res. Commun.* 6, 345–358.
- Burgoyne, R.D., Cambray-Deakin, M.A., 1988. The cellular neurobiology of neuronal development: the cerebellar granule cell. *Brain Res.* 472, 77–101.
- Carrión, A., Carmona, M.C., Fernández, Y., Rigoulet, M., Wenger, R.H., Pénicaud, L., Castella, L., 2004. Mitochondrial reactive oxygen species control the transcription factor CHOP-10/GADD153 and adipocyte differentiation: a mechanism for hypoxia-dependent effect. *J. Biol. Chem.* 279, 40462–40469.
- Cho, Y.M., Kwon, S., Pak, Y.K., Seo, H.W., Choi, Y.M., Park, J., Park, K.S., Lee, H.K., 2006. Dynamic changes in mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during the spontaneous differentiation of human embryonic stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 348, 1472–1478.
- Choi, B.Y., Jang, B.G., Kim, J.H., Lee, B.E., Sohn, M., Song, H.K., Suh, S.W., 2012. Prevention of traumatic brain injury-induced neuronal death by inhibition of NADPH oxidase activation. *Brain Res.* 24, 49–58.
- Corrales, J.D., Rocco, G.L., Blaess, S., Guo, Q., Joyner, A.L., 2004. Spatial pattern of sonic hedgehog signaling through Gli genes during cerebellum development. *Development* 131, 5581–5590.
- Corrales, J.D., Blaess, S., Mahoney, E.M., Joyner, A.L., 2006. The level of sonic hedgehog signaling regulates the complexity of cerebellar foliation. *Development* 133, 1811–1821.
- Coyoy, A., Valencia, A., Guemez-Gamboa, A., Morán, J., 2008. Role of NADPH oxidase in the apoptotic death of cultured cerebellar granule neurons. *Free Radic. Biol. Med.* 45, 1056–1064.
- Davies, K.J., 1999. The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress. *IUBMB Life* 48, 41–47.
- DeGennaro, M., Lehmann, R., 2007. Redox regulation of germ cell migration in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 306, 383–384.
- Finkel, T., Holbrook, N.J., 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 239–247.
- Hager, G., Dodi, H.U., Zieglerberger, W., Liesi, P., 1995. Novel forms of neuronal migration in the rat cerebellum. *J. Neurosci. Res.* 40, 207–219.
- Haorah, J., Ramirez, S.H., Floriani, N., Gorantla, S., Morsey, B., Persidsky, Y., 2008. Mechanism of alcohol-induced oxidative stress and neuronal injury. *Free Radic. Biol. Med.* 45, 1542–1550.
- Harfouche, R., Malik, N.A., Brandes, R.P., Karsan, A., Irani, K., Hussain, S.N., 2005. Roles of reactive oxygen species in angiotensin-1/tie-2 receptor signaling. *FASEB J.* 19, 1728–1730.
- Hasebe, M., Matsumoto, I., Imagawa, T., Uehara, M., 2008. Effects of an anti-thyroid drug, methimazole, administration to rat dams on the cerebellar cortex development in their pups. *Int. J. Dev. Neurosci.* 26, 409–414.
- Hatten, M.E., 1993. The role of migration in central nervous system neuronal development. *Curr. Opin. Neurobiol.* 13, 38–44.
- Hernández-Enriquez, B., Guemez-Gamboa, A., Morán, J., 2011. Reactive oxygen species are related to ionic fluxes and volume decrease in apoptotic cerebellar granule neurons: role of NOX enzymes. *J. Neurochem.* 117, 654–664.
- Heumüller, S., Wind, S., Barbosa-Sicard, E., Schmidt, H.H., Busse, R., Schröder, K., Brandes, R.P., 2008. Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidases but an antioxidant. *Hypertension* 51, 211–217.
- Hongpaian, J., Winters, C.A., Andrews, S.B., 2004. Strong calcium entry activates mitochondrial superoxide generation, upregulating kinases signaling in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 24, 10878–10887.
- Hu, D., Serrano, F., Oury, T.D., Klann, E., 2006. Aging-dependent alterations in synaptic plasticity and memory in mice that overexpress extracellular superoxide dismutase. *J. Neurosci.* 26, 3933–3941.
- Hur, J., Lee, P., Kim, M.J., Kim, Y., Cho, Y.W., 2010. Ischemia-activated microglia induces neuronal injury via activation of gp91phox NADPH oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391, 1526–1530.

- Ibi, M., Katsuyama, M., Fan, C., Iwata, K., Nishinaka, T., Yokoyama, T., Yabe-Nishimura, C., 2006. NOX1/NADPH oxidase negatively regulates nerve growth factor-induced neurite outgrowth. *Free Radic. Biol. Med.* 40, 1785–1795.
- Ikebuchi, Y., Masumoto, N., Tasaka, K., Koike, K., Kasahara, K., Miyake, A., Tanizawa, O., 1991. Superoxide anion increases intracellular pH, intracellular free calcium, and arachidonic acid release in human amnion cells. *J. Biol. Chem.* 266, 13233–13237.
- Infanger, D.W., Sharma, R.V., Davison, R.L., 2006. NADPH oxidases of the brain: distribution, regulation, and function. *Antioxid. Redox Signal.* 8, 1583–1596.
- Jackman, K.A., Miller, A.A., De Silva, T.M., Crack, P.J., Drummond, G.R., Sobey, C.G., 2009. Reduction of cerebral infarct volume by apocynin requires pretreatment and is absent in Nox2-deficient mice. *Br. J. Pharmacol.* 156, 680–688.
- Johnson, D.K., Schillinger, K.J., Kwait, D.M., Hughes, C.V., McNamara, E.J., Ishmael, F., O'Donnell, R.W., Chang, M.M., Hogg, M.G., Dordick, J.S., Santhanam, L., Ziegler, L.M., Holland, J.A., 2002. Inhibition of NADPH oxidase activation in endothelial cells by ortho-methoxy-substituted catechols. *Endothelium* 9, 191–203.
- Kahles, T., Luedike, P., Endres, M., Galla, H.J., Steinmetz, H., Busse, R., Neumann-Haefelin, T., Brandes, R.P., 2007. NADPH oxidase plays a central role in blood-brain barrier damage in experimental stroke. *Stroke* 38, 3000–3006.
- Kamata, H., Hirata, H., 1999. Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal.* 11, 1–14.
- Kamata, H., Oka, S., Shibukawa, Y., Yakuta, J., Hirata, H., 2005. Redox regulation of nerve growth factor-induced neuronal differentiation of PC12 cells through modulation of the nerve growth factor receptor, TrkA. *Arch. Biochem. Biophys.* 434, 16–25.
- Katoh, S., Mitsui, Y., Kitani, K., Suzuki, T., 1997. Hyperoxia induces the differentiated neuronal phenotype of PC12 cells by producing reactive oxygen species. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 241, 347–351.
- Katoh, S., Mitsui, Y., Kitani, K., Suzuki, T., 1999. Hyperoxia induces the neuronal differentiated phenotype of PC12 cells via a sustained activity of mitogen-activated protein kinase induced by Bcl-2. *Biochem. J.* 338, 465–470.
- Kelly, K.A., Li, X., Tan, Z., VanGilder, R.L., Rosen, C.L., Huber, J.D., 2009. NOX2 inhibition with apocynin worsens stroke outcome in aged rats. *Brain Res.* 1292, 165–172.
- Kim, J.H., Jang, B.G., Choi, B.Y., Kim, H.S., Sohn, M., Chung, T.N., Choi, H.C., Song, H.K., Suh, S.W., 2013. Post-treatment of an NADPH oxidase inhibitor prevents seizure-induced neuronal death. *Brain Res.* 7, 163–172.
- Knapp, L.T., Klann, E., 2002. Role of reactive oxygen species in hippocampal long-term potentiation: contributory or inhibitory? *J. Neurosci. Res.* 70, 1–7.
- Kumar, A., Singh, B.K., Ahmad, I., Shukla, S., Patel, D.K., Srivastava, G., Kumar, V., Pandey, H.P., Singh, C., 2012. Involvement of NADPH oxidase and glutathione in zinc-induced dopaminergic neurodegeneration in rats: similarity with paraquat neurotoxicity. *Brain Res.* 1438, 48–64.
- Lambeth, J.D., 2004. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 181–189.
- Lambeth, J.D., 2007. Nox enzymes, ROS, and chronic disease: an example of antagonistic pleiotropy. *Free Radic. Biol. Med.* 43, 332–347.
- Lee, N.K., Choi, Y.G., Baik, J.Y., Han, S.Y., Jeong, D.W., Bae, Y.S., Kim, N., Lee, S.Y., 2005. A crucial role for reactive oxygen species in RANKL-induced osteoclast differentiation. *Blood* 106, 852–859.
- Lee, S.B., Bae, I.H., Bae, Y.S., Um, H.D., 2006. Link between mitochondria and NADPH oxidase 1 isozyme for the sustained production of reactive oxygen species and cell death. *J. Biol. Chem.* 281, 36228–36235.
- Li, J., Stofffs, M., Serrander, L., Banfi, B., Bettiol, E., Charnay, Y., Steger, K., Krause, K.H., Jaconi, M.E., 2006. The NADPH oxidase NOX4 drives cardiac differentiation: role in regulating cardiac transcription factors and MAP kinase activation. *Mol. Biol. Cell* 17, 3978–3988.
- Manni, E., Petrosini, L., 2004. A century of cerebellar somatotopy: a debated representation. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 241–249.
- Marin-Teva, J.L., Dusart, I., Colin, C., Gervais, A., van Rooijen, N., Mallat, M., 2004. Microglia promote the death of developing Purkinje cells. *Neuron* 41, 535–547.
- Miale, I.L., Sidman, R.L., 1961. An autoradiographic analysis of histogenesis in the mouse cerebellum. *Exp. Neurol.* 4, 277–296.
- Mora-Pale, M., Weiwler, M., Yu, J., Linhardt, R.J., Dordick, J.S., 2009. Inhibition of human vascular NADPH oxidase by apocynin derived oligophenols. *Bioorg. Med. Chem.* 17, 5146–5152.
- Morrison, S.J., Csete, M., Groves, A.K., Melega, W., Wold, B., Anderson, D.J., 2000. Culture in reduced levels of oxygen promotes clonogenic sympathoadrenal differentiation by isolated neural crest stem cells. *J. Neurosci.* 20, 7370–7376.
- Munnamalai, V., Suter, D.M., 2009. Reactive oxygen species regulate F-actin dynamics in neuronal growth cones and neurite outgrowth. *J. Neurochem.* 108, 644–661.
- Paravicini, T.M., Christobolis, S., Drummond, G.R., Sobey, C.G., 2004. Increased NADPH-oxidase activity and Nox4 expression during chronic hypertension is associated with enhanced cerebral vasodilatation to NADPH in vivo. *Stroke* 35, 584–589.
- Parga, J.A., Rodríguez-Pallares, J., Joglar, B., Díaz-Ruiz, C., Guerra, M.J., Labandeira-García, J.L., 2010. Effect of inhibitors of NADPH oxidase complex and mitochondrial ATP-sensitive potassium channels on generation of dopaminergic neurons from neurospheres of mesencephalic precursors. *239, 3247–3259.*
- Peshavariya, H.M., Dusting, G.J., Selemidis, S., 2007. Analysis of dihydroethidium fluorescence for the detection of intracellular and extracellular superoxide produced by NADPH oxidase. *Free Radic. Res.* 41, 699–712.
- Petronio, M.S., Zeraik, M.L., Fonseca, L.M., Ximenes, V.F., 2013. Apocynin: chemical and biophysical properties of a NADPH oxidase inhibitor. *Molecules* 18, 2821–2839.
- Prebisch, S., Saalfeld, S., Tomancak, P., 2009. Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions. *Bioinformatics* 25, 1463–1465.
- Quick, K.L., Dugan, L.L., 2001. Superoxide stress identifies neurons at-risk in a model of ataxia-telangiectasia. *Ann. Neurol.* 49, 627–635.
- Quinn, M.T., Gauss, K.A., 2004. Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with non-phagocyte oxidases. *J. Leukoc. Biol.* 76, 760–781.
- 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, 581–592.
- Ramiro-Cortés, Y., Guemez-Gamboa, A., Morán, J., 2011. Reactive oxygen species participate in the p38-mediated apoptosis induced by potassium deprivation and staurosporine in cerebellar granule neurons. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43, 1373–1382.
- Rao, G.N., Berk, B.C., 1992. Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circ. Res.* 70, 593–599.
- Reinehr, R., Görg, B., Becker, S., Quartskhava, N., Bidmon, H.J., Selbach, O., Haas, H.L., Schless, F., Häussinger, D., 2007. Hypoosmotic swelling and ammonia increase oxidative stress by NADPH oxidase in cultured astrocytes and vital brain slices. *Glia* 55, 758–771.
- Rozas, G., Guerra, M.J., Labandeira-García, J.L., 1997. An automated rotarod method for quantitative drug-free evaluation of overall motor deficits in rat models of parkinsonism. *Brain Res. Brain Res. Protoc.* 2, 75–84.
- Ruiz-Ginés, J.A., López-Ongil, S., González-Rubio, M., González-Santiago, L., Rodríguez-Puyol, M., Rodríguez-Puyol, D., 2000. Reactive oxygen species induce proliferation of bovine aortic endothelial cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 35, 109–113.
- Sánchez-Carbente, M.R., Castro-Obrégón, S., Covarrubias, L., Narváez, V., 2005. Motoneuronal death during spinal cord development is mediated by oxidative stress. *Cell Death Differ.* 12, 279–291.
- Sauer, H., Rahimi, G., Heschler, J., Wartenberg, M., 2000. Role of reactive oxygen species and phosphatidylinositol 3-kinase in cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells. *FEBS Lett.* 476, 218–223.
- Scherz-Shouval, R., Elizai, Z., 2007. ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. *Trends Cell Biol.* 17, 422–427.
- Shen, H.M., Pervaiz, S., 2006. TNF receptor superfamily-induced cell death: redox dependent execution. *FASEB J.* 20, 1589–1598.
- Simons, J., Hart, B.A., Ip Vai Ching, T.R., Van Dijk, H., Labadie, R.P., 1990. Metabolic activation of natural phenols into selective oxidative burst agonists by activated human neutrophils. *Free Radic. Biol. Med.* 8, 251–258.
- Smith, J., Ladi, E., Mayer-Proschel, M., Noble, M., 2000. Redox state is a central modulator of the balance between self-renewal and differentiation in a dividing glial precursor cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 10032–10037.
- Sorce, S., Krause, K.H., 2009. NOX enzymes in the central nervous system: from signaling to disease. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 2481–2504.
- Song, S.X., Gao, J.L., Wang, K.J., Li, R., Tian, Y.X., Wei, J.Q., Cui, J.Z., in press. Attenuation of brain edema and spatial learning deficits by the inhibition of NADPH oxidase activity using apocynin following diffuse traumatic brain injury in rats. *Mol. Med. Rep.* 7, 327–331.
- Sotelo, C., Dusart, I., 2009. Intrinsic versus extrinsic determinants during the development of Purkinje cell dendrites. *Neuroscience* 162, 589–600.
- Shpungin, S., Dotan, I., Abo, A., Pick, E., 1989. Activation of the superoxide forming NADPH oxidase in a cell-free system by sodium dodecyl sulfate. Absolute lipid dependence of the solubilized enzyme. *J. Biol. Chem.* 264, 9195–9203.
- Stefanska, J., Pawliczak, R., 2008. Apocynin: molecular aptitudes. *Mediators Inflamm.* 2008, 1–10.
- Stolk, J., Hiltermann, T.J., Dijkman, J.H., Verhoeven, A.J., 1994. Characteristics of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substituted catechol. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 11, 95–102.
- Studer, L., Csete, M., Lee, S.H., Kabbani, N., Wallkonis, J., Wold, B., McKay, R., 2000. Enhanced proliferation, survival, and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen. *J. Neurosci.* 20, 7377–7383.
- Suzukawa, K., Miura, K., Mitsuhashi, J., Resau, J., Hirose, K., Crystal, R., Kamata, T., 2000. Nerve growth factor-induced neuronal differentiation requires generation of Rac1-regulated reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.* 275, 13175–13178.
- Tammariello, S., Quinn, M., Estus, S., 2000. NADPH contributes directly to oxidative stress and apoptosis in nerve growth factor-deprived sympathetic neurons. *J. Neurosci.* 20, 1–5.
- Tang, L.L., Ye, K., Yang, X.F., Zheng, J.S., 2007. Apocynin attenuates cerebral infarction after transient focal ischaemia in rats. *J. Int. Med.* 262, 517–522.
- Tang, X.N., Cairns, B., Cairns, N., Yenari, M.A., 2008. Apocynin improves outcome in experimental stroke with a narrow dose range. *Neuroscience* 154, 556–562.
- Touyz, R.M., 2008. Apocynin, NADPH oxidase, and vascular cells: a complex matter. *Hypertension* 51, 172–174.
- Touyz, R.M., Chen, X., Tabet, F., Yao, G., He, G., Quinn, M.T., Pagano, P.J., Schiffrin, E.L., 2002. Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II. *Circ. Res.* 90, 1205–1213.
- Tsatmali, M., Walcott, E.C., Crossin, K.L., 2005. Newborn neurons acquire high levels of reactive oxygen species and increased mitochondrial proteins upon differentiation from progenitors. *Brain Res.* 1040, 137–150.

- Tsatmali, M., Walcott, E.C., Makarenkova, H., Crossin, K.L., 2006. Reactive oxygen species modulate the differentiation of neurons in clonal cortical cultures. *Mol. Cell. Neurosci.* 33, 345–357.
- Valencia, A., Morán, J., 2001. Role of oxidative stress in the apoptotic cell death of cultured cerebellar granule neurons. *J. Neurosci. Res.* 64, 284–297.
- Valencia, A., Morán, J., 2004. Reactive oxygen species induces different cell death mechanisms in cultured neurons. *Free Radic. Biol. Med.* 36, 1112–1125.
- Vallet, P., Charnay, Y., Steger, K., Ogier-Denis, E., Kovari, E., Hermann, F., Michel, J.P., Szanto, I., 2005. Neuronal expression of the NADPH oxidase Nox4, and its regulation in mouse experimental brain ischemia. *Neuroscience* 132, 233–238.
- Virdis, A., Neves, M.F., Amiri, F., Touyz, R.M., Schiffrin, E.L., 2004. Role of NAD(P)H oxidase on vascular alterations in angiotensin II-infused mice. *J. Hypertension* 22, 535–542.
- Wang, Q., Sun, A.Y., Simonyi, A., Kalogeris, T.J., Miller, D.K., Sun, G.Y., Korhuis, R.J., 2007. Ethanol preconditioning protects against ischemia/reperfusion induced brain damage: role of NADPH oxidase-derived ROS. *Free Radic. Biol. Med.* 43, 1048–1060.
- Wind, S., Beuerlein, K., Eucker, T., Müller, H., Scheurer, P., Armitage, M.E., Ho, H., Schmidt, H.H., Winkler, K., 2010. Comparative pharmacology of chemically distinct NADPH oxidase inhibitors. *Brit. J. Pharmacol.* 161, 885–898.
- Wood, K.A., Dipasquale, B., Youle, R.J., 1993. In situ labeling of granule cells for apoptosis-associated DNA fragmentation reveals different mechanisms of cell loss in developing cerebellum. *Neuron* 11, 612–632.
- Wosniak, J. Jr., Santos, C.X., Kowaltowski, A.J., Laurindo, F.R., 2009. Cross-talk between mitochondria and NADPH oxidase: effects of mild mitochondrial dysfunction on angiotensin II-mediated increase in Nox isoform expression and activity in vascular smooth muscle cells. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 1265–1278.
- Yoneyama, M., Kawada, K., Gotoh, Y., Shiba, T., Ogita, K., 2010. Endogenous reactive oxygen species are essential for proliferation of neural stem/progenitor cells. *Neurochem. Inter.* 56, 740–746.
- Zhu, D., Hu, C., Sheng, W., Tan, K.S., Haidekker, M.A., Sun, A.Y., Sun, G.Y., Lee, J.C., 2009. NAD(P)H oxidase-mediated reactive oxygen species production alters astrocyte membrane molecular order via phospholipase A2. *Biochem. J.* 421, 201–210.

REFERENCIAS

- Abramov, A. Y.; Jacobson, J.; Wientjes, F.; Hothersall, J.; Canevari, L.; Duchen, M. R. 2005. Expression and modulation of an NADPH oxidase in mammalian astrocytes. *J. Neurosci.* 25:9176–9184
- Alavez, S.; Blancas, S.; Morán, J. 2006. Effect of NMDA antagonists on the death of cerebellar granule neurons at different ages. *Neurosci. Lett.* 398:241-245.
- Altman, J. 1972. Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat: III. Maturation of the components of the granular layer. *J. Comp. Neur.* 145:465-514.
- Arsenio Núñez, M. L., Sotelo, C. 1985. Development in the spino cerebral system in the postnatal rat. *Journal Comparative Neurology.* 237:291-306.
- Babior BM. 2004. NADPH oxidase. *Curr. Opin. Immunol.* 16:42–47.
- Bedard K, Krause KH. 2007. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology.. *Physiol Rev* 87:245-313.
- Bhanja S, Chainy GB. 2010. PTU-induced hypothyroidism modulates antioxidant defence status in the developing cerebellum. *Int J Dev Neurosci.* 28:251-62.
- Bokoch GM, Diebold B, Kim JS, Gianni D. 2009. Emerging evidence for the importance of phosphorylation in the regulation of NADPH oxidases. *Antioxid Redox Signal.* 11:2429-41.
- Bokoch GM, Knaus UG. 2000. NADPH oxidases: not just for leukocytes anymore! *Trends Biochem. Sci.* 28:502–508.
- Boyden ES, Katoh A, Raymond JL. 2004. Cerebellum-dependent learning: the role of multiple plasticity mechanisms. *Annu Rev Neurosci* 27:581-609
- Brown DI, Griendling KK. 2009. Nox proteins in signal transduction. *Free Radic Biol Med.* 47:1239-53.
- Burdon, R.H.; Rice-Evans, C. 1989. Free radicals and the regulation of mammalian cell proliferation. *Free Radic. Res. Commun.* 6:345–358.
- Burgoyne, R., Cambray-Deakin, M. 1988. The cellular neurobiology of neuronal development: the cerebellar granule cell. *Brain Research Reviews.* 13: 77-101.
- Cheng G, Cao Z, Xu X, van Meir EG, Lambeth JD. 2001. Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene.* 269:131-40.
- Chizhikov V, Millen KJ. 2003. Development and malformations of the cerebellum in mice. *Mol Genet Metab.* 80:54-65.
- Choi H., Kim S., Mukhopadhyay P., Cho S., Woo J., Storz G, Ryu SE. 2001. Structural basis of the redox switch in the OxyR transcription factor. *Cell.* 105:103-13.
- Chung S, Jung W, Uhm DY, Ha TS, Park CS. 2002. Glutathione potentiates cloned rat brain large conductance Ca(2+)-activated K(+) channels (rSlo). *Neurosci Lett.* 318:9-12.
- Covarrubias L, Hernández-García D, Schnabel D, Salas-Vidal E, Castro-Obregón S. 2008. Function of reactive oxygen species during animal development: passive or active? *Dev Biol* 320:1-11.
- Corrales, J.D.; Rocco, G.L.; Blaess, S.; Guo, Q.; Joyner, A.L. 2004. Spatial pattern of sonic hedgehog signaling through Gli genes during cerebellum development. *Development.* 131:5581-5590.
- Coyoy, A.; Valencia, A.; Guemez-Gamboa, A.; Morán, J. 2008. Role of NADPH oxidase in the apoptotic death of cultured cerebellar granule neurons. *Free Radic. Biol. Med.* 45:1056–1064.
- De Zeeuw CI, Yeo CH. 2005. Time and tide in cerebellar memory formation. *Curr Opin Neurobiol.* 15:667-74.
- Driver AS, Kodavanti PR, Mundy WR. 2000. Age-related changes in reactive oxygen species production in rat brain homogenates. *Neurotoxicol Teratol.* 22:175-81.
- Dröge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82:47-95.
- Enroth C., Eger BT., Okamoto K., Nishino T., Nishino T., Pai EF. 2000. Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: structure-based mechanism of conversion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:10723-8.

- Fritz G, Kaina B. 1999. Activation of c-Jun N-terminal kinase 1 by UV irradiation is inhibited by wortmannin without affecting c-jun expression. *Mol Cell Biol.* 19:1768-74.
- Geiszt M. 2006. NADPH oxidases: new kids on the block. *Cardiovasc Res.* 71:289-9.
- Gutteridge JM, Halliwell B. 2010 Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochem Biophys Res Commun.* 393:561-4.
- Hager, G.; Dodt, H.U.; Zieglgansberger, W.; Liesi, P. 1995. Novel forms of neuronal migration in the rat cerebellum. *J. Neurosci. Res.* 40:207-219.
- Halliwell B. 1991. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med.* 91:14S-22S.
- Halliwell, B. 1992. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem.* 59:1609-23.
- Haorah, J.; Ramirez, S.H.; Floreani, N.; Gorantla, S.; Morsey, B.; Persidsky, Y. 2008. Mechanism of alcohol-induced oxidative stress and neuronal injury. *Free Radic. Biol. Med.* 45:1542-1550.
- Hasebe, M.; Matsumoto, I.; Imagawa, T.; Uehara, M. 2008. Effects of an anti-thyroid drug, methimazole, administration to rat dams on the cerebellar cortex development in their pups. *Int. J. Dev. Neurosci.* 26:409–414
- Hernández-Enríquez, B.; Guemez-Gamboa, A.; Morán, J. 2011. Reactive oxygen species are related to ionic fluxes and volume decrease in apoptotic cerebellar granule neurons: role of NOX enzymes. *J. Neurochem.* 117:654-64.
- Hernández-García D, Wood CD, Castro-Obregón S, Covarrubias L. 2010. Reactive oxygen species: A radical role in development? *Free Radic Biol Med.* 49:130-43.
- Hongpaisan, J.; Winters, C.A.; Andrews, S.B. 2004. Strong calcium entry activates mitochondrial superoxide generation, upregulating kinases signaling in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 24:10878– 10887.
- Ibi, M.; Katsuyama, M.; Fan, C.; Iwata, K.; Nishinaka, T.; Yokoyama, T.; Yabe-Nishimura, C. 2006. NOX1/NADPH oxidase negatively regulates nerve growth factor-induced neurite outgrowth. *Free Radic. Biol. Med.* 40:1785-1795.
- Ishikawa Y, Satoh T, Enokido Y, Nishio C, Ikeuchi T, Hatanaka H. 1999. Generation of reactive oxygen species, release of L-glutamate and activation of caspases are required for oxygen-induced apoptosis of embryonic hippocampal neurons in culture. *Brain Res.* 824:71-80.
- Ito M. 2006. Cerebellar circuitry as a neuronal machine. *Prog Neurobiol.* 78:272-303.
- Joshi G, Johnson JA 2012. The Nrf2-ARE pathway: a valuable therapeutic target for the treatment of neurodegenerative diseases. *Recent Pat CNS Drug Discov.* 7:218-29.
- Katoh, S.; Mitsui, Y.; Kitani, K.; Suzuki T. 1997. Hyperoxia induces the differentiated neuronal phenotype of PC12 cells by producing reactive oxygen species. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 241:347– 351.
- Katoh, S.; Mitsui, Y.; Kitani, K.; Suzuki T. 1999. Hyperoxia induces the neuronal differentiated phenotype of PC12 cells via a sustained activity of mitogen-activated protein kinase induced by Bcl-2. *Biochem. J.* 338:465– 470.
- Katsuyama M, Matsuno K, Yabe-Nishimura C. 2012. Physiological roles of NOX/NADPH oxidase, the superoxide-generating enzyme *J Clin Biochem Nutr.* 50:9-
- Kelly, K.A.; Li, X.; Tan, Z.; VanGilder, R.L.; Rosen, C.L.; Huber, J.D. 2009. NOX2 inhibition with apocynin worsens stroke outcome in aged rats. *Brain Res.* 1292:165-172.
- Klann, E. Thiels, E., 1999. Modulation of protein kinases and protein phosphatases by reactive oxygen species: implications for hippocampal synaptic plasticity. *Prog. Neuro-psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 23:359-376.
- Klotz LO, Briviba K, Sies H. 2000. Mitogen-activated protein kinase activation by singlet oxygen and ultraviolet A. *Methods Enzymol.* 319:130-43.
- Knapp, L. T., Klann, E. 2002. Role of reactive oxygen species in hippocampal long-term potentiation: contributory or inhibitory? *J. Neurosci. Res.* 70:1-7.
- Komuro H, Rakic P. 1993. Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science.* 260: 95-7.

- Komuro H, Yacubova E. 2003 Recent advances in cerebellar granule cell migration. *Cell Mol Life Sci.* 60:1084-98.
- Kushima, Y., Tsukui, H., Enokido, Y., Nishio, C., and Hatanaka, H. 1990. High oxygen atmosphere for neuronal cell culture with nerve growth factor. *Brain Res.* 536: 16-22.
- Li JM, Shah AM. 2003. ROS generation by nonphagocytic NADPH oxidase: potential relevance in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 14:S221-6.
- Lambeth JD. 2004. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 4:181-9.
- Lambeth JD, Cheng G, Arnold RS, Edens WA. 2000. Novel homologs of gp91phox. *Trends Biochem Sci.* 10:459-61.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., Cox, M. M. 2000. *Lehninger principles of biochemistry.* 3rd ed.
- Leto TL, Morand S, Hurt D, Ueyama T .2009. Targeting and regulation of reactive oxygen species generation by Nox family NADPH oxidases. *Antioxid Redox Signal.* 11:2607-19.
- Manni, E.; Petrosini, L. 2004. A century of cerebellar somatotopy: a debated representation. *Nat. Rev. Neurosci.* 5:241-249.
- Munnamalai, V.; Suter, D.M.2009. Reactive oxygen species regulate F-actin dynamics in neuronal growth cones and neurite outgrowth. *J. Neurochem.* 108:644-661.
- Mattson, M. P., Guthrie, P. B., Hayes, B. C., and Kater, S. B. 1989. *J. Neurosci.* 9: 1223-12230.
- Mattson, M. P., Lovell, M. A., Furukawa, K., and Markesbery, W. R. 1995. *J. Neurochem.* 65: 1740-1751.
- Mattson Mark P.1998. Free radicals, calcium, and the synaptic plasticity-cell death continuum: emerging roles of the transcription factor NFκB. *International review of neurobiology,* 42: 103-68.
- Moran J, Patel AJ.1989.Stimulation of the N-methyl-D-aspartate receptor promotes the biochemical differentiation of cerebellar granule neurons and astrocytes. *Brain Res.* 486:15-25.
- Morán, J. and Patel, A.J., 1989. Effect of potassium depolarization on phosphate-activated glutaminase activity in primary cultures of cerebellar granular neurons and astroglial cells during development. *Dev. Brain Res.* 46: 97-106.
- Morán, J., Itoh, T., Reddy U., Chen, M. and Pleasure D., 1999. Caspase-3 expression by cerebellar granule neurons is regulated by calcium and cyclic AMP. *J. Neurochem.* 73: 568-577.
- Morán, J., Alavez S, Rivera-Gaxiola M, Valencia A. ,and Hurtado, S. 1999. Effect of NMDA antagonists on the activity of glutaminase and aspartate aminotransferase in the developing rat cerebellum. *Int. J. Dev. Neurosci.* 17:55-65.
- Ohkuma, S. Katsura, M., Chen., D. Z., Guo, J. L., and Kuriyama, K. 1995. *Mol. Brain Res.* 34: 347-350.
- Paravicini, T.M.; Chrissobolis, S.; Drummond, G.R.; Sobey, C.G. 2004. Increased NADPH-oxidase activity and Nox4 expression during chronic hypertension is associated with enhanced cerebral vasodilatation to NADPH in vivo. *Stroke.* 35:584-589.
- Parga J.A., Rodríguez-Pallares J., Joglar B., Diaz-Ruiz C., Guerra M.J., Labandeira-Garcia J.L., 2010. Effect of inhibitors of NADPH oxidase complex and mitochondrial ATP-sensitive potassium channels on generation of dopaminergic neurons from neurospheres of mesencephalic precursors. *239: 3247-59.*
- Pineda-Molina E, Klatt P, Vázquez J, Marina A, García de Lacoba M, Pérez-Sala D, Lamas S. 2001. Glutathionylation of the p50 subunit of NF-κB: a mechanism for redox-induced inhibition of DNA binding. *Biochemistry.* 40:14134-42.
- Rao, G.N.; Berk, B.C. 1992. Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circ. Res.* 70:593-599.
- Reinehr, R.; Görg, B.; Becker, S.; Qvartskhava, N.; Bidmon, H.J.; Selbach, O.; Haas, H.L.; Schliess, F.; Häußinger, D. 2007. Hypoosmotic swelling and ammonia increase oxidative stress by NADPH oxidase in cultured astrocytes and vital brain slices. *Glia* 55:758-771.

- Roth KA, D'Sa C. 2001. Apoptosis y brain development. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 7:261-266
- Roussel MF, Hatten ME. 2011 Cerebellum development and medulloblastoma. *Curr Top Dev Biol.* 94:235-82.
- Ruiz-Ginés J.A.; López-Ongil S.; González-Rubio, M.; González-Santiago, L.; Rodríguez-Puyol, M.; Rodríguez-Puyol, D.2000. Reactive oxygen species induce proliferation of bovine aortic endothelial cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 35:109–113.
- Scarpa, A., Rogo, P., Viglino, R., Stevanato, F., Bracco, L., Battistin.1987. Age dependence of the level of the enzymes involved in the protection against active oxygen species in the rat brain. *Proc Soc Exp Biol Med* 185: 129-133
- Schmahmann JD, Caplan D. 2006. Cognition, emotion and the cerebellum.. *Brain.*129:290-2.
- Schreiber, D. Megow, A. Raupach, I.V. Victorov, U. Dimagl. 1995. Age-related changes of oxygen free radical production in the rat brain slice after hypoxia: On-line measurement using enhanced chemiluminescence,. *Brain Res* 703: 227-230.
- Schulz JB, Weller M, Klockgether T. 1996. Potassium deprivation-induced apoptosis in cerebellar granule neurons: a sequential requirement for new mRNA and protein synthesis, ICE-like protease activity, and reactive oxygen species. *J Neurosci,* 16: 4696-4706.
- Shpungin S., Dotan I., Abo A., Pick E., 1989. Activation of the superoxide forming NADPH oxidase in a cell-free system by sodium dodecyl sulfate. Absolute lipid dependence of the solubilized enzyme. *J Biol Chem.* 264: 9195-203.
- Song S.X., Gao J.L., Wang K.J., Li R., Tian Y.X., Wei J.Q., Cui J.Z., 2012. Attenuation of brain edema and spatial learning deficits by the inhibition of NADPH oxidase activity using apocynin following diffuse traumatic brain injury in rats. *Mol Med Rep.* (en prensa)
- Sorce S, Krause KH. 2009. NOX enzymes in the central nervous system: from signaling to disease. *Antioxid Redox Signal.*11:2481-504.
- Sotelo, C.; Dusart, I.2009. Intrinsic versus extrinsic determinants during the development of Purkinje cell dendrites. *Neurosci.* 162:589–600.
- Stadtman ER, Berlett BS. 1998. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Drug Metab Rev.* 30:225-43.
- Sudarov A., Joyner AL. 2007. Cerebellum morphogenesis: the foliation pattern is orchestrated by multi-cellular anchoring centers.*Neural Dev.* 3:2-26.
- Sumimoto H. 2008. Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *FEBS J* 275:3249-77.
- Suzukawa, K., Miura, K., Mitsushita, J. Resau, J., Kamata, T., 2000 Nerve growth factor-induced neuronal differentiation requires generation of rac1-regulated reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.* 275, 13175-13178.
- Tang, X.N. ; Cairns, B. ; Cairns, N.; Yenari, M.A.2008. Apocynin improves outcome in experimental stroke with a narrow dose range. *Neurosc.* 154:556-562.
- Taddei, M.L.; Parri, M.; Mello, T.; Catalano, A.; Levine, A.D.; Raugei, G.; Ramponi, G.; Chiarugi, P. 2007. Integrin-mediated cell adhesion and spreading engage different sources of reactive oxygen species. *Antioxid Redox Signal.* 9:469-481.
- Tanaka, M., Momoi T., Marunouchi, T. 2000. In situ detection of activated caspase 3 in apoptotic granule neuron in the developing cerebellum in vivo. *Dev. Brain Res.*121:223-228.
- Tammariello S, Quinn M, Estus S. 2000. NADPH oxidase contributes directly to oxidative stress and apoptosis in nerve growth factor-deprived sympathetic neurons. *J Neurosci.* 20: 1-5.
- Tejada-Simon, Faridis Serrano, Laura E., Villasana, Mark T. Quinn, and Eric Clan. 2005. Synaptic localization of a functional NADPH oxidase in the mouse hippocampus. *Mol. Cell. Neurosci.* 29: 97-106.
- Toone WM, Morgan BA, Jones N. 2001. Redox control of AP-1-like factors in yeast and beyond. *Oncogene.* 20:2336-46.

- Tsatmali, M.; Walcott, E.C.; Crossin, K.L. Newborn neurons acquire high levels of reactive oxygen species and increased mitochondrial proteins upon differentiation from progenitors. *Brain Res.* 1040:137–150; 2005.
- Tsatmali, M.; Walcott, E.C.; Makarenkova, H.; Crossin, K.L. Reactive oxygen species modulate the differentiation of neurons in clonal cortical cultures. *Mol. Cell. Neurosci.* 33:345–357; 2006.
- Valencia A, Morán J. 2001. Role of oxidative stress in the apoptotic cell death of cultured cerebellar granule neurons. *J Neurosci Res.* 64: 284-297.
- Valencia A y Morán J. 2004. Reactive oxygen species induce different cell death mechanisms in cultured cerebellar granule cells. *Free Radical Biology & Medicine* 36: 1112-1125.
- Vallet, P.; Charnay, Y.; Steger, K.; Ogier-Denis, E.; Kovari, E.; Hermann, F.; Michel, J.P.; Szanto, I. 2005. Neuronal expression of the NADPH oxidase Nox4, and its regulation in mouse experimental brain ischemia. *Neurosci.* 132:233–238.
- Wang T, Zhang X, Li JJ. 2002. The role of NF-kappaB in the regulation of cell stress responses. *Int Immunopharmacol.* 2:1509-20.
- Wang VY, Zoghbi HY. 2001 Genetic regulation of cerebellar development.. *Nat Rev Neurosci.* 2:484-91.
- Wood, K.A.; Dipasquale, B.; Youle, R.J. 1993. In situ labeling of granule cells for apoptosis-associated DNA fragmentation reveals different mechanisms of cell loss in developing cerebellum. *Neuron* 11:612–632.
- Wosniak J. Jr., Santos C.X., Kowaltowski A.J., Laurindo F.R. Cross-talk between mitochondria and NADPH oxidase: effects of mild mitochondrial dysfunction on angiotensin II-mediated increase in Nox isoform expression and activity in vascular smooth muscle cells. *Antioxid Redox Signal.* 11:1265-78.
- Yang S. Madyastha P. Bingel S. Ries W., Key L. 2001. A new superoxide-generating oxidase in murine osteoclasts.. *J. Biol Chem* 276: 5452-5458.
- Zhu, D.; Hu, C.; Sheng, W.; Tan, K.S.; Haidekker, M.A.; Sun, A.Y.; Sun, G.Y.; Lee, J.C. 2009. NAD(P)H oxidase-mediated reactive oxygen species production alters astrocyte membrane molecular order via phospholipase A2. *Biochem. J.* 421:201-210.