



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

PAPEL DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y LA NADPH-OXIDASA  
EN LA MADURACIÓN DE LAS NEURONAS GRANULARES DEL CEREBELO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Q. Sandra Mónica González Martínez

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Julio Morán Andrade  
[Instituto de Fisiología Celular](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Diana Escalante Alcalde  
[Instituto de Fisiología Celular](#)

Dr. Ignacio Camacho Arroyo  
[Facultad de Química](#)

MÉXICO, D. F. MARZO, 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **AGRADECIMIENTOS**

Esta tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Julio Morán Andrade, en la División de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular en la Universidad Nacional Autónoma de México.

El trabajo se llevó a cabo con financiamiento de la DGAPA-UNAM (donativo IN206213) y del CONACYT (donativo 179234). Durante la realización de esta tesis de maestría la alumna recibió una beca para estudios de posgrado por parte de CONACYT.

La realización de este proyecto contó con el apoyo técnico de la M. en C. Guadalupe Domínguez.

# ÍNDICE

<b>1. ABREVIATURAS</b>	<b>4</b>
<b>2. RESUMEN</b>	<b>5</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN</b>	
<b>3.1. MADURACIÓN DE LAS NEURONAS GRANULARES DEL CEREBELO</b>	<b>7</b>
<b>3.1.1. EL RECEPTOR NMDA EN LA MADURACIÓN NEURONAL</b>	<b>10</b>
<b>3.2. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO</b>	<b>11</b>
<b>3.3. NADPH OXIDASAS</b>	<b>14</b>
<b>4. ANTECEDENTES</b>	<b>20</b>
<b>5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>22</b>
<b>6. HIPÓTESIS</b>	<b>23</b>
<b>7. OBJETIVOS</b>	
<b>7.1. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>23</b>
<b>7.2. OBJETIVOS PARTICULARES</b>	<b>23</b>
<b>8. MÉTODOS</b>	
<b>8.1. CULTIVO DE NEURONAS GRANULARES DE CEREBELO</b>	<b>24</b>
<b>8.2. VIABILIDAD CELULAR</b>	<b>24</b>
<b>8.3. CRECIMIENTO NEURÍTICO</b>	<b>25</b>
<b>8.4. MIGRACIÓN NEURONAL</b>	<b>26</b>
<b>8.5. MEDICIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO</b>	<b>26</b>
<b>8.6. ANÁLISIS DE DATOS</b>	<b>27</b>
<b>9. RESULTADOS</b>	
<b>9.1. VIABILIDAD CELULAR</b>	<b>27</b>
<b>9.2. MIGRACIÓN NEURONAL</b>	<b>33</b>
<b>9.3. CRECIMIENTO NEURÍTICO</b>	<b>34</b>
<b>9.4. NIVELES DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO</b>	<b>41</b>
<b>10. DISCUSIÓN</b>	<b>44</b>
<b>11. CONCLUSIONES</b>	<b>49</b>
<b>12. FIGURAS SUPLEMENTARIAS</b>	<b>50</b>
<b>13. REFERENCIAS</b>	<b>55</b>

## 1. ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AEBSF	4-(2-aminoetil)- <b>bencenesulfonilfluoruro</b>
AMPc	Adenosín Monofosfato cíclico
ANOVA	Análisis de Varianza
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor
CCP	Capa de Células de Purkinje
CGE	Capa Granular Externa
CGI	Capa Granular Interna
CM	Capa Molecular
DAG	Diacil glicerol
DHE	Dihidroetidio
DIV	Días <i>in vitro</i>
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
EUK-134	Cloro[[2,2'-[1,2-etanodilbis[(nitrilo-κN)metilidina]]bis[6-metoxifenolato-κO]]]-manganeso
FAD	Flavín Adenín Dinucleótido
GPx	Glutación Peroxidasa
GSH	Glutación reducido
IP	Yoduro de Propidio
IP3	Inositol trifosfato
K25	K <sup>+</sup> 25 mM
K5	K <sup>+</sup> 5 mM
MAPK	Proteína Cinasas Activadas por Mitógenos
MBE	Medio Basal Eagle
MnTMPyP	Pentacloruro de manganeso(III)tetrakis(1-metil-4-piridil)porfirina
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato reducido
NGC	Neuronas Granulares del Cerebelo
NMDA	N-metil-D-aspartato
NOX	NADPH oxidasa
PI3K	Fosfoinositol 3-Cinasa
PKH26	PKH26 rojo fluorescente
SEM	Standard Error of the Mean (Error estándar de la media)
SNC	Sistema Nervioso Central
SOD	Superóxido Dismutasa

## 2. RESUMEN

Hay evidencia creciente que ha revelado el papel fundamental de las especies reactivas de oxígeno (ERO) en las enfermedades neurodegenerativas, así como en procesos fisiológicos y del desarrollo. Sin embargo, los mecanismos mediante los cuales se ejerce tal influencia no se conocen con claridad. Las NADPH oxidasas (NOX) se consideran una de las fuentes principales de ERO. Se sabe que la inhibición de las NOX afecta negativamente la diferenciación neuronal, el crecimiento axónico y la neurogénesis. En estudios *in vivo* de nuestro grupo, observamos niveles diferenciales tanto de ERO como de la expresión de homólogos de NOX durante el desarrollo del cerebelo de rata. También encontramos cambios significativos en la foliación del cerebelo por el tratamiento con antioxidantes e inhibidores de NOX. Todos estos resultados sugieren que las ERO y las NOX juegan un papel importante en el desarrollo del cerebelo. Por otro lado, hemos observado que condiciones despolarizantes (25 mM KCl, K25) o la presencia de N-metil-D-aspartato (NMDA) promueven tanto la supervivencia como la maduración y diferenciación neuronal en cultivos de neuronas granulares del cerebelo (NGC) de rata.

En este trabajo evaluamos la posibilidad de que las ERO producidas por alguna NOX estén involucradas en las acciones tróficas de K25 y NMDA en las NGC. Para evaluar dicha posibilidad, se evaluaron algunos eventos relacionados con el desarrollo del cerebelo tales como la migración neuronal, el crecimiento neurítico y la supervivencia de NGC promovidos por K25 o NMDA bajo condiciones antioxidantes. Se utilizaron dos antioxidantes, el pentacloruro de manganeso(III)tetrakis(1-metil-4-piridil)porfirina (MnTMPyP) y el Cloro[[2,2'-[1,2-etanodilbis[(nitrilo-κN)metilidina]]bis[6-metoxifenolato-κO]]]-manganeso (EUK-134), así como dos inhibidores de NOX, la apocinina y el 4-(2-aminoetil)-**bencenesulfonilfluoruro** (AEBSF). Bajo estas condiciones, encontramos que el antioxidante MnTMPyP y los dos inhibidores de las NOX reducen en un 50% la velocidad de migración neuronal. Además, MnTMPyP y apocinina redujeron el efecto de K25 y NMDA en la supervivencia de las NGC hasta en un 80%. Por último, no observamos efectos significativos de los antioxidantes e inhibidores de NOX en el crecimiento neurítico. Estos resultados sugieren que las ERO tienen un

papel crítico en algunos eventos del desarrollo de las NGC, que algunas de las acciones tróficas inducidas por la despolarización y NMDA parecen estar mediadas por ERO y que las NOX son probablemente las responsables de su producción.

### **ABSTRACT**

Increasing evidence reveals a fundamental role of reactive oxygen species (ROS) in neurodegenerative diseases, but also in physiological and developmental processes. However, the mechanisms underlying such influence remain unclear. NADPH oxidases (NOX) are thought to be one of the main sources of ROS. Furthermore, the inhibition of NOX negatively affects neuronal differentiation, axon growth, and neurogenesis. From previous studies of our group, we observed that depolarizing conditions (25 mM KCl, K25) and N-methyl-D-aspartate (NMDA) promote neuronal maturation and survival of cultured rat cerebellar granule neurons (CGN). Besides, we have observed *in vivo* a differential expression of both ROS levels and NOX homologues in developing rat cerebellum, as well as a significant change in cerebellum foliation by chronic treatment with an antioxidant or with a NOX inhibitor. All these results suggest that ROS and NOX may play an important role during cerebellar development.

In this work, we evaluated whether ROS and NOX are involved in the trophic actions exerted by NMDA and K25 in CGN. In order to evaluate this possibility, we treated CGN with the antioxidants MnTMPyP and EuK-134, as well as the NOX inhibitors apocynin and AEBSF and studied some events related to the development of cerebellum, including neuronal migration, neurite outgrowth, and cell death. Under these conditions, we observed that the antioxidant MnTMPyP and both NOX inhibitors reduced 50% the rate of neuronal migration. In addition, MnTMPyP and apocynin reduced the rescue effect of NMDA and K25 on CGN survival up to 80%. Finally, there was no significant effect of antioxidants or NOX inhibitors on CGN neurite outgrowth. These results suggest that ROS may play a critical role in some developmental processes of CGN and that the trophic actions of potassium depolarization and NMDA receptor activation seem to be mediated by ROS probably produced by a NADPH oxidase.

### **3. INTRODUCCIÓN**

Anteriormente se consideraba improbable que enzimas generadoras de especies reactivas de oxígeno (ERO), como las NADPH oxidasas (NOX), se expresaran en neuronas, dada su sensibilidad al daño oxidativo. Actualmente se sabe que al menos los homólogos NOX1, NOX2, NOX3 y NOX4 se expresan en neuronas (Coyoy et al., 2008; Infanger et al., 2006). Hay evidencia creciente de que los radicales libres y otras especies reactivas juegan un papel fundamental no sólo en la muerte neuronal y en enfermedades neurodegenerativas, sino en procesos fisiológicos naturales que contribuyen al desarrollo y mantenimiento de un organismo. Dada la reactividad de las ERO, su efecto biológico depende de su localización y concentración intracelular. De hecho, algunas ERO como el peróxido de hidrógeno presentan baja reactividad favoreciendo su participación en la comunicación intracelular. Sin embargo, los mecanismos por los cuales las ERO influyen los procesos fisiológicos no se conocen claramente. Uno de los procesos fisiológicos en los que se ha observado una participación de las ERO como señales intracelulares es el desarrollo del sistema nervioso. En mamíferos, uno de los modelos de desarrollo más estudiado es el cerebelo y, en particular, las neuronas granulares del cerebelo (NGC), por lo que representa un modelo adecuado para conocer la participación de las ERO en el desarrollo neuronal. A continuación se describen los eventos en la maduración de las NGC y algunas acciones tróficas que la regulan.

#### **3.1. MADURACIÓN DE LAS NEURONAS GRANULARES DEL CEREBELO**

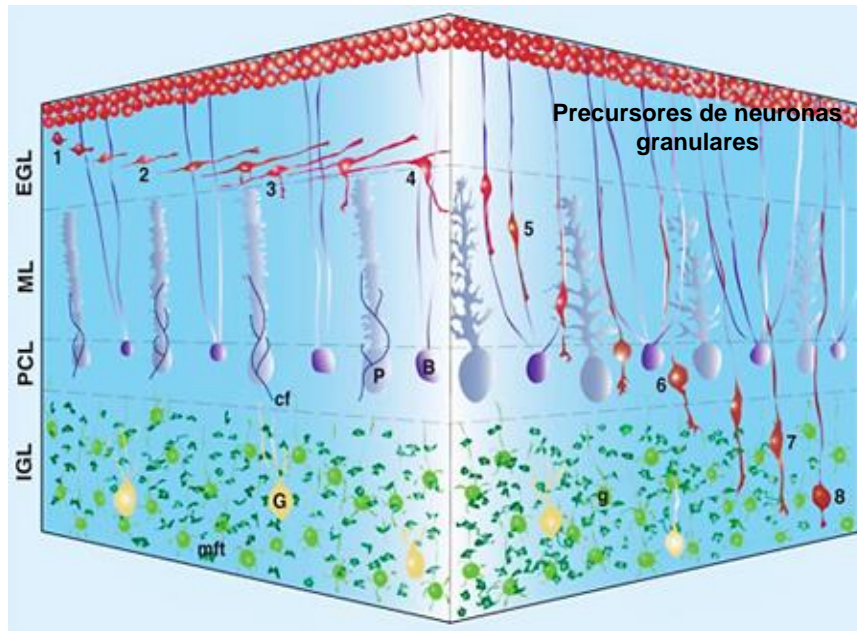
Se considera que el cerebelo participa fundamentalmente en la coordinación motora, aunque también se ha visto que está involucrado en algunas funciones no motoras como la cognición, las emociones y el comportamiento. El cerebelo está compuesto fundamentalmente por 6 tipos de neuronas: células de Purkinje, células de Golgi, células de Lugaro, células de canasta, células estrelladas y NGC.



Las NGC son las neuronas más abundantes en esta región. Se sitúan en la capa granular del cerebelo y proyectan sus axones hacia la capa molecular, donde se bifurcan formando las fibras paralelas, las cuales contactan a los árboles dendríticos de las células de Purkinje. A su vez las NGC reciben aferencias excitadoras de las fibras musgosas (Carey, 2011; Apps y Garwicz, 2005). En el desarrollo del sistema nervioso las neuronas pasan por etapas identificables: neurogénesis, proliferación, migración, crecimiento neurítico y formación de contactos sinápticos (Powell et al., 1997). En ratas, este proceso de desarrollo concluye alrededor de la tercera semana postnatal.

Durante el desarrollo postnatal temprano del cerebelo los precursores de las NGC proliferan activamente en la capa granular externa (CGE). Su diferenciación comienza en la etapa postmitótica, migrando tangencialmente desde la CGE donde ocurre la formación de dos procesos axonales desiguales y paralelos a las capas de la corteza, siendo el más largo el que indica la dirección de la migración. La migración de las NGC inmaduras puede ocurrir entre el día postnatal 2 (P2) y el P15, tardando aproximadamente dos días en completarse. En la capa molecular (CM) ocurre un cambio en el modo de migración, la célula se vuelve más compleja en su morfología extendiendo un tercer proceso hacia la capa granular interna que servirá como guía en la migración por medio de la glía radial. Simultáneamente se forman las fibras paralelas que permanecen en la CM mientras que el soma continúa migrando. Por lo tanto, las neuronas granulares del cerebelo siempre dejan una neurita en la CM que les permite tener contacto permanentemente con el sitio donde nacieron. Al llegar a la capa de células de Purkinje (CCP) permanece la migración radial -aunque con menor velocidad y con fases estacionarias- mientras que una neurita delgada conecta el soma con las fibras paralelas. Una vez que llegan a la capa granular interna (CGI), las células granulares forman dendritas que establecerán contactos sinápticos con las fibras musgosas alrededor de P5, pero estos contactos se consideran funcionales hasta los días P10 a P12, cuando concluye la migración (Sotelo, 2004; Powell et al., 1997). Una vez que se establecen las conexiones apropiadas entre las neuronas,

aquellas que son redundantes se eliminan apoptóticamente (Alavez et al., 2006).



**Figura 1. Migración de las neuronas granulares del cerebelo (Komuro y Yacubova, 2003).** (1) Las NGC comienzan la migración tangencial luego de la mitosis, al tiempo que forman dos procesos paralelos a la corteza. (2) La migración tangencial continúa a través de la capa granular externa (EGL); los procesos paralelos crecen de manera desigual, siendo el más largo el que dirige la migración. (3) Al final de la EGL la neurona extiende un tercer proceso perpendicular a la corteza. (4) En la capa molecular (ML) inicia la migración radial. (5) La glía de Bergman media la migración radial. (6) La neurona disminuye su velocidad y se detiene en la capa de células de Purkinje (PCL). (7) La célula migra hasta la capa granular interna (IGL). (8) La neurona se detiene y desarrolla dendritas que contactarán con las fibras musgosas. B, glía de Bergman; cf, fibras trepadoras; G, células de Golgi; g, neuronas granulares postmigratoria; mft, terminal de las fibras musgosas; P, células de Purkinje.

La maduración neuronal depende de la programación genética intrínseca, así como de las acciones ejercidas por factores tróficos en el ambiente. Las neurotrofinas, los factores de crecimiento y los neurotransmisores son algunos de los factores que se sabe intervienen en distintas etapas de la maduración de las neuronas. Los neurotransmisores, durante el desarrollo, actúan incluso antes de la formación de sinapsis. Así, se conoce su papel en el crecimiento de neuritas (Day et al., 2014; Persico et al., 2006), en la modificación de la

ultraestructura celular (Meier et al., 1985) y en la muerte celular (Iacovitti et al., 1999). En este sentido, durante el desarrollo las NGC reciben influencias glutamatérgicas de las fibras musgosas que determinan la sobrevivencia de estas neuronas. *In vitro*, se ha observado que las influencias presinápticas de las fibras musgosas pueden ser mimetizada por la activación de los receptores glutamatérgicos tipo NMDA localizados en las NGC o mediante condiciones despolarizantes utilizando concentraciones altas de potasio (25 mM KCl; K25).

### **3.1.1. EL RECEPTOR NMDA EN LA MADURACIÓN NEURONAL**

*In vivo*, el glutamato ejerce un efecto trófico mediado por la activación del receptor ionotrópico N-metil-D-aspartato (NMDA). Sólo las NGC que establecen conexiones con las fibras musgosas y reciben su estímulo glutamatérgico sobreviven y se diferencian.

Los receptores NMDA son ionotrópicos, están ampliamente expresados en el sistema nervioso central y tienen un papel importante en la transmisión sináptica excitadora. Forman complejos heterotetraméricos constituidos por subunidades llamadas GluN1, GluN2 y GluN3. Su activación requiere de la unión simultánea de dos co-agonistas: glutamato y glicina. Las subunidades NR1 y NR3, cuando este último está presente, forman el dominio de unión al ligando activado por glicina, mientras que la subunidad NR2 corresponde al dominio de unión a ligando activado por glutamato (Paoletti y Neyton, 2007). Estos receptores forman un poro sensible a voltaje y con alta afinidad por  $Mg^{2+}$  extracelular. Además poseen sitios de unión a inhibidores alostéricos como  $Zn^{2+}$  e ifenprodil y su actividad puede ser modulada por poliaminas. El  $Mg^{2+}$  que bloquea el poro es removido cuando ocurre una despolarización a través de la activación de otro receptor glutamatérgico de tipo AMPA/Kaínico (Komuro y Yacubova, 2003).

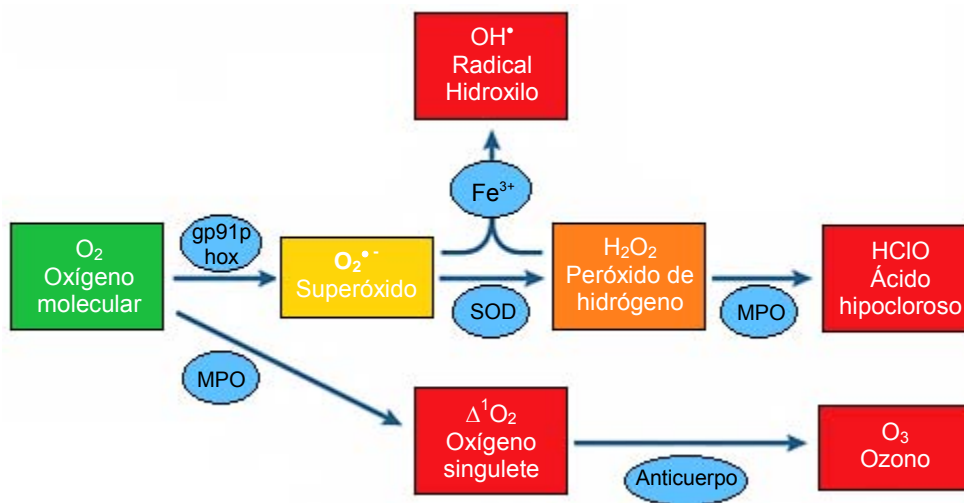
La expresión de las subunidades que conforman al receptor presenta cambios característicos a lo largo del desarrollo del sistema nervioso central, indicando una acción específica en cada etapa del mismo. En las NGC post mitóticas, los receptores NMDA son funcionales cuando dejan la capa granular externa. Durante este periodo de migración, la subunidad GluN2B es predominante pero su expresión disminuye una vez que las neuronas llegan a la capa granular interna. Paralelo a este cambio ocurre el aumento en la expresión de la subunidad GluN2C. Por otro lado, a partir de la primera semana postnatal comienza a expresarse la subunidad GluN2A, la cual permanece en las NGC maduras junto con las subunidades GluN2C y GluN1 (Tárnok et al.; 2008).

En cultivos de rata, tanto la activación del receptor NMDA como la despolarización con potasio podrían simular la inervación glutamatérgica de las fibras musgosas mediante mecanismos que dependientes de  $Ca^{2+}$ , ya que el receptor permite la entrada de este ion. En consecuencia, el aumento en la concentración de calcio podría llevar a la producción de segundos mensajeros como el adenosín monofosfato cíclico (AMPC), el inositol trifosfato (IP3) o el diacil glicerol (DAG) y activar las vías de las proteína cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y la fosfoinositol 3-cinasa (PI3K) que pueden promover la supervivencia de las células (Bazán-Peregrino et al., 2007; Zhu et al., 2002). En el sistema nervioso maduro, en condiciones fisiológicas, la actividad del receptor NMDA está involucrada en la transmisión sináptica y otras acciones como el crecimiento neuronal y la plasticidad sináptica, pero su excitación excesiva en diferentes enfermedades del Sistema Nervioso Central (SNC) puede ocasionar la muerte neuronal (Tai y Truong, 2007; Fan y Raymond, 2007).

A pesar de que no se ha esclarecido con precisión su función, se ha descrito que un evento temprano en la activación del receptor tipo NMDA es la producción de ERO, habiéndose propuesto que las ERO podrían actuar como segundos mensajeros en este y otros sistemas de neurotransmisión (Dugan et al., 1995; Lafon-Cazal et al., 1993).

### 3.2. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Las ERO son moléculas pequeñas derivadas del oxígeno, como los radicales hidroxilo ( $\text{OH}^\bullet$ ), superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), peróxido ( $\text{RO}_2^\bullet$ ) y alcoxilo ( $\text{ROH}^\bullet$ ), y otros agentes oxidantes como el ácido hipocloroso ( $\text{HClO}$ ), el ozono ( $\text{O}_3$ ), el oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Estas especies son generadas por una cascada de reacciones que inicia con la producción del superóxido, incapaz de atravesar membranas biológicas, que rápidamente dismuta a peróxido de hidrógeno (Figura 2). La dismutación puede ocurrir espontáneamente a pH bajo o por su catálisis por la superóxido dismutasa. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede atravesar fácilmente las membranas biológicas y producir otras especies reactivas como el radical hidroxilo o el ácido hipocloroso.



**Figura 2. Generación de especies reactivas de oxígeno (modificada de Lambeth, 2004).** Las ERO suelen producirse a partir de superóxido, el cual es relativamente poco reactivo con moléculas biológicas. Una vez que el  $\text{O}_2$  se reduce a  $\text{O}_2^{\bullet-}$  éste dismuta a  $\text{H}_2\text{O}_2$  en una reacción que puede estar catalizada por la superóxido dismutasa. También es posible la reducción de  $\text{Fe}^{3+}$  por el anión  $\text{O}_2^{\bullet-}$  para formar el radical  $\text{OH}^\bullet$ . Por otro lado, el peróxido de hidrógeno genera  $\text{HClO}$  en presencia de la enzima mieloperoxidasa, misma enzima que puede catalizar la producción de oxígeno singlete. Este último puede derivar en ozono en una reacción catalizada por anticuerpos.

La mayoría de las ERO que normalmente se producen en los sistemas biológicos provienen del metabolismo oxidativo mitocondrial, de la actividad de la enzima xantina oxidasa y en menor proporción de la autooxidación de catecolaminas y hemoproteínas que ocurren en el citoplasma, membrana nuclear, retículo endoplásmico y peroxisomas (Álvarez Fernández et al., 2010). Se han identificado alrededor de 10 sistemas mitocondriales generadores de ERO. Dentro de estos sistemas, los complejos enzimáticos del ciclo de Krebs, como la  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa, se consideran fuentes importantes de superóxido y peróxido de hidrógeno (Halliwell, 2001).

Las ERO pueden reaccionar fácilmente tanto con macromoléculas orgánicas como con sales inorgánicas. Cuando reaccionan con moléculas inorgánicas pequeñas pueden ocurrir, por ejemplo, la reacción de Fenton catalizadas por hierro y la reacción del superóxido con óxido nítrico para producir peroxinitrito (Bedard y Krause, 2007). En el caso de reacciones con proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos, las ERO pueden provocar pérdida de la funcionalidad de la molécula y por lo tanto daño celular oxidativo de manera irreversible.

Las ERO también participan en la regulación de diversos procesos fisiológicos modulando el estado redox de moléculas de señalización intracelular o factores de transcripción, como es el caso de la producción de óxido nítrico y la regulación del tono vascular. Las ERO están involucradas en la respuesta inmune, la detección de cambios de presión del oxígeno en sangre; la migración y proliferación de células endoteliales, fibroblastos y de músculo liso; la cardiomiogénesis, la angiogénesis, la morfogénesis, la diferenciación de células troncales y la plasticidad sináptica (Valko et al., 2007; Covarrubias et al., 2008). Cabe mencionar que la producción de especies reactivas se ha visto en numerosos tipos celulares cuando son estimulados por citocinas, factores de crecimiento y hormonas. Tanto las acciones oxidantes dañinas como de señalización de las ERO resultan importantes en la fisiopatología de

varias enfermedades humanas, incluyendo algunas que afectan al sistema nervioso.

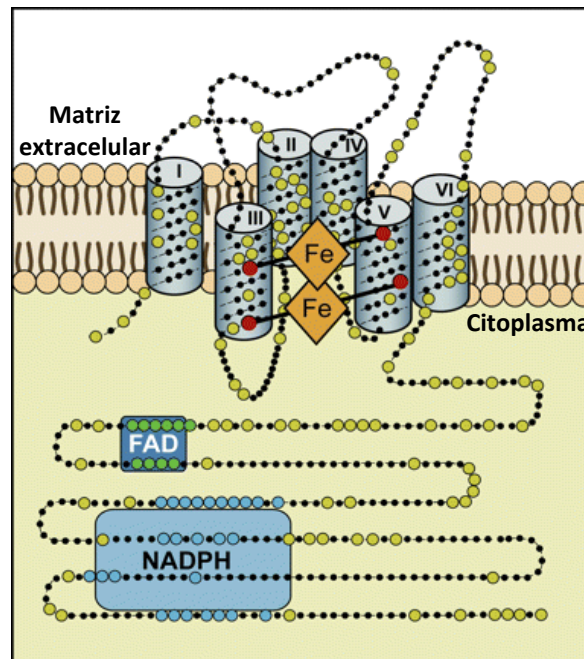
El organismo tiene mecanismos de defensa para el control de una excesiva producción de radicales libres a través de especies que atrapan radicales libres, de antioxidantes como el glutatión reducido (GSH), la vitamina C y el  $\beta$ -caroteno, y de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y la glutatión peroxidasa (GPx). Sin embargo, cuando la generación de radicales libres excede la capacidad de defensa antioxidante, ocurre el estrés oxidativo. Este estrés es el producto de una excesiva formación de ERO y especies reactivas de nitrógeno, así como de la disminución en la eficacia de los sistemas antioxidantes endógenos. Estos confluyen en la alteración estructural y funcional de las macromoléculas orgánicas, llevando a las células afectadas a procesos disfuncionales y a la muerte por necrosis o apoptosis (Halliwell, 2001).

### **3.3. NADPH OXIDASAS**

Uno de los principales sistemas celulares generadores de ERO, particularmente en procesos fisiológicos es la familia de las NADPH oxidasas o NOX. Resulta interesante el hecho de que, entre todas las fuentes celulares de ERO, la NOX es la única cuya función exclusiva conocida es la generación de ERO. En el caso del resto de las fuentes, la producción de ERO es un producto secundario resultante de la actividad principal de estas fuentes que se asocian a algún proceso metabólico. En mamíferos, la familia de las NOX comprende 7 homólogos multiméricos que catalizan la transferencia, a través de la membrana, de un electrón desde el NADPH hacia el  $O_2$  con la formación de radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ). Cinco de estas enzimas se conocen como NOX1 a NOX5 y además hay dos oxidasas duales, que adicionalmente poseen un dominio con actividad peroxidasa, conocidas como DUOX1 y DUOX2. Las NOX requieren de una molécula de FAD, dos grupos hemo y un sitio de unión a NADPH como cofactores. Durante la transferencia de electrones éstos pasan

desde el NADPH hacia el FAD, del FAD a los grupos hemo y de los grupos hemo al  $O_2$ .

Tras la activación de las NOX, la liberación de protones  $H^+$  hacia el lado citosólico produce una rápida despolarización de la membrana plasmática y la acidificación del medio intracelular. Estos cambios son compensados por la existencia de un canal de protones, formado por la proteína gp91phox en la propia estructura del sistema enzimático, que permite el escape de éstos hacia el lado extracelular. Las NADPH-oxidasas están formadas por varias proteínas que se encuentran distribuidas entre el citoplasma y la membrana plasmática cuando la célula está inactiva. En su mayoría, los componentes tienen que ser transportados desde el citosol a la membrana plasmática donde ocurre el ensamblaje del complejo funcional.



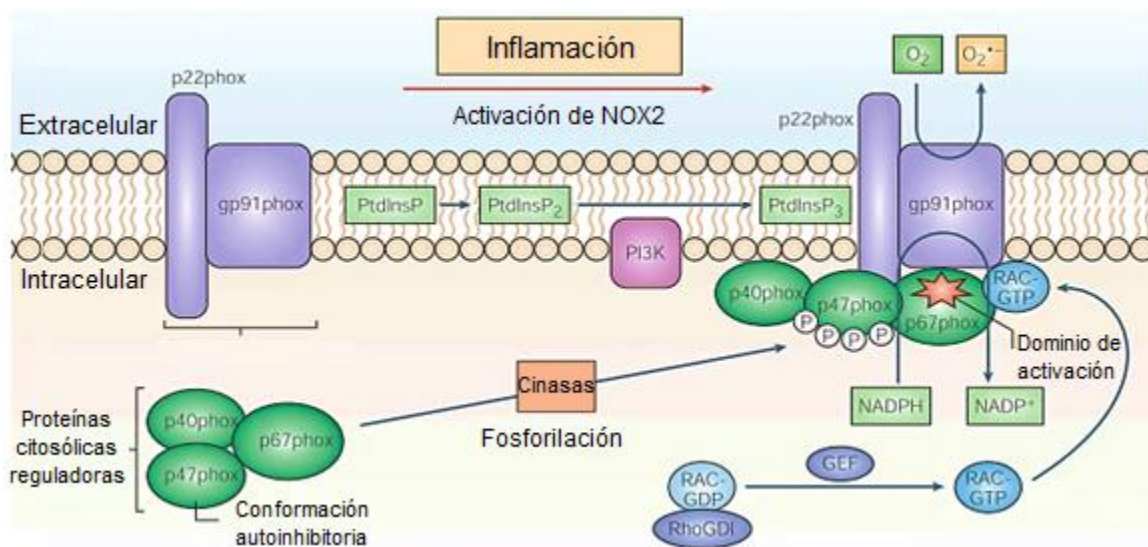
**Figura 3. Flavocitocromo b558 (Bedard y Krause, 2007).** El flavocitocromo b558 tiene 6 dominios transmembranales. Los dominios III y V contienen dos grupos hemo y los dominios de unión a NADPH y FAD se encuentran en el citoplasma.

La NOX originalmente descrita en macrófagos está compuesta por cinco subunidades: gp91phox o NOX2, p22phox, p47phox, p67phox y p40phox.



NOX2 y p22phox son proteínas de membrana que forman el núcleo catalítico de la enzima, llamado flavocitocromo b558 (figura 3), mientras que p67phox, p47phox y p40phox son subunidades reguladoras. Todas la NOX tienen 6 dominios transmembranales altamente conservados, de los cuales los dominios III y V son los que contienen los dos grupos hemo. También están conservados los dominios de unión a NADPH y FAD, que se encuentran en el citoplasma.

La activación del complejo enzimático depende de la unión de todos sus componentes (figura 4) y está regulado por la proteína GTPasa Rac. Una vez ensambladas las subunidades, el transporte de un electrón en el flavocitocromo b558 comienza en el dominio de unión a NADPH, de NADPH el electrón se transfiere a FAD, luego al hierro(II) del primer grupo hemo, de ahí al segundo hierro(II) y por último a una molécula de oxígeno.



**Figura 4. Activación de NOX2 en fagocitos (modificada de Lambeth, 2004).** El complejo de las proteínas citosólicas reguladoras (p40phox/p47phox/p67phox) se transloca al flavocitocromo b558 (gp91phox y p22phox). La interacción de p67phox con gp91phox es fundamental debido a que p67phox contiene dos dominios SH3 necesarios para la activación de la NOX. 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 TPR de p67phox, ayudando al ensamblaje de la enzima y coadyuvando a su activación

Los homólogos NOX1, 3 y 4 también son proteínas transmembranales asociadas a la subunidad p22phox pero con distintos mecanismos de activación y localización intracelular. Se pensaba que la NOX se expresaba únicamente en células fagocíticas, sin embargo, se ha demostrado que también existen homólogos que se expresan en células no fagocíticas de mamíferos. A pesar de que las NOX están ampliamente distribuidas en varios tejidos, puede encontrarse una mayor expresión en tejidos específicos: NOX1 está más expresada en colon (Geiszt et al., 2003; Suh et al., 1999), NOX2 en macrófagos (Royer-Pokora et al., 1986), NOX3 en el oído interno y NOX4 en riñón (Cheng et al., 2001; Geiszt et al., 2000). Respecto a NOX5, ésta se expresa más en testículos y nodos linfáticos, mientras que DUOX1 y 2 se encuentran en la tiroides (Banfi et al., 2001; De Deken et al., 2000). No se sabe mucho de estos últimos tres homólogos de NOX en el sistema nervioso central.

Además de formar parte de la defensa antimicrobiana en los fagocitos (Cross y Segal, 2004), las NOX tienen otras funciones en diversos tipos celulares. Por medio de los radicales libres que producen, se sabe que las NOX pueden influir directamente en las funciones de la célula oxidando proteínas como las fosfatasa de tirosina, canales iónicos o factores de transcripción, y por lo tanto modificando la estructura y función de las mismas. Particularmente en el Sistema Nervioso Central, se ha reportado que las ERO y las enzimas NOX están involucradas en las funciones, tanto fisiológicas como patológicas, que se describen a continuación (Bedard y Krause, 2007):

Señalización neuronal. Las NOX podrían estar regulando el potencial de membrana en las neuronas. La producción de ERO implica el transporte de electrones a través de la membrana, lo cual provoca la despolarización de la célula. Por cada electrón transportado se libera un protón al citoplasma. Este hecho es especialmente importante en las neuronas puesto que su actividad depende del potencial de membrana. De una manera similar a la fosforilación de proteínas, la oxidación de proteínas que se produce por las ERO es usada en

muchas vías de señalización en respuesta a hormonas y factores de crecimiento (Lambeth, 2004). Uno de los receptores que las ERO podrían estar modulando es el receptor a NMDA. Como se mencionó anteriormente, la activación del receptor NMDA está ligada a la supervivencia celular, función que requiere de una regulación muy precisa. Dicha activación es dependiente de ligando. El receptor NMDA también es regulado por el potencial redox puesto que la reducción u oxidación de los residuos de cisteína en las subunidades del receptor modifican la conformación del canal y promueven la entrada o el bloqueo de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , respectivamente. Adicionalmente, se ha encontrado que el efecto de las ERO sobre la actividad del receptor NMDA es dependiente de la concentración (Lipton et al., 2002).

Diferenciación neuronal. Se ha descrito un claro papel de las ERO en la diferenciación neuronal (Tsatmali et al., 2006; Vieira et al., 2011). Las NOX podrían estar involucradas en tal efecto como se ha visto en células PC12, en las cuales la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  generado por NOX influye en la diferenciación y el crecimiento neurítico promovido por NGF por medio de la fosforilación de Rac1 y la activación del factor de transcripción AP-1 (Ibi et al., 2006; Suzukawa et al., 2000).

Muerte neuronal. Las ERO pueden desencadenar la apoptosis, ya sea dañando directamente al ADN, lípidos o proteínas, o mediando la activación de moléculas de señalización. La mayoría de las investigaciones relacionadas con NADPH oxidasas en neuronas se han enfocado en la muerte generada por la producción excesiva de ERO. Se ha propuesto que las NOX tienen un papel fundamental en la muerte celular dependiente de ERO, sin embargo, el homólogo involucrado depende del estímulo que induce la apoptosis (Guemez-Gamboa y Morán, 2009).

Activación de la glía e inflamación. La microglía responde al daño neuronal y a patógenos liberando especies citotóxicas y mediadores de la inflamación, entre las cuales se encuentran las ERO (Qin et al., 2013; Shechter, y Schwartz,

2013). Diversos procesos fisiológicos en los cuales está involucrada la glía y la activación de la microglía están regulados por la producción de ERO, incluyendo la respuesta inflamatoria, la proliferación celular, la inducción de la apoptosis neuronal durante el desarrollo y la liberación de neurotransmisores.

En la mayoría de los casos, el papel de las NOX ha sido evaluado por el uso de inhibidores no específicos de estas enzimas. En este trabajo se utilizaron dos inhibidores de las NOX:

- **Apocinina:** La 4-hidroxi-3-metoxiacetofenona es un compuesto fenólico descrito como un inhibidor de baja afinidad ( $IC_{50} \sim 10 \mu M$ ). Su estudio sobre el efecto de la NADPH oxidasa del fagocito sugiere que la apocinina debe ser metabolizada por las peroxidasas para generar el compuesto inhibidor diapocinina, el cual impide la translocación de las subunidades p47phox y p67phox a las subunidades localizadas en la membrana. Dependiendo del tipo celular, puede actuar como inhibidor de NOX o como un antioxidante puesto que reacciona rápidamente con  $H_2O_2$ . Para actuar como inhibidor de NOX requiere que se metabolice por mieloperoxidasas, las cuales no están presentes en todas las células (Petrônio et al., 2013). En las NGC la apocinina actúa preferentemente como inhibidor de NOX (Coyoy et al., 2013). Este compuesto ha sido utilizado en pacientes asmáticos y personas sanas sin mostrar toxicidad (Stefanska et al., 2012; Stefanska et al., 2010).
- **AEBSF:** El 4-(2-aminoetil)-bencenesulfonilfluoruro (AEBSF) inhibe las enzimas NOX mediante la interferencia de la asociación de la subunidad citoplasmática p47phox. No es claro si AEBSF realmente inhibe las NADPH oxidasas o si actúa en etapas de señalización hacia la activación de p47phox. Se ha descrito que este compuesto también inhibe proteasas de serina.

#### **4. ANTECEDENTES**

Cuando las neuronas granulares del cerebelo se obtienen de ratas de 8 días postnatales y se cultivan en concentraciones bajas de  $K^+$  (5 mM; K5) por más de 5 días, las células mueren por apoptosis (Morán et al., 2000). Por el contrario, cuando se cultivan en condiciones de  $K^+$  alto (25 mM; K25) o en presencia de agonistas de los receptores tipo NMDA, la supervivencia y la diferenciación de las células aumenta claramente (Alavez et al., 1996; Rossi y Slater, 1993). Como se mencionó, se cree que las condiciones despolarizantes de  $K^+$  podrían simular el estímulo glutamatérgico que reciben las NGC de las fibras musgosas. Este estímulo también puede ser simulado mediante la activación del receptor NMDA. El tratamiento de los cultivos con NMDA incrementa la supervivencia entre 50% y 60%, pero cuando el receptor NMDA se bloquea en cultivos obtenidos de ratas P2 a P8 la supervivencia disminuye entre el 20% y el 40% (Alavez et al., 2006).

En trabajos previos de nuestro grupo se ha observado que el NMDA y el factor neurotrófico derivado del cerebro BDNF disminuyen la muerte celular de las NGC sembradas en condiciones de potasio bajo (Bazán-Peregrino et al., 2007). Por otro lado, se ha sugerido que la estimulación del receptor NMDA puede provocar la liberación de BDNF y así favorecer la supervivencia de las NGC. Además, esta acción trófica disminuye la actividad de la caspasa-9, que se favorece en condiciones de baja concentración de  $K^+$ .

Se sabe que algunos estímulos externos que actúan a través de receptores membranales regulan la señalización intracelular que controla la migración. Dentro de estas señales intracelulares que participan en la migración neuronal se incluye a los cambios en la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular que se consideran esenciales para el crecimiento axónico, la velocidad de migración y el movimiento del cono de crecimiento (Komuro y Kumada, 2005). Los receptores NMDA pueden participar en la regulación de los niveles de  $Ca^{2+}$ , puesto que son permeables a este ion (Tárnok et al., 2008). Por otro lado, se

ha propuesto que la activación del receptor NMDA también produce ERO, provenientes de NOX2, que funcionan como segundos mensajeros (Girouard et al., 2009). Incluso se ha señalado a la NOX2 como la principal fuente de superóxido tras la activación de este receptor en neuronas (Brennan et al., 2009).

Muchos de los elementos que median las acciones tróficas de diferentes factores de crecimiento, hormonas y neurotrofinas son sensibles a la acción de las ERO, que pueden regular procesos celulares fundamentales para el desarrollo como la proliferación, la diferenciación, la migración y la muerte (Covarrubias et al., 2008). Se ha publicado que las ERO son esenciales en la diferenciación de células PC12 (Kamata et al., 2005) y podrían ser parte de la diferenciación de células troncales de la cresta neural (Morrison et al., 2000). Además también influyen en la diferenciación y neurogénesis de las células troncales neurales de la zona subventricular, las cuales mantienen una alta cantidad de estas especies (Le Belle et al., 2011). En estas mismas células se encontró que la cantidad de superóxido aumenta cuando son tratadas con BDNF, lo que favorece la capacidad de autorrenovación de las células troncales neurales. Sin embargo, cuando las células provienen de ratones mutantes para NOX2, no se observa el efecto positivo del BDNF. Lo anterior sugiere que las ERO que provienen de NOX2 juegan un papel importante en la acción que ejerce BDNF sobre la proliferación de las células troncales neurales.

Las ERO afectan la estructura y dinámica del citoesqueleto de actina tanto en neuronas, como en otros tipos celulares (Giannoni et al., 2005; Moldovan et al., 2000). En el caso de las neuronas, las ERO influyen en la motilidad del cono de crecimiento y el crecimiento neurítico. Están presentes en las tres zonas del cono de crecimiento axónico y se ha propuesto que regulan el movimiento de la F-actina en el mismo mediante la GTPasa Rac1. La depleción de ERO y la inhibición de la NOX lleva a la detención de la dinámica de los organelos, a la retracción de los microfilamentos y al remplazo de los filipodios

y lamelipodios por una desorganización de la red del citoesqueleto (Munnamalai y Suter, 2009).

Recientemente, nuestro grupo observó una producción diferencial de ERO en distintas regiones y edades del cerebelo de rata, y por primer vez se demostró una expresión diferencial de los homólogos NOX1, NOX2 y NOX4 en esta región en el desarrollo. Además de encontrar deficiencias en el comportamiento motor de la rata al inhibir los niveles de ERO y a las NOX, también se encontró una alteración en la foliación del cerebelo (Coyoy et al., 2013).

## **5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Los mecanismos moleculares involucrados en eventos del desarrollo del cerebelo no se conocen completamente. Dentro de las acciones tróficas que se sabe influyen en la maduración neuronal están la activación de receptores NMDA y la actividad neuronal simulada por una despolarización con  $K^+$  extracelular. Por otro lado, ha sido ampliamente observado que las NOX participan en el desarrollo del sistema nervioso y que las ERO actúan como segundos mensajeros. Sin embargo, hay poca evidencia de la relación entre ciertas condiciones tróficas en el desarrollo y la activación de las NOX y la producción de ERO. Por lo tanto, en este trabajo se investigó si las ERO son mediadoras del efecto trófico de la activación del receptor tipo NMDA y de la despolarización con 25 mM de KCl en algunos eventos del desarrollo en las NGC. De ser así, nos interesa determinar si las ERO provienen de la activación de las NOX.

## **6. HIPÓTESIS**

Los efectos tróficos de la activación del receptor tipo NMDA y la despolarización con  $K^+$  25 mM observados durante el desarrollo de las neuronas granulares del cerebelo en cultivo están mediados por ERO producidas por una NOX.

## **7. OBJETIVOS**

### **7.1. OBJETIVO GENERAL**

Conocer si las acciones tróficas de la activación del receptor sináptico tipo NMDA y de la concentración despolarizante por  $K^+$  (K25) están mediadas por ERO y la NOX en algunos eventos del desarrollo como la neuritogénesis, la migración y la muerte programada en un modelo *in vitro* de neuronas granulares de cerebelo.

### **7.2. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Evaluar la neuritogénesis, supervivencia y migración de las NGC durante los primeros días *in vitro* inducidas por NMDA y K25.
- Determinar si NMDA y K25 inducen la generación de ERO.
- Conocer si NMDA y K25 favorecen la activación de homólogos de NOX.
- Evaluar si las ERO y la activación de NOX son requeridas en las acciones del NMDA y K25 sobre neuritogénesis, muerte o migración de NGC.



## **8. MÉTODOS**

### **8.1. CULTIVO DE NEURONAS GRANULARES DE CEREBELO**

Los cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo se obtuvieron de ratas Wistar de 8 días postnatales, siguiendo los procedimientos aprobados por el bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. Las neuronas fueron disociadas con tripsina y ADNasa bovina y sembradas en multicajas de cultivo de 24 pozos, previamente cubiertos con poli-L-lisina (5 µg/mL por 3 h), a una densidad de  $1.5 \times 10^6$  células/mL. El medio de cultivo contenía medio basal eagle (MBE), 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, glutamina 2 mM, KCl 5 mM (K5), penicilina 50 U/mL y estreptomicina 50 µg/mL. Las neuronas sembradas fueron incubadas a 37°C en atmósfera saturada con vapor de agua, con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire. Se añadió citosina arabinosa a las 24 h con el fin de evitar la proliferación de células no neuronales.

### **8.2. VIABILIDAD CELULAR**

La supervivencia fue estimada con un ensayo de vida-muerte con calceína-AM/ yoduro de propidio (IP). Los cultivos fueron incubados con calceína-AM 0.5 µM e IP 1 µM por 15 minutos a 37°C. La calceína-AM atraviesa la membrana celular y, en el interior de las células metabólicamente activas, las esterasas remueven el grupo acetometoxi. La remoción de este sustituyente deja cargada a la molécula de calceína, lo cual impide que salga de la célula y produce la fluorescencia. Por su parte, los pigmentos con aminas aromáticas como el IP interactúan con nucleótidos y así emiten fluorescencia. La membrana celular es impermeable a las moléculas de IP por lo que sólo se intercalan en el ADN de las células con la membrana dañada.

Para los ensayos se utilizó un microscopio invertido de epifluorescencia (Nikon Diaphot TMD; Nikon Corp.) con filtros para detección de fluorescencia o

rodamina con un objetivo 20x. Se tomaron fotos de cuatro campos por cada condición, las cuales fueron analizadas con el programa ImageJ. Los resultados de la cuantificación se expresan como porcentaje de las células metabólicamente activas (positivas a calceína-AM) respecto al total de células. En estos ensayos los cultivos fueron tratados las sustancias indicadas en la Tabla 1.

Luego de una serie de ensayos preliminares para determinar la duración de los tratamientos, se decidió tratar los cultivos con KCl y NMDA el primer día del cultivo, mientras que los antioxidantes MnTMPyP y EUK-124, y los inhibidores de NOX, AEBSF y apocinina, se agregaron 48 h antes del ensayo a los 3, 5 y 7 DIV.

**Tabla 1. Tratamientos evaluados en la supervivencia de los cultivos de NGC.**

<b>Tratamiento</b>	<b>Concentración</b>	<b>Actividad</b>
EUK-134	10 $\mu$ M	SOD y catalasa
MnTMPyP	50 $\mu$ M	SOD, catalasa y peroxinitrito
Apocinina	200 y 800 $\mu$ M	Inhibidor de cinasas de Rho
AEBSF	40 $\mu$ M	Inhibidor de proteasas de serina
NMDA	150 $\mu$ M	Agonista del receptor NMDA
KCl	20 $\mu$ M	Despolarización de la membrana

### **8.3. CRECIMIENTO NEURÍTICO**

Para la cuantificación del crecimiento neurítico se mezcló el marcador de membranas PKH26 (2  $\mu$ M), un fluorocromo rojo que emite a una longitud de onda de 567 nm, con una pequeña fracción de NGC disociadas como lo indica el fabricante (1/120 del total de células de un cultivo). Posteriormente las

células teñidas se sembraron junto con las no teñidas y se añadieron los antioxidantes o inhibidores de NOX. Las NGC se fotografiaron en un microscopio invertido de epifluorescencia 24 y 48 horas después de ser sembradas, se registró la polaridad y se midió el proceso más largo usando el programa Neuron J. La longitud se expresa en una gráfica de frecuencia relativa acumulada, la cual representa la frecuencia con la cual ocurre un fenómeno de magnitud menor que un valor de referencia. En este caso la frecuencia acumulada indica cuántas neuritas tienen una longitud igual o menor que un valor x. Por otro lado, la polaridad se cuantifica como el porcentaje de células unipolares, bipolares o multipolares.

#### **8.4. MIGRACIÓN NEURONAL**

En estudios *in vitro*, las células se cultivaron a una densidad de 4.5 millones por mililitro y en presencia de suero de caballo. Los cultivos se trataron con antioxidantes o inhibidores de NOX 30 minutos antes del experimento que consiste en tomar una fotografía cada minuto por 3 horas, en un microscopio mantenido en una cámara de incubación. Se midió el desplazamiento de las NGC localizadas sobre procesos neurales durante el tiempo total del experimento. Los resultados se expresan como la distancia recorrida por la neurona por hora.

#### **8.5. MEDICIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO**

La producción de ERO se evaluó cualitativamente mediante la oxidación fluorogénica de dihidroetidio (DHE) a etidio. El dihidroetidio permea en las células y se oxida a etidio en presencia de ERO. El etidio se intercala en la doble hélice del ADN y fluoresce al ser excitado por radiación con longitudes de onda de entre 500 nm y 530 nm. Los cultivos se incubaron por una hora con **DHE 3.2  $\mu$ M** en ausencia de luz y a 37°C. Para los ensayos se utilizó un microscopio invertido de epifluorescencia (Nikon Diaphot TMD; Nikon Corp.)

con un objetivo Nikon 20x. Se tomaron fotos de cuatro campos por cada condición, en tres experimentos independientes- Las fotografías se analizaron con el programa ImageJ para cuantificar la intensidad de la fluorescencia producida.

## **8.6. ANÁLISIS DE DATOS**

Los datos se analizaron con el programa GraphPad Prism 6. Los datos de viabilidad, migración, niveles de ERO y polaridad se expresan como la media de tres experimentos independientes  $\pm$  SEM. Para el análisis estadístico se usó ANOVA de una vía, seguida por la prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples. Los resultados de crecimiento neurítico se expresan como la frecuencia relativa acumulada (porcentaje acumulado) respecto al total de células de los tres experimentos. Las diferencias significativas se determinaron mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

## **9. RESULTADOS**

De acuerdo a los objetivos de este estudio, a continuación se presentan los resultados de los experimentos realizados para comprobar si las ERO y las NOX son necesarias en tres de los eventos que se presentan en el desarrollo: muerte celular, migración y crecimiento neurítico.

### **9.1. VIABILIDAD CELULAR**

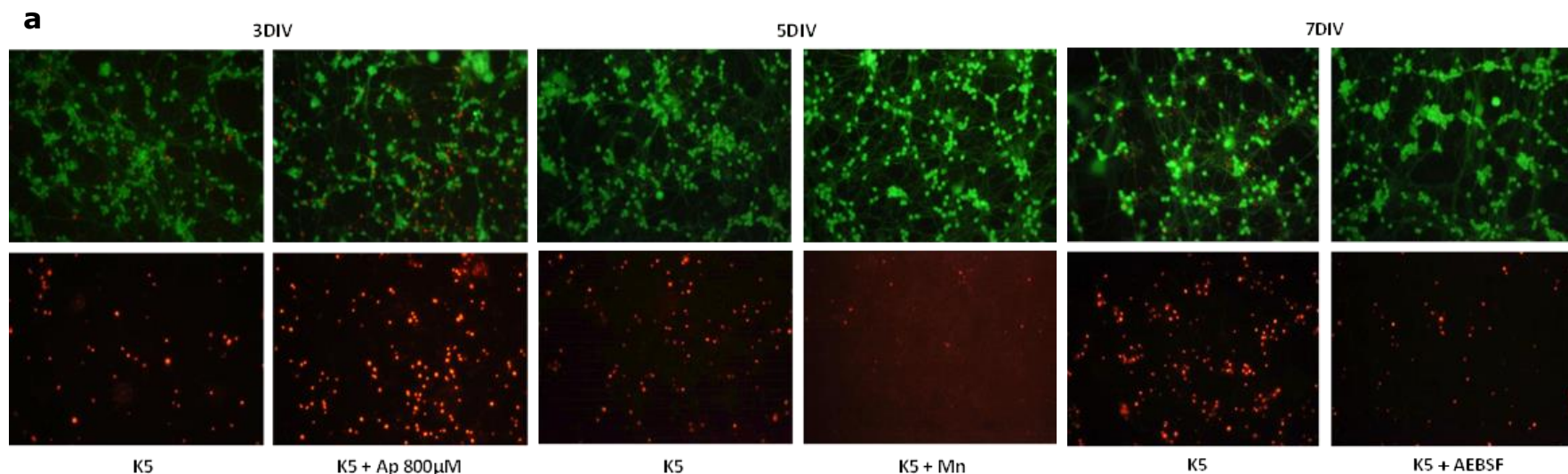
Se sabe que las NOX participan en la muerte celular dependiente de ERO (Guemez-Gamboa y Morán, 2009); por otro lado, se conoce que los estímulos NMDA y K25 previenen la muerte de las NGC que ocurre luego de los 5 DIV

(Alavez et al., 1996). Para saber si hay una relación entre las ERO, las NOX y la supervivencia de las NGC promovida por K25 y NMDA, se evaluó la viabilidad celular mediante el ensayo de calceína-IP. Se contaron las células positivas a calceína y las células positivas a IP; la suma de ambos grupos constituye el total de células. Los resultados se presentan en gráficas de porcentaje de NGC viables, o positivas a calceína, respecto al total de células.

Luego de ensayos preliminares para determinar la duración de los tratamientos, se decidió administrar KCl y NMDA desde el primer día del cultivo, mientras que los antioxidantes MnTMPyP y EUK-124 y los inhibidores de NOX AEBSF y apocinina se agregaron 48 h antes de cada ensayo, es decir, a los 1, 3 y 5 DIV.

#### Viabilidad de neuronas tratadas con K<sup>+</sup> 5 mM

Como ya se mencionó en los antecedentes, las NGC cultivadas crónicamente en K<sup>+</sup> 5 mM mueren a partir de los 5 DIV (Morán et al., 2000), lo cual fue corroborado en estos experimentos (figura 5). Bajo estas condiciones, el antioxidante MnTMPyP reduce esta muerte a los 5 DIV, mientras que el inhibidor AEBSF tiene el mismo efecto tanto a los 5 como a los 7 DIV. Por el contrario, se observó una disminución significativa en el número de células vivas con los tratamientos con MnTMPyP a los 7 DIV, mientras que con apocinina 200 µM se encontró una reducción a los 5 y 7 DIV y con apocinina 800 µM a los 3, 5 y 7 DIV. Por lo tanto, se puede concluir que una disminución de los niveles de ERO puede evitar la muerte de NGC a partir de los 5 DIV; sin embargo, es probable que la disminución excesiva de ERO tenga el efecto opuesto.

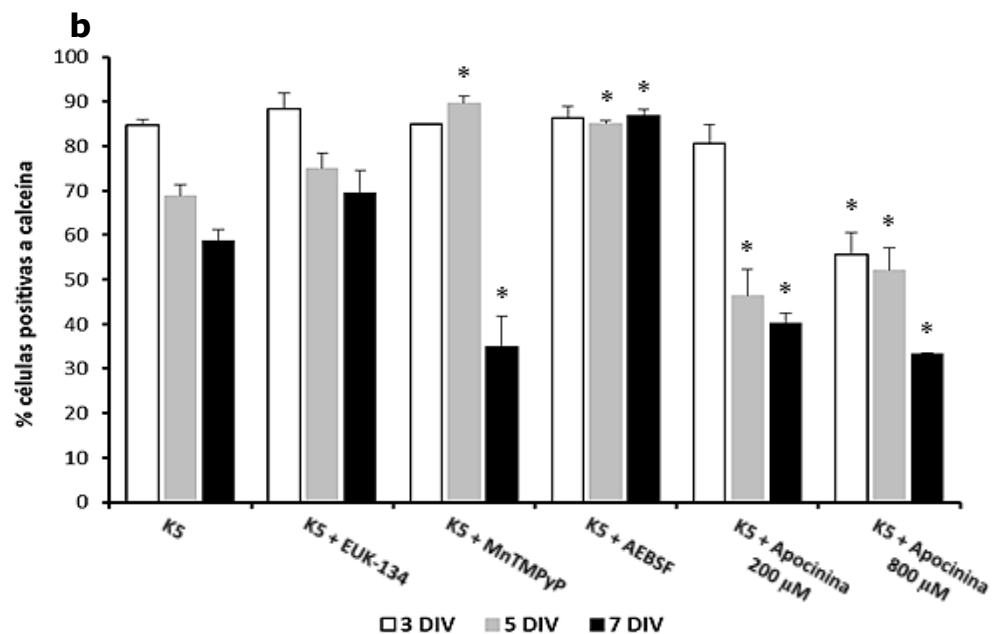


**Figura 5. Viabilidad a 3, 5 y 7 DIV de neuronas granulares del cerebelo cultivadas con  $K^+$  5 mM, y tratadas con antioxidantes o inhibidores de la NOX.**

Las células fueron tratadas por 48 h previas al experimento.

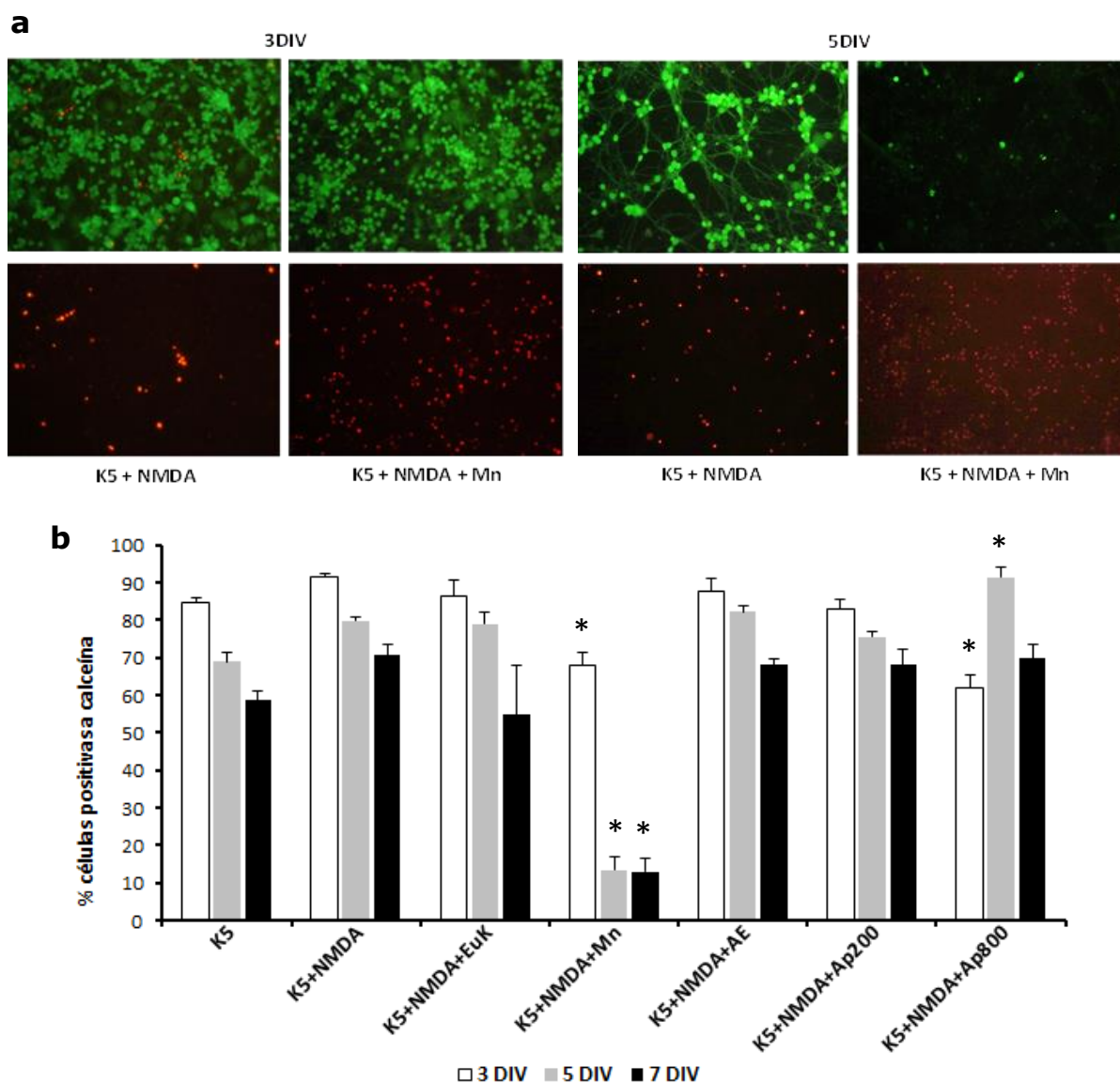
**a)** Imágenes representativas del experimento. En la fila superior se muestran las células positivas a calceína y en la fila inferior las células positivas a IP, en el mismo campo.

**b)** Los resultados están expresados como el promedio de 3 experimentos independientes  $\pm$  SEM. El porcentaje de neuronas positivas a calceína se calculó respecto al total de neuronas. \*Resultados significativamente diferentes a K5 para cada edad;  $p=0.05$  según ANOVA de una vía, seguida por la prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples.



### Viabilidad de neuronas tratadas con NMDA

Como se observa en la figura 6, la viabilidad de los cultivos de 5 y 7 DIV tratadas con NMDA incrementa aproximadamente un 10% respecto a los cultivos en K5. Con MnTMPyP hay una disminución significativa de la viabilidad en todas las edades comparado con los controles K5 + NMDA. En cultivos de 3 DIV, la apocinina en su mayor concentración también disminuye la supervivencia. Los demás tratamientos no producen diferencias significativas.



**Figura 6. MnTMPyP disminuye la viabilidad a 3, 5 y 7 DIV de NGC cultivadas con  $K^+$  5 mM más NMDA 150  $\mu$ M, mientras que apocinina 800  $\mu$ M sólo a los 3 DIV. Las células fueron tratadas por 48 h previas al experimento. a) Imágenes representativas**

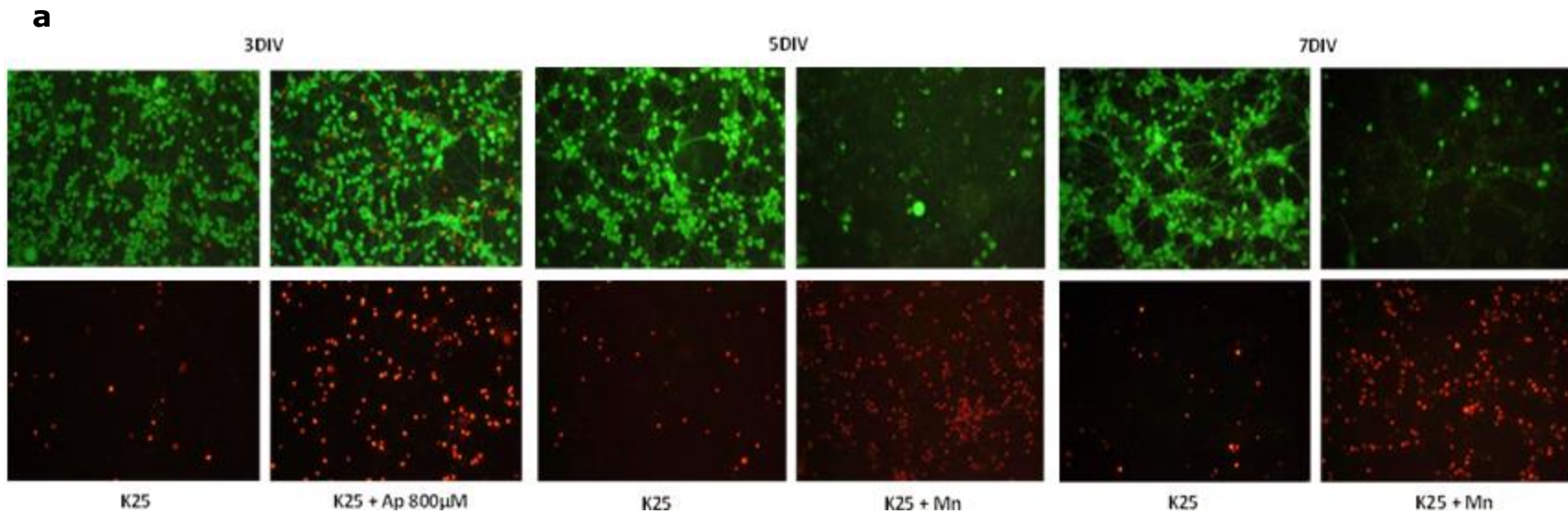
del experimento. En la fila superior se muestran las células positivas a calceína y en la fila inferior las células positivas a IP, en el mismo campo. **b)** Los resultados están expresados como el promedio de 3 experimentos independientes  $\pm$  SEM. El porcentaje de neuronas positivas a calceína se calculó respecto al total de neuronas. \*Resultados significativamente diferentes a K5 + NMDA para cada edad;  $p=0.05$  según ANOVA de una vía, seguida por la prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples.

### Viabilidad de neuronas tratadas con condiciones despolarizantes

Cuando las neuronas se cultivaron en condiciones despolarizantes (KCl 25 mM), la muerte se redujo significativamente en comparación a lo observado en cultivos crecidos en KCl 5 mM por 5 y 7 DIV (figura 7). En presencia del antioxidante MnTMPyP este efecto del K25 ya no se observa, e incluso la viabilidad está por debajo de la observada en cultivos que sólo tienen K5. En el mismo sentido, la apocinina 200  $\mu$ M disminuye ligeramente, pero significativamente, el incremento de la supervivencia de las NGC inducido por K25 a los 3 DIV, pero no a los días 5 y 7. Por último, también las neuronas tratadas con apocinina 800  $\mu$ M mueren más que las tratadas con K25 a los 3 DIV.

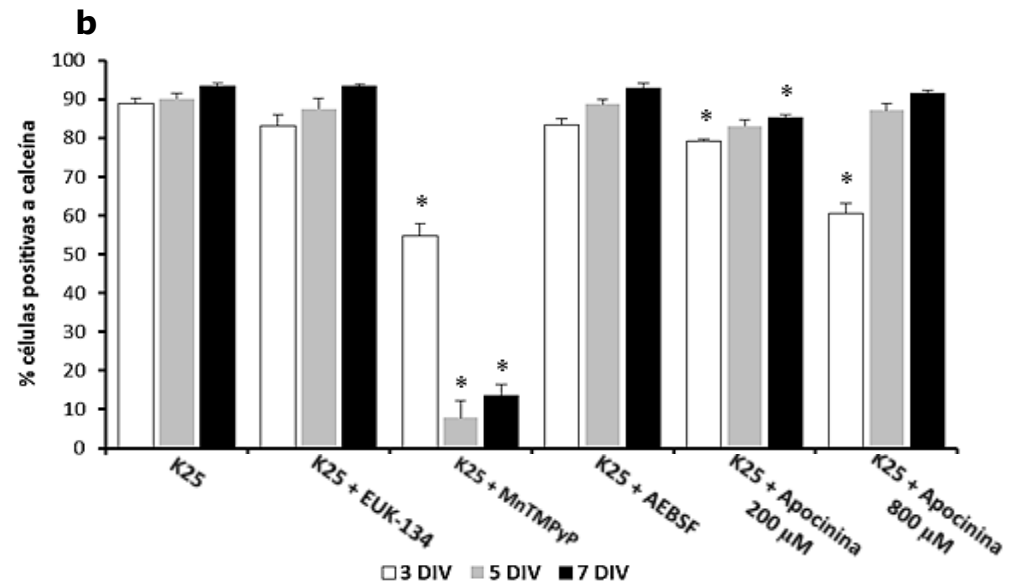
Estos resultados sugieren que las ERO sí participan en el efecto de NMDA y K25 sobre la supervivencia neuronal. Cabe recordar que los antioxidantes e inhibidores de NOX que se utilizaron, actúan sobre diferentes especies reactivas. Lo anterior puede explicar los resultados observados y será comentado con mayor profundidad en la sección de Discusión.





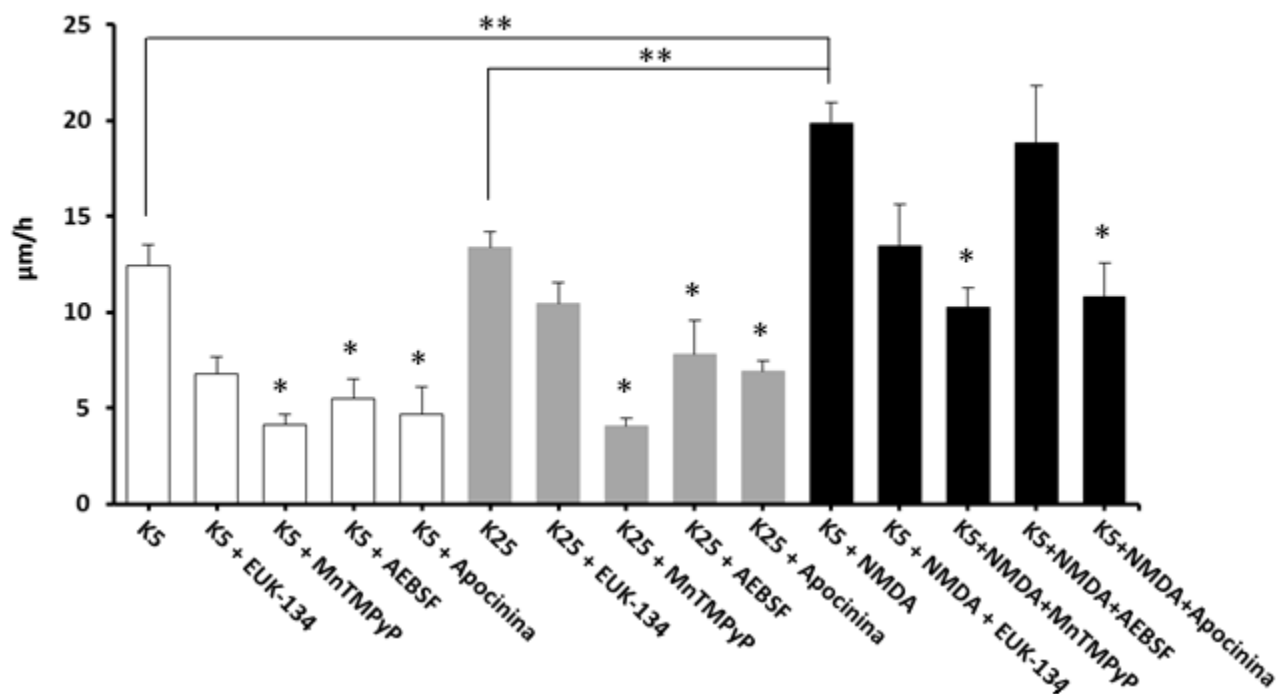
**Figura 7. MnTMPyP y apocinina reducen la viabilidad de NGC cultivadas con K<sup>+</sup> 25 mM.** Las células fueron tratadas por 48 h previas al experimento.

**a)** Imágenes representativas del experimento. En la fila superior se muestran las células positivas a calceína y en la fila inferior las células positivas a IP, en el mismo campo. **b)** Los resultados están expresados como el promedio de 3 experimentos independientes  $\pm$  SEM. El porcentaje de neuronas positivas a calceína se calculó respecto al total de neuronas. \*Resultados significativamente diferentes a K25 para cada edad;  $p=0.05$  según ANOVA de una vía, seguida por la prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples.



## 9.2. EFECTO DE K25 Y NMDA SOBRE LA MIGRACIÓN NEURONAL

Se sabe que la activación del receptor NMDA está involucrada en la migración neuronal (Behar et al., 1999; Uchino et al., 2010), pero no se conoce el papel de la despolarización y menos de las ERO y las NOX en este proceso. Por lo tanto, se estudió la relación de K25 y NMDA con las ERO y las NOX en la migración neuronal. Los cultivos sembrados en potasio 5 mM o 25 mM, o en K5 con NMDA 150  $\mu$ M se trataron con EUK, MnTMPyP y AEBSF, a las mismas concentraciones empleadas en los ensayos de viabilidad (Tabla 1), así como con apocinina 200  $\mu$ M. Todos los tratamientos se hicieron media hora antes de iniciar el ensayo de migración, el cual consistió en tomar una foto cada minuto por espacio de 3 horas, esto en un microscopio con incubadora. La velocidad de migración se calculó dividiendo la distancia recorrida por una neurona, entre el tiempo que tardó en recorrerla. Bajo las anteriores condiciones, no se encontró diferencia significativa entre cultivos en K5 y cultivos en K25 pero sí en los cultivos tratados con NMDA, donde se observa que la velocidad de migración aumenta prácticamente al doble (figura 8).



**Figura 8. Las ERO y las NOX son necesarias para la migración de NGC cultivadas con K<sup>+</sup> 5 mM, K<sup>+</sup> 25 mM o NMDA 150  $\mu$ M.** Las células fueron tratadas

30 minutos antes de realizar el experimento. Se calculó la distancia recorrida, en  $\mu\text{m}$ , por una neurona por hora, con el programa AxioVision. Los resultados están expresados como el promedio de 3 experimentos independientes  $\pm\text{SEM}$ . \*Resultados significativamente diferentes a su propio control ( $p=0.05$ ); \*\*resultados significativamente diferentes entre las condiciones indicadas ( $p=0.05$ ) según ANOVA de una vía, seguida por la prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples.

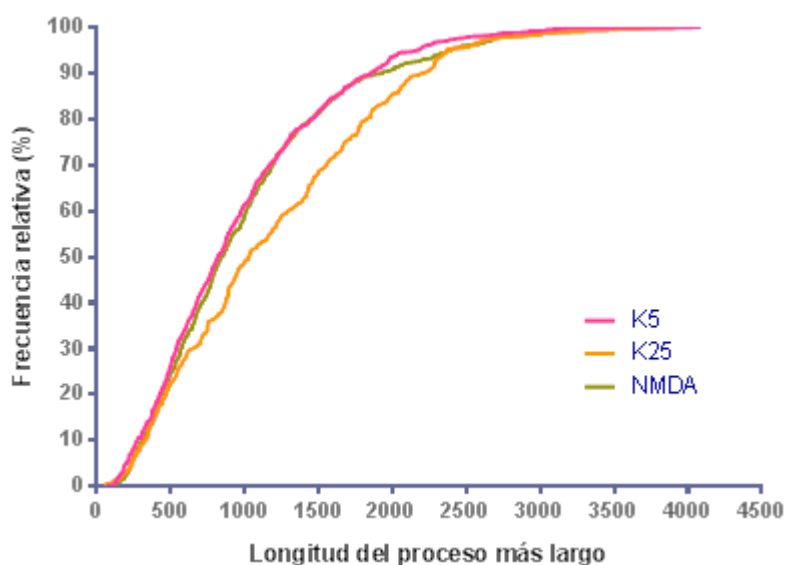
Para las neuronas en K5 y en K25 se encontró que tanto antioxidantes como inhibidores disminuyen significativamente la velocidad de migración. Para las células sembradas en medio con NMDA, el MnTMPyP y la apocinina  $200 \mu\text{M}$  producen un decremento significativo en la velocidad de migración. Estos resultados indican que la velocidad de migración depende de las ERO y NOX en todas las condiciones de cultivo que se usaron en este trabajo.

### **9.3. CRECIMIENTO NEURÍTICO**

Posteriormente se estudió el crecimiento neurítico dado que está directamente relacionado a la migración de las NGC (Komuro y Yacubova, 2003). Los ensayos para medir el crecimiento neurítico se llevaron a cabo administrando antioxidantes o inhibidores de NOX al momento de sembrar las NGC. Los cultivos se fotografiaron luego de 24 ó 48 horas de tratamiento. Posteriormente se cuantificó la longitud del proceso más largo de cada neurona en un campo y se registró su polaridad, ya que la longitud no es el único parámetro que indica maduración. Los resultados de longitud se representan en curvas de frecuencia relativa acumulada, es decir, porcentaje acumulado. Dichas gráficas muestran la frecuencia con la cual ocurre un fenómeno de magnitud menor que un valor de referencia. En este caso la frecuencia acumulada indica cuántas neuritas tienen una longitud igual o menor que un valor x.

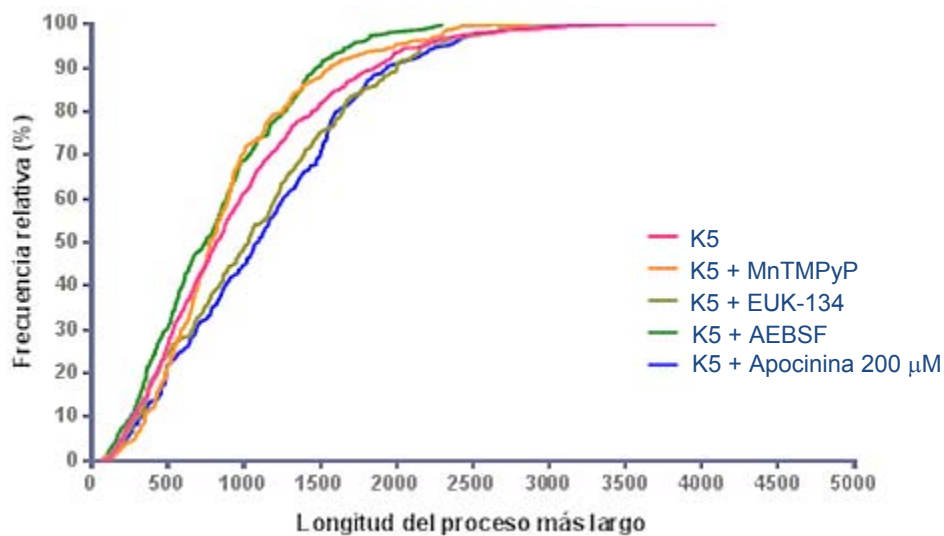
### 9.3.1. LONGITUD DE LOS PROCESOS

En cuanto a la extensión de neuritas, la figura 9 muestra que hay una tendencia hacia el aumento en la longitud de los procesos de neuronas sembradas en K25 únicamente a las 24 horas, sin embargo, no se observaron cambios significativos en la longitud de las mismas entre las condiciones control (K5, K25 y NMDA).

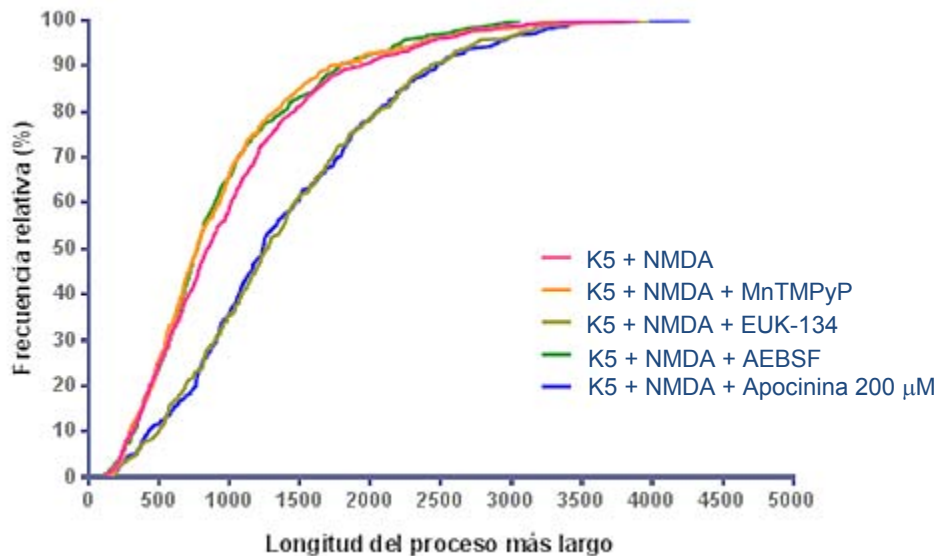


**Figura 9. El crecimiento neurítico es igual para NGC sembradas en  $K^+$  5 mM,  $K^+$  25 mM y  $K^+$  5 mM con NMDA 150  $\mu$ M a las 24 h.** Se midió el proceso más largo de neuronas sembradas en las condiciones indicadas 24 horas después de ser cultivadas y se graficó la frecuencia relativa acumulada. La longitud está expresada en píxeles. No hay diferencias significativas entre las condiciones según la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Resultados de tres experimentos independientes.

Al agregar los antioxidantes e inhibidores de las NOX a las NGC sembradas en K5, no se encontraron diferencias significativas entre los cultivos con los tratamientos antes mencionados y el control (figura 10). En la figura 11 se observa que bajo la condición NMDA los tratamientos tampoco producen cambios significativos en el crecimiento neurítico, pero sí se presenta la tendencia hacia una menor longitud de las neuritas en neuronas tratadas con antioxidantes y un mayor crecimiento en aquéllas tratadas con inhibidores de NOX.

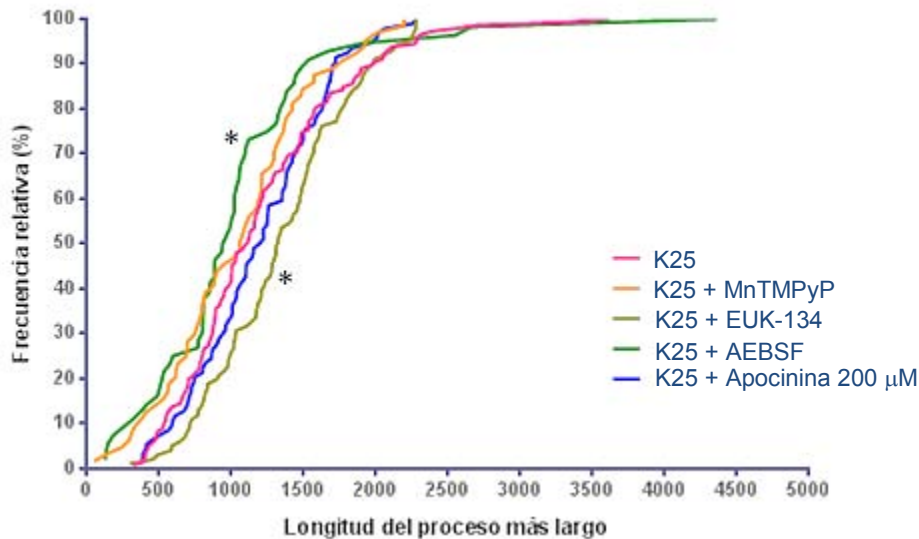


**Figura 10. La longitud del proceso más largo de NGC sembradas en K<sup>+</sup> 5 mM por 24 h, no depende de ERO ni la activación de NOX.** Se midió el proceso más largo de neuronas sembradas en las condiciones indicadas 24 horas después de ser cultivadas y se graficó la frecuencia relativa acumulada. La longitud está expresada en píxeles. No hay diferencias significativas entre las condiciones según la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Resultados de tres experimentos independientes.



**Figura 11. La longitud del proceso más largo de NGC sembradas en  $K^+$  5 mM con NMDA  $150 \mu M$  por 24 h, no depende de ERO ni la activación de NOX.** Se midió el proceso más largo de neuronas sembradas en las condiciones indicadas 24 horas después de ser cultivadas y se graficó la frecuencia relativa acumulada. La longitud está expresada en píxeles. No hay diferencias significativas entre las condiciones según la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Resultados de tres experimentos independientes.

Por otro lado, en las neuronas sembradas en la condición despolarizante K25, el antioxidante EuK-134 aumenta significativamente la longitud de las neuritas mientras que el inhibidor de las NOX AEBSF la disminuye. Estos son los únicos tratamientos que producen cambios significativos en esta condición (figura 12).



**Figura 12. EUK-134 aumenta el crecimiento neurítico de NGC sembradas por 24 h en K<sup>+</sup> 25 mM mientras que AEBSF lo disminuye.** Se midió el proceso más largo de neuronas sembradas en las condiciones indicadas 24 horas después de ser cultivadas y se graficó la frecuencia relativa acumulada. Resultados de tres experimentos independientes. La longitud está expresada en píxeles. \*Resultados significativamente diferentes respecto a K25 según la prueba de Kolmogorov-Smirnov;  $p=0.05$ .

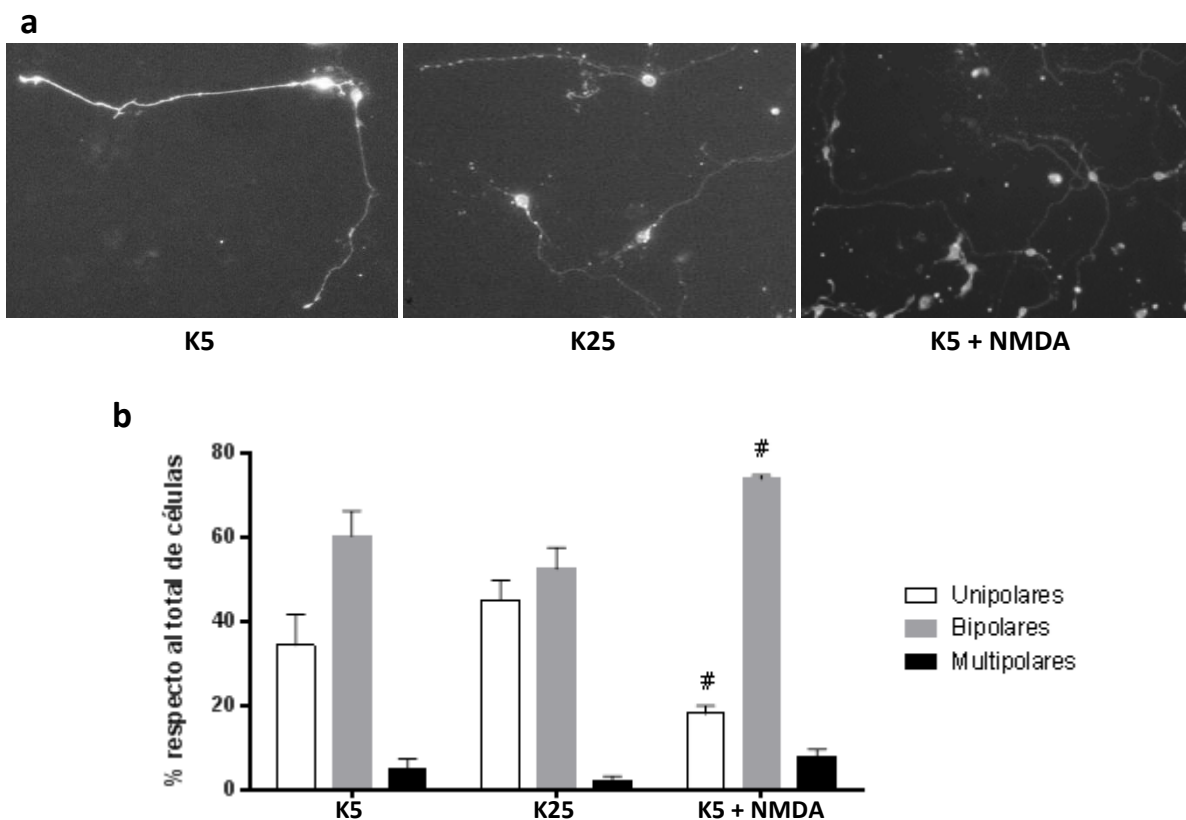
A las 48 horas de cultivo tampoco hay diferencias significativas en la distribución de longitudes de los procesos: se observan los mismo resultados que a las 24 horas (figuras suplementarias A-D).

Por lo tanto, los resultados indican que el crecimiento neurítico, tomado como la longitud del proceso más largo, no depende de las ERO ni de la activación de las NOX.

### 9.3.2. POLARIDAD NEURONAL

La migración de las NGC depende de la extensión de dos neuritas opuestas entre sí, es decir, de un estado bipolar. Por otro lado, una NGC multipolar

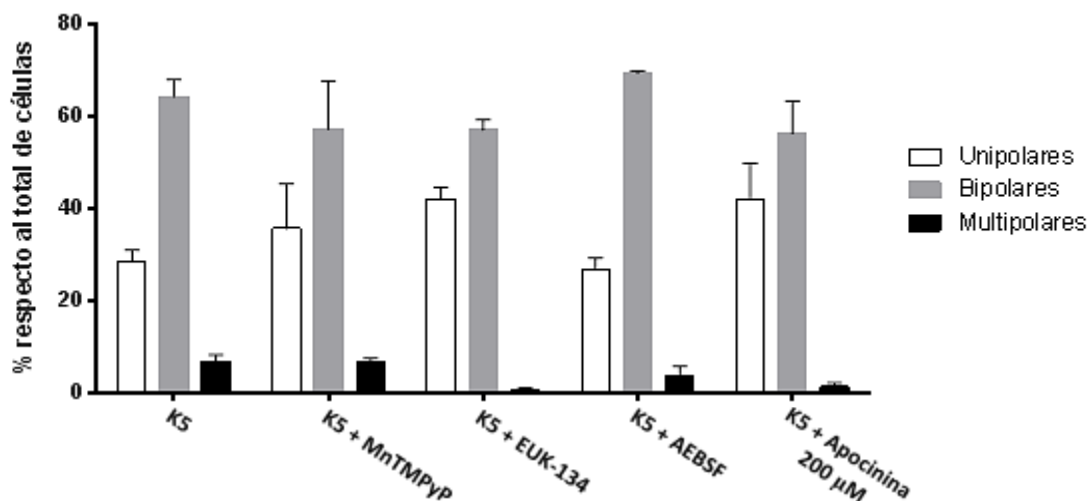
indica que se encuentra en el último evento de la maduración, en el cual se establecen contactos sinápticos. Por consiguiente, al mismo tiempo que se midió la longitud del proceso más largo de las neuronas granulares, éstas se clasificaron según la cantidad de procesos que poseían. Posteriormente, se calculó el porcentaje de NGC unipolares, bipolares o multipolares. De esta forma se encontró que las células tratadas con K5 y K25 por 24 h presentaron la misma distribución de polaridad (figura 13). En contraste, el tratamiento con NMDA genera un aumento significativo, respecto a K5 y K25, en la cantidad de neuronas bipolares y una disminución en la cantidad de unipolares.



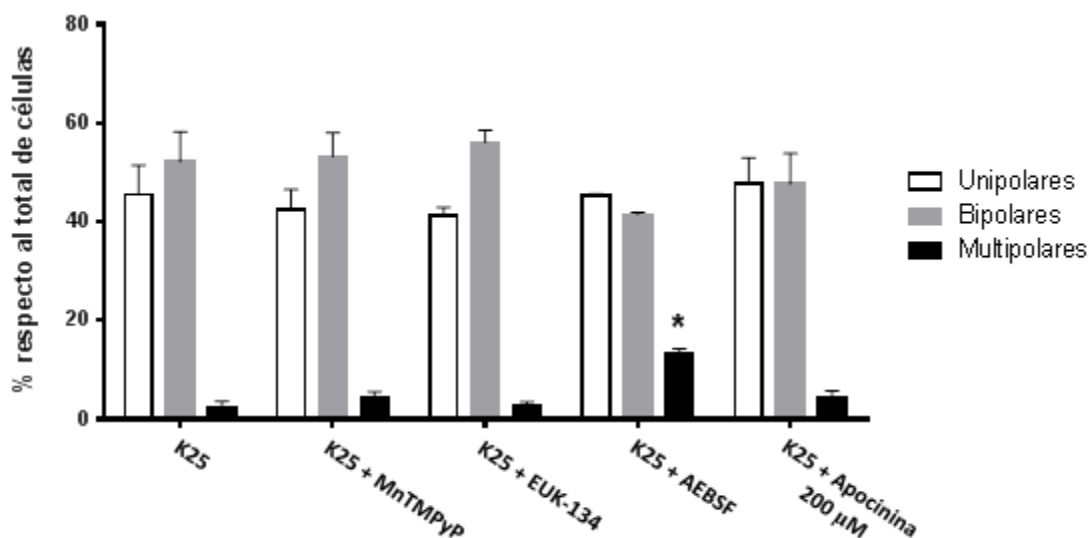
**Figura 13. La cantidad de NGC bipolares aumenta en cultivos tratados con  $K^+$  5 mM más NMDA 150  $\mu$ M, a las 24 h de haber sido sembradas.** Se registró la polaridad de todas las neuronas cuya longitud fue medida. **a)** Imágenes representativas de las NGC en las tres condiciones evaluadas. **b)** El histograma muestra el promedio de tres experimentos independientes  $\pm$ SEM. #Resultados significativamente diferentes a las condiciones K5 y K25;  $p=0.05$  según ANOVA de una vía, seguida por la prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples.



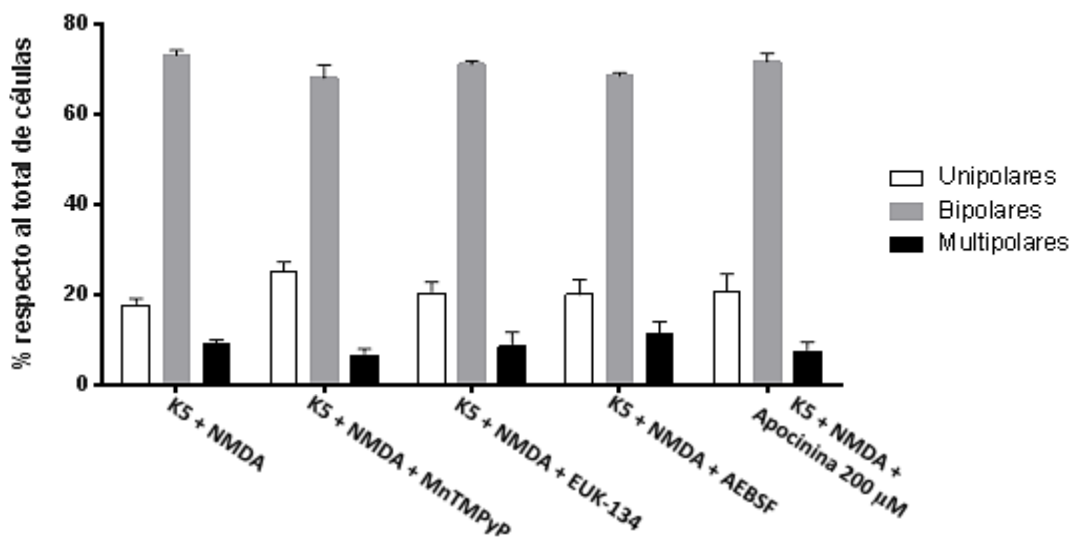
La polaridad de las NGC parece no depender de ERO ni de NOX puesto que únicamente se observan cambios significativos entre las neuronas tratadas con AEBSF en la condición K25 (figura 15). No hay cambios en este parámetro con ninguno de los tratamientos para las condiciones K5 y K5 más NMDA, como se ve en las figuras 14 y 16.



**Figura 14. No hay diferencias en la polaridad de NGC sembradas en  $K^+$  5 mM y al tratarlas con antioxidantes o inhibidores de NOX por 24 h.** Se registró la polaridad de todas las neuronas cuya longitud fue medida. El histograma muestra el promedio de tres experimentos independientes  $\pm$ SEM.



**Figura 15. El inhibidor de NOX, AEBSF, aumenta la cantidad de NGC multipolares en cultivos con  $K^+$  25 mM, a las 24 h.** Se registró la polaridad de todas las neuronas cuya longitud fue medida. El histograma muestra el promedio de tres experimentos independientes  $\pm$ SEM. \*Resultados significativamente diferentes a K25 multipolares;  $p=0.05$  según ANOVA de una vía, seguida por la prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples.



**Figura 16. No hay diferencias en la polaridad de NGC sembradas en  $K^+$  5 mM más NMDA 150  $\mu$ M y al tratarlas con antioxidantes o inhibidores de NOX por 24 h.** Se registró la polaridad de todas las neuronas cuya longitud fue medida. El histograma muestra el promedio de tres experimentos independientes  $\pm$ SEM.

Al igual que para la longitud del proceso más largo, los resultados observados en la polaridad a 24 h se mantienen a las 48 h de cultivo (figura suplementaria E). Es decir, se observan los mismos resultados que a las 24 horas. Por lo tanto, la polaridad de las NGC se favorece tras la activación del receptor NMDA pero este efecto no depende de las ERO ni de la activación de NOX.

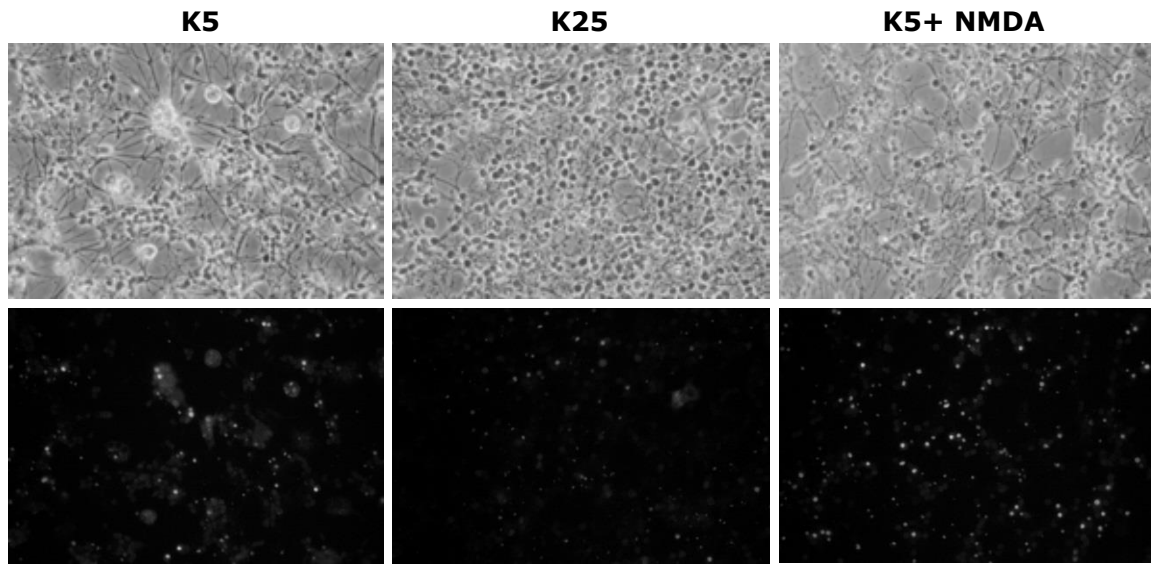
#### **9.4. NIVELES DE ERO**

Por último, se midieron los niveles de ERO en las tres condiciones de cultivo evaluadas en este trabajo, entre los días 0 y 5 DIV. Lo anterior con el fin de relacionar las condiciones K5, K25 y NMDA con la producción de ERO durante la viabilidad, migración y crecimiento neurítico.

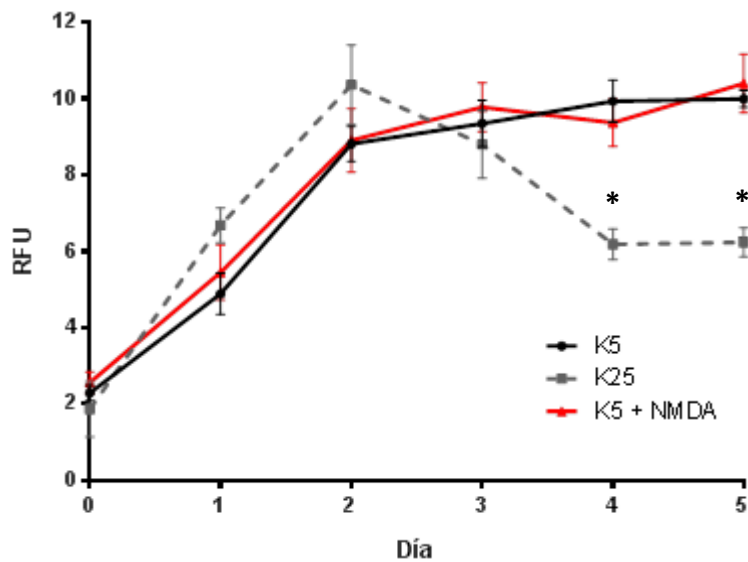
El experimento consistió en incubar los cultivos con DHE (**3.2  $\mu$ M**) en ausencia de luz, durante una hora. Posteriormente se fotografiaron para comparar la fluorescencia relativa entre ellos. Se encontró que de 0 a 2 DIV los niveles de ERO se incrementan en las tres condiciones. Sin embargo, en condiciones de K25 se observa un decremento en los niveles de ERO a partir del día 3 y éstos no cambian entre el día 4 y 5 (figura 17).

Por otro lado, en las condiciones K5 y K5 con NMDA los niveles de ERO continúan incrementando entre los 3 DIV y los 5 DIV. A partir de los 4 DIV los niveles de ERO en K25 son significativamente diferentes a los encontrados en los cultivos en K5 y K5 con NMDA (figura 17). Estos resultados confirman que los niveles de ERO varían según la edad para las tres condiciones de cultivo.

**a**



**b**



**Figura 17. Los niveles de ERO en NGC sembradas en  $K^+$  25 mM llegan a un máximo a los 2 DIV y disminuyen hasta los 4 DIV, mientras que en las NGC en  $K^+$  5 mM y  $K^+$  5 mM con NMDA 150  $\mu$ M, las ERO aumentan hasta los 3 DIV y se mantienen hasta los 5 DIV. a)** Imágenes representativas de NGC positivas a DHE a los 5 DIV. **b)** Se midió la intensidad relativa de la fluorescencia producida por las neuronas mediante la administración de DHE. Se analizaron 13 neuronas por campo y se tomaron 12 campos por condición. Los resultados están expresados como el promedio de 3 experimentos independientes  $\pm$ SEM. \*Resultados significativamente diferentes a K5 y K5 + NMDA;  $p=0.05$  según ANOVA de una vía seguida por la prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples.

## 10. DISCUSIÓN

Para determinar si la acción trófica de NMDA y  $K^+$  25 mM está mediada por ERO o NADPH oxidasa, se evaluó el efecto de antioxidantes e inhibidores de NOX sobre la viabilidad, al igual que sobre la migración y el crecimiento neurítico de las neuronas granulares del cerebelo.

Los experimentos de viabilidad se llevaron a cabo en cultivos de 3, 5 y 7 DIV que fueron sembrados en  $K^+$  5 mM, NMDA o con  $K^+$  25 mM. En los cultivos con  $K^+$  25 mM se observó la muerte esperada a las edades de 5 y 7 DIV. Se encontró que sólo el antioxidante MnTMPyP, a los 5 DIV, y el inhibidor de NOX AEBSF, a los 5 y 7 DIV, rescatan a las neuronas de la muerte apoptótica. Por otro lado, la apocinina que redujo la supervivencia a los 5 y 7 DIV en el caso de la concentración más baja, y a partir de los 3 DIV a 800  $\mu$ M, lo cual puede deberse a una disminución excesiva de los niveles de ERO que provoque toxicidad en vez de protección.

Es importante considerar que, aunque tanto EUK-134 como MnTMPyP son considerados antioxidantes, EUK-134 mimetiza la función de las enzimas catalasa y SOD, mientras que MnTMPyP actúa sobre las especies peróxido, superóxido y peroxinitrito (Szab et al., 1996; Choi et al., 2000). Esta puede ser una razón por la cual los efectos de ambos antioxidantes son distintos entre sí. Además, es congruente que una mayor disminución de ERO reduzca los niveles de las mismas por debajo de un umbral que sería necesario para la supervivencia de las NGC. Es decir, MnTMPyP parece ser un antioxidante más potente que también actúa a la especie peroxinitrito y que incluso llega a disminuir la supervivencia. Esta misma consideración se puede aplicar para el resto de los parámetros evaluados.

Las células sembradas en  $K^+$  25 mM y tratadas con MnTMPyP o apocinina 200  $\mu$ M mueren más que aquellas que no fueron tratadas. Ocurre lo mismo en las neuronas sembradas en  $K^+$  25 mM tratadas con apocinina 800  $\mu$ M y en

aquellas sembradas en NMDA y tratadas con MnTMPyP. Esto sugiere que las ERO podrían estar mediando el efecto protector que se conoce para las condiciones K25 y NMDA.

Por otro lado, también se estudió el efecto de los mismos antioxidantes e inhibidores de NOX en la migración de las neuronas a los 3 DIV. Se encontró que las neuronas migran más rápido cuando se activa el receptor NMDA que cuando se mantienen en K5 o K25. Además, en cultivos con K5 o K25, los tratamientos con MnTMPyP, apocinina y AEBSF disminuyen significativamente la velocidad de migración. En el caso de las neuronas en NMDA sólo MnTMPyP y apocinina producen una disminución significativa de la velocidad de migración hasta regresar este parámetro a valores similares a los de K5 y K25.

El aumento de la velocidad de migración debido a la activación del receptor NMDA también es consistente con lo observado en otros trabajos en los que se ha estudiado la influencia de este receptor (Jansson et al., 2012; Tárnok et al., 2008). En las tres condiciones estudiadas es clara la participación de las ERO y la NOX en la migración de las NGC, puesto que inhibir a las NOX o disminuir los niveles de ERO reduce significativamente la velocidad de migración.

Al momento en que se evalúa la migración, a los 3 DIV, no hay diferencia en los niveles de ERO entre las condiciones de cultivo (figura 25). Lo anterior puede explicar que las condiciones K5 y K25 tengan el mismo efecto. Sin embargo, como la activación del receptor NMDA aumenta la velocidad de migración al doble sin aumentar la cantidad de ERO, es probable que exista otro mecanismo involucrado.

Como ya se ha mencionado, las NGC comienzan su desarrollo con una forma esférica que gradualmente adquiere una morfología más compleja hasta formar un axón y varias dendritas que permitirán la formación de sinapsis (el proceso análogo *in vitro* se explica más adelante). Se sabe que para desarrollar un axón hay un crecimiento acelerado y selectivo de una neurita no

diferenciada, en ocasiones por efecto de un factor extracelular que promueva la polarización y el crecimiento de una sola neurita.

Dado que es un evento fundamental en el desarrollo, se prosiguió con el estudio de la influencia de las ERO y las NOX en el crecimiento neurítico de las NGC. En cuanto a la longitud del proceso más largo, no se observan cambios importantes entre los cultivos en  $K^+$  5 mM,  $K^+$  25 mM, ni  $K^+$  5 mM más NMDA. Nuevamente los niveles de ERO son iguales para las tres condiciones tanto a las 24 como a las 48 horas, lo cual podría explicar que no haya diferencias en el crecimiento neurítico. Sin embargo, el que la disminución de los niveles de ERO o la inhibición de las NOX tampoco afecte la longitud de las neuritas, indica que no depende de ERO ni de NOX. Las diferencias significativas en neuronas en medio K25 con EuK o AEBSF a las 24 horas, y en neuronas en medio K5 con AEBSF, no son suficientes para establecer que el crecimiento neurítico esté mediado por NOX o ERO.

Desde las 24 horas de cultivo se puede apreciar que la mayoría de las células en NMDA tienen una morfología bipolar e incluso hay una tendencia hacia la multipolaridad, a diferencia de aquéllas en K5 o K25. El efecto positivo que tiene la activación del receptor NMDA sobre la bipolaridad de las neuronas tampoco está mediado por ERO ni NOX, puesto que no hay cambios significativos con los tratamientos aplicados.

Las observaciones en cuanto a la polaridad de las NGC concuerdan con los resultados de otros trabajos. In vitro, las neuronas granulares del cerebelo comienzan su desarrollo con una morfología esférica y pequeñas protrusiones. Alrededor de las 24h de cultivo, se presenta la elongación de una sola neurita. Este estado unipolar puede continuar hasta las 48h, tal como ocurre en los cultivos en K5 y K25. A partir de 2DIV se forma la segunda neurita, opuesta a la primera, de la neurona bipolar. Una de las neuritas se alarga y comienza a ramificarse, de manera análoga a las fibras paralelas de las neuronas granulares in vivo. Por último, entre los días 3 y 4 se desarrollan las dendritas

alrededor del soma. De manera notable, la mayoría de las neuronas en NMDA tienen una neurita larga y ramificada, e incluso varias dendritas, a partir de las 24 horas. Es decir, la activación del receptor NMDA promueve el desarrollo de estas neuronas, como ha sido sugerido (Tahirovic y Bradke, 2009).

Está reportado que cuando las neuronas de molusco se tratan con el antioxidante PBN o inhibidores de la lipoxigenasa y la NADPH oxidasa, hay una reducción significativa de las ERO y una inhibición en la formación del cono de crecimiento y en el crecimiento neurítico. Además, los resultados de Munnamalai (2009) sugieren que los niveles fisiológicos de ERO que provienen en gran medida de las NADPH oxidasas y las lipoxigenasas son cruciales para el mantenimiento del citoesqueleto de F-actina en el dominio P de los conos de crecimiento. Por lo tanto, los niveles fisiológicos de ERO parecen tener un efecto positivo sobre el crecimiento neurítico en cultivos primarios neuronales por medio de la regulación del citoesqueleto de actina (Munnamalai y Suter, 2009).

Es interesante que la activación del receptor de NMDA favorezca un estado bipolar en las NGC, al igual que la velocidad de migración. Se sabe que estos dos eventos del desarrollo están relacionados. Durante la migración, la polaridad de las neuronas es de suma importancia, como lo demuestran los resultados de Uchino y cols. (2010). La migración neuronal se torna aberrante al administrar antagonistas del receptor NMDA e inhibir su actividad. La inhibición de los receptores NMDA previenen el cambio morfológico de las neuronas de un estado inmaduro multipolar (como el que se observa previo a la migración) a uno bipolar. Consecuentemente cuando hay un retraso en el crecimiento neurítico del proceso líder en la migración, se afecta este evento del desarrollo porque la neurona deja de ser guiada hacia su destino final (Uchino et al., 2010).

Aunado a la creciente evidencia acerca del efecto fisiológico de las NOX y su producción de ERO en el desarrollo neuronal, es importante conocer más sobre



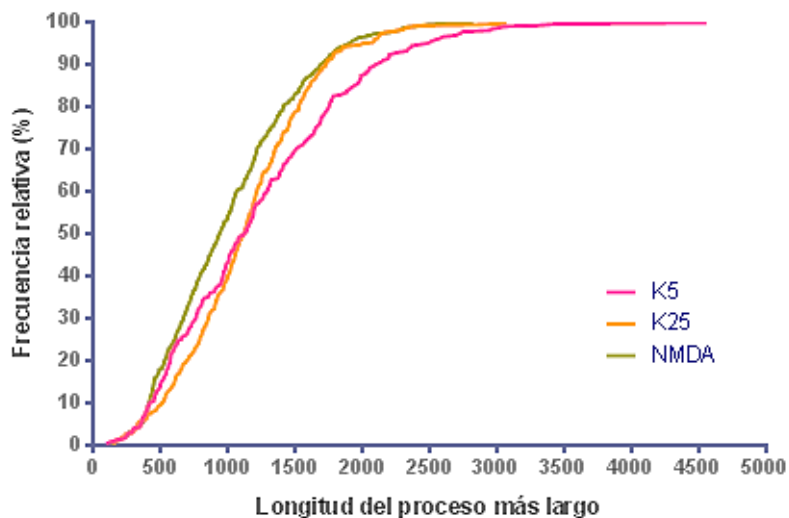
el papel que juega cada homólogo de las NOX. Por ejemplo, en un estudio se encontró que al inducir el crecimiento neurítico con NGF de células PC12 no diferenciadas hay un aumento en la producción de superóxido, provocado por el incremento de NOX1. Al mismo tiempo hay una disminución de NOX2, mientras que no se detectó la presencia de NOX4. La expresión de los homólogos de NOX está compartimentalizada y depende del tipo celular. No sólo eso, también se encontró que la inhibición de NOX1 y la reducción de la concentración de superóxido favorecen el crecimiento de las neuritas. En este caso, NOX1 podría estar regulando negativamente la diferenciación neuronal al reducir el crecimiento neurítico (Ibi et al., 2006).

Para profundizar en los mecanismos relacionados al papel de las NOX en la diferenciación de las células granulares, se está analizando el efecto del silenciamiento de los homólogos NOX1, NOX2 y NOX4, con el fin de conocer cuál es el papel de cada uno en el desarrollo de las NGC.

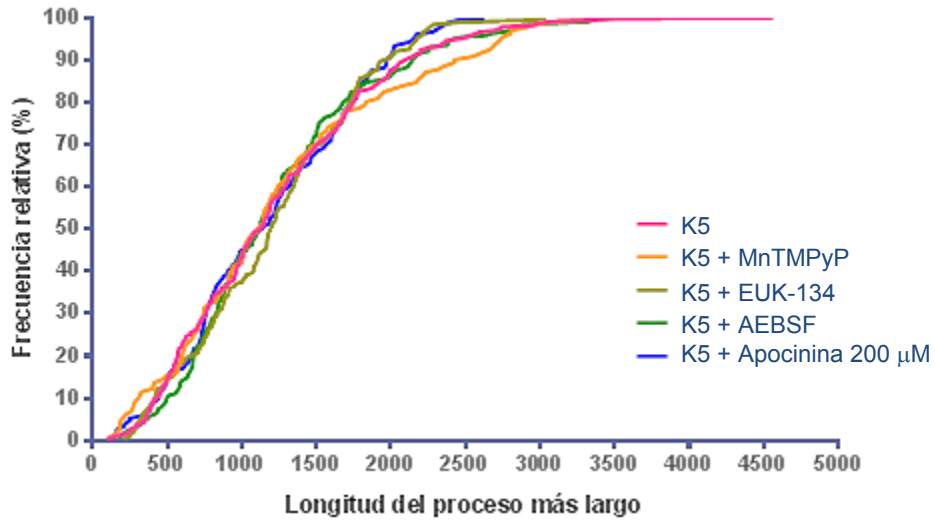
## **11. CONCLUSIONES**

- Las ERO podrían estar mediando el efecto favorable que tienen la condición despolarizante  $K^+$  25 mM y la activación de los receptores NMDA sobre la viabilidad de las neuronas granulares del cerebelo a los 5 y 7 DIV.
- Las ERO y las NOX participan en la migración de las NGC que fueron sembradas en  $K^+$  5 mM y en  $K^+$  25 mM ya que al administrar antioxidantes o inhibidores de NOX la velocidad de migración disminuye.
- Se observó que la activación de receptor NMDA aumenta la velocidad de migración y que este efecto podría estar mediado por ERO y NOX.
- Las ERO y las NOX parecen no estar involucradas en el crecimiento neurítico en ninguna de las condiciones a 1 DIV y 2 DIV, ni en la polaridad de las células.
- La activación del receptor NMDA favorece los estados de bipolaridad y multipolaridad, aunque esto no depende de las ERO ni de NOX.

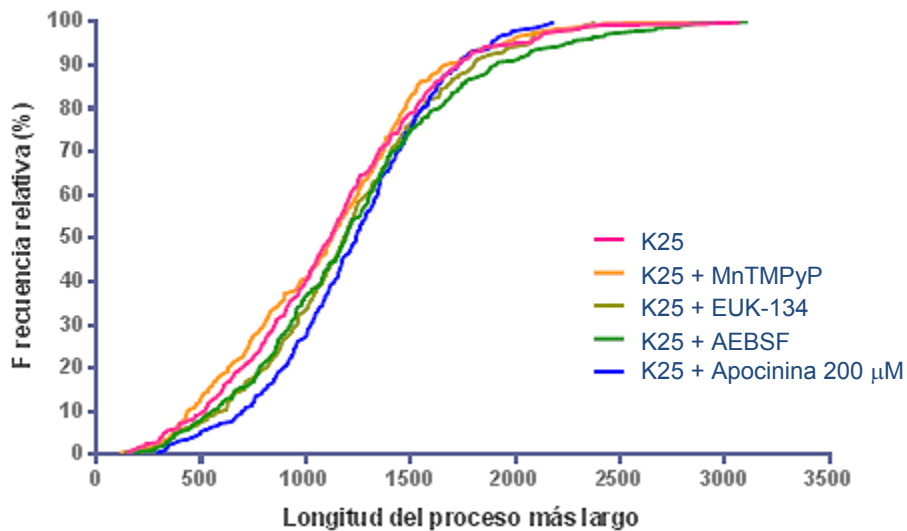
## 12. FIGURAS SUPLEMENTARIAS



**Figura A. La longitud del proceso más largo de NGC es igual en aquellas sembradas en  $K^+$  5 mM,  $K^+$  25 mM y  $K^+$  5 mM con NMDA 150  $\mu$ M por 48 h.** Se midió el proceso más largo de neuronas sembradas en las condiciones indicadas 48 horas después de ser cultivadas y se graficó la frecuencia relativa acumulada. La longitud está expresada en píxeles. No hay diferencias significativas entre las condiciones según la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Resultados de tres experimentos independientes.

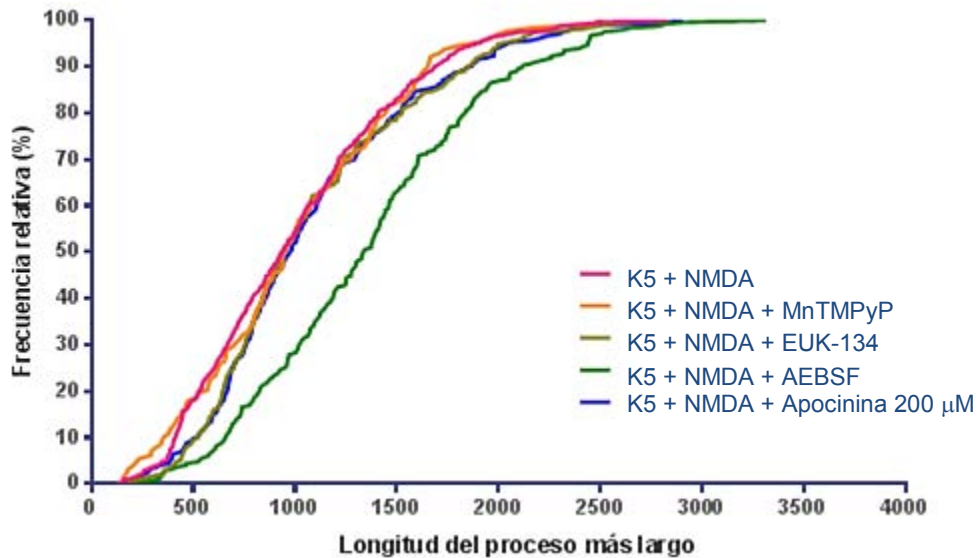


**Figura B. La longitud del proceso más largo de NGC sembradas en  $K^+$  5 mM por 48 h, no depende de ERO ni la activación de NOX.** Se midió el proceso más largo de neuronas sembradas en las condiciones indicadas 48 horas después de ser cultivadas y se graficó la frecuencia relativa acumulada. La longitud está expresada en píxeles. No hay diferencias significativas entre las condiciones según la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Resultados de tres experimentos independientes.



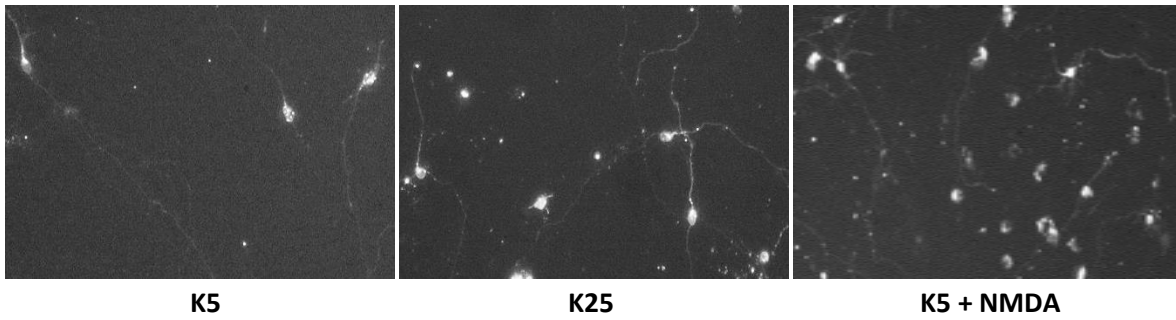
**Figura C. La longitud del proceso más largo de NGC sembradas en  $K^+$  25 mM por 48 h, no depende de ERO ni la activación de Nox.** Se midió el proceso más largo de neuronas sembradas en las condiciones indicadas 48 horas después de ser cultivadas y se graficó la frecuencia relativa acumulada. La longitud está expresada en

pixeles. No hay diferencias significativas entre las condiciones según la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Resultados de tres experimentos independientes.

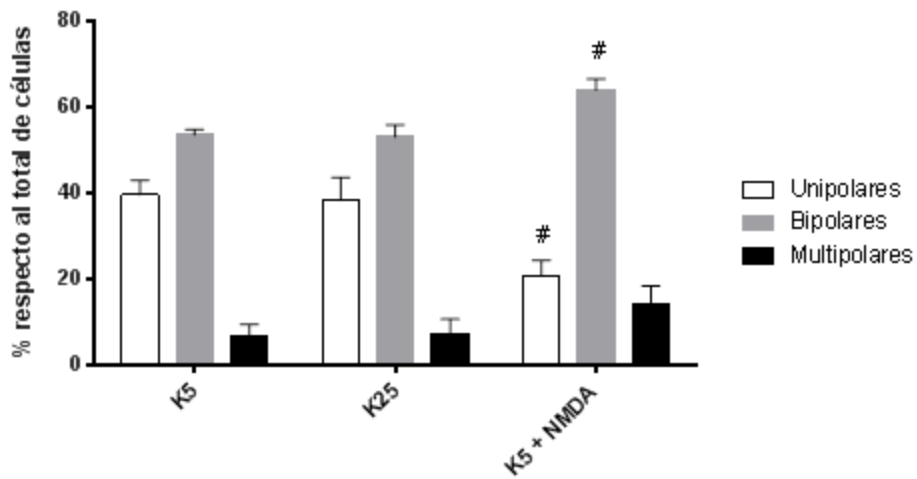


**Figura D. El crecimiento neurítico de NGC sembradas en  $K^+$  5 mM con NMDA 150  $\mu$ M es igual al de aquéllas tratadas con antioxidantes o inhibidores de NOX por 48 h.** Se midió el proceso más largo de neuronas sembradas en las condiciones indicadas 48 horas después de ser cultivadas y se graficó la frecuencia relativa acumulada. La longitud está expresada en píxeles. No hay diferencias significativas entre las condiciones según la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Resultados de tres experimentos independientes.

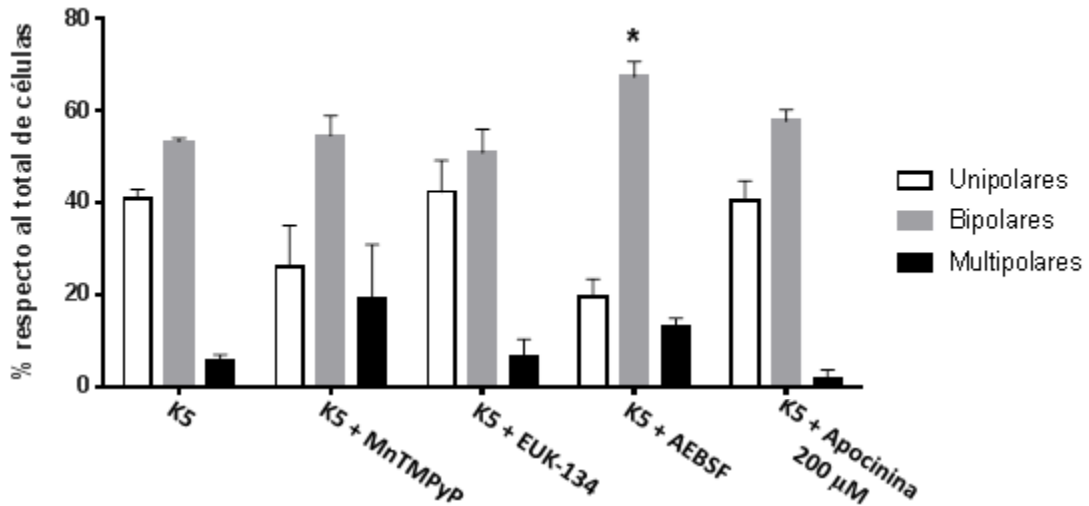
**a**



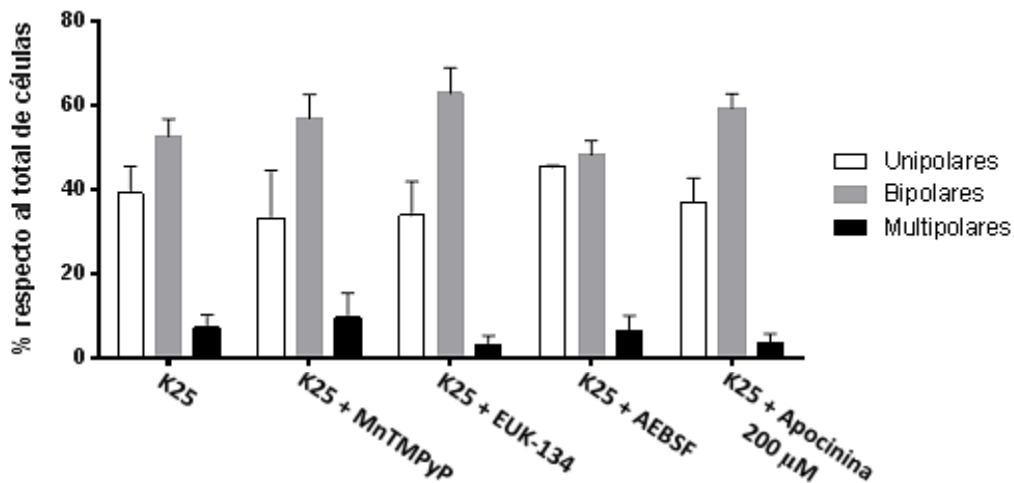
**b**



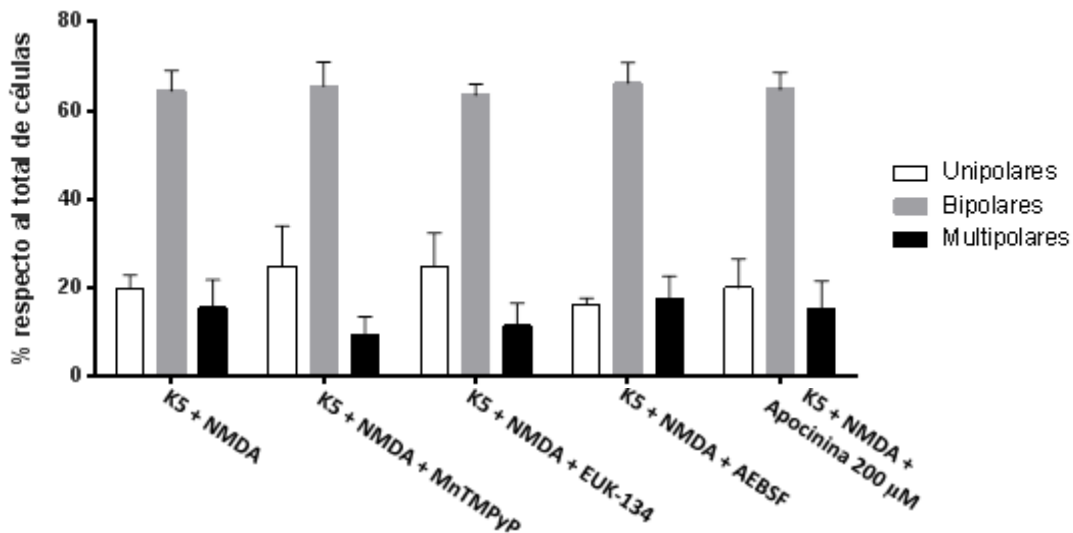
**Figura E. La cantidad de NGC bipolares aumenta en cultivos con  $K^+$  5 mM más NMDA 150  $\mu$ M, a las 48 h de haber sido sembradas.** Se registró la polaridad de todas las neuronas cuya longitud fue medida. **a)** Imágenes representativas de las NGC en las tres condiciones evaluadas. **b)** El histograma muestra el promedio de tres experimentos independientes  $\pm$ SEM. #Resultados significativamente diferentes a las condiciones K5 y K25;  $p=0.05$  según ANOVA de una vía, seguida por la prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples.



**Figura F. El inhibidor de NOX, AEBSEF, aumenta la cantidad de NGC multipolares en cultivos con  $K^+$  5 mM, a las 48 h.** Se registró la polaridad de todas las neuronas cuya longitud fue medida. El histograma muestra el promedio de tres experimentos independientes  $\pm$ SEM. \*Resultados significativamente diferentes a K5 bipolares;  $p=0.05$  según ANOVA de una vía, seguida por la prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples.



**Figura G. No hay diferencias en la polaridad de NGC en medio con  $K^+$  25 mM y al tratarlas con antioxidantes o inhibidores de NOX por 48 h.** Se registró la polaridad de todas las neuronas cuya longitud fue medida. El histograma muestra el promedio de tres experimentos independientes  $\pm$ SEM.



**Figura H. No hay diferencias en la polaridad de NGC en medio con  $K^+$  5 mM más NMDA 150  $\mu$ M y al tratarlas con antioxidantes o inhibidores de NOX por 48 h.** Se registró la polaridad de todas las neuronas cuya longitud fue medida. El histograma muestra el promedio de tres experimentos independientes  $\pm$ SEM.

### 13. REFERENCIAS

1. Adachi, T., Togashi, H., Suzuki, A., Kasai, S., Ito, J., Sugahara, K., Kawata, S. 2005. NAD(P)H oxidase plays a crucial role in PDGF-induced proliferation of hepatic stellate cells. *Hepatology*, 41:1272-1281.
2. Alavez, S., Blancas, S., Moran, J. 2006. Effect of NMDA antagonists on the death of cerebellar granule neurons at different ages. *Neurosci. Lett.* 398:241-245.
3. Alavez, S., Pedroza, D., Morán, J. 2003. Mechanisms of cell death by deprivation of depolarizing conditions during cerebellar granule neurons maturation. *Neurochem. Int.* 43:581-590.



4. Alavez, S., Gutiérrez-Kobeh, L., Morán, J. 1996. Characterization of the activation of glutaminase induced by N-methyl-D-aspartate and potassium in cerebellar granule cells. *J. Neurosci. Res.* 45:637-646.
5. Álvarez Fernández, G., Bustos Jaimes, I., Castañeda Patlán, C., Guevara Fonseca, J., Romero Álvarez, I., Vázquez Meza, H. 2010. Radicales libres y estrés oxidativo en las enfermedades neurodegenerativas. *Mensaje Bioquímico*, 34:43-59.
6. Apps, R., Garwicz, M. 2005. Anatomical and Physiological Foundations of Cerebellar Information Processing. *Nat. Rev. Neurosci.* 6:297-311.
7. Arnold, R. S., Shi, J., Murad, E., Whalen, A. M., Sun, C.Q., Polavarapu, R., Parthasarathy, S., Petros, J. A., Lambeth, J. D. 2001. Hydrogen peroxide mediates the cell growth and transformation caused by the mitogenic oxidase Nox1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:5550-5555.
8. Banfi, B. Molnár, G., Maturana, A., Steger, K., Hegedűs, B., Demaurex, N., Krause, K. H. 2001. A Ca<sup>2+</sup>-activated NADPH oxidase in testis, spleen and lymph nodes. *J. Biol. Chem.* 276:37594-37601.
9. Bazán-Peregrino, M., Gutiérrez-Kobeh, L., Morán, J. 2007. Role of Brain-Derived Neurotrophic Factor in the Protective Action of N-Methyl-D-Aspartate in the Apoptotic Death of Cerebellar Granule Neurons Induced by Low Potassium. *J. Neurosci. Res.* 85:332-341.
10. Bedard, K., Krause, K. 2007. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiol. Rev.* 87: 245-313.
11. Behar, T. N., Scott, C. A., Greene, C. L., Wen, X., Smith, S. V., Maric, D., Liu, Q-Y., Colton, C. A., Barker, J. L. 1999. Glutamate Acting at NMDA Receptors Stimulates Embryonic Cortical Neuronal Migration. *J. Neurosci.* 19:4449-4461.
12. Brennan, A. M., Suh, S. W., Won, S. J., Narasimhan, P., Kauppinen, T. M., Lee, H., Edling, Y., Chan, P. H., Swanson, R. A. 2009. NADPH oxidase is the primary source of superoxide induced by NMDA receptor activation. *Nat. Neurosci.* 12:857-863.
13. Carey, M. 2011. Synaptic mechanisms of sensorimotor learning in the Cerebellum. *Curr. Opin. Neurobiol.* 21:609-615.

14. Cheng, G., Cao, Z., Xu, X., van Meir, E. G., Lambeth, J. D. 2001. Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene* 269:131-140.
15. Choi, I. Y., Lee, S. J., Ju, C., Nam, W., Kim, H.-C., Ko, H., Kim, W.-K. 2000. Protection by a Manganese Porphyrin of Endogenous Peroxynitrite-Induced Death of Glial Cells Via Inhibition of Mitochondrial Transmembrane Potential Decrease. *Glia* 31:155-164.
16. 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.
17. 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.
18. Coyoy, A., Olguín-Albuerne, M., Martínez-Briseño, P., Morán, J. 2013. Role of reactive oxygen species and NADPH-oxidase in the development of rat cerebellum. *Neurochem. Int.* 62:998-1011.
19. Cross, A. R., Segal, A. W. 2004. The NADPH oxidase of professional phagocytes—prototype of the NOX electron transport chain systems. *Biochem. Biophys. Acta.* 1657:1-22.
20. Day, J. S., O'Neill, E., Cawley, C., Aretz, N. K., Kilroy, D., Gibney, S. M., Harkin, A., Connor, T. J. 2014. Noradrenaline Acting on Astrocytic  $\beta_2$ -Adrenoceptors Induces Neurite Outgrowth in Primary Cortical Neurons. *Neuropharmacology*, 77:234-248.
21. Dugan, L. L., Sensi, S. L., Canzoniero, L. M. T., Handran, I. S. D., Rothman, S. M., Lin, T.-S., Goldberg, M. P., Choi, D. W. 1995. Mitochondrial production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to N-methyl-D-aspartate. *J. Neurosci.* 15:6377-6388.
22. Dupuy, C., Ohayon, R., Valent, A., Noel-Hudson, M.S., Deme, D., Virion, A. 1999. Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase: Cloning of the porcine and human cDNAs. *J. Biol. Chem.* 274:37265-37269.

23. Fan, M. M. Y., Raymond, L. A. 2007. **N**-Methyl-D-aspartate (NMDA) receptor function and excitotoxicity in Huntington's disease. *Prog. Neurobiol.* 81:272-293.
24. Geiszt, M., Lekstrom, K., Witta, J., Leto, T. L. 2003. Proteins homologous to p47phox and p67phox support superoxide production by NAD(P)H oxidase 1 in colon epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 278:20006-20012.
25. Geiszt, M., Kopp, J. B., Varnai, P., Leto, T. L. 2000. Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:8010-8014.
26. Giannoni, E., Buricchi, F., Raugei, G., Ramponi, G., Chiarugi, P. 2005. Intracellular Reactive Oxygen Species Activate Src Tyrosine Kinase during Cell Adhesion and Anchorage-Dependent Cell Growth. *Mol. Cell. Biol.* 25:6391-6403.
27. Girouard, H., Wang, G., Gallo, E. F., Anrather, J., Zhou, P., Pickel, V. M., Iadecola, C. 2009. NMDA receptor activation increases free radical production through nitric oxide and NOX2. *J. Neurosci.* 29:2545-2552.
28. Guemez-Gamboa, A., Morán, J. 2009. NOX2 Mediates Apoptotic Death Induced by Staurosporine but Not by Potassium Deprivation in Cerebellar Granule Neurons. *J. Neurosci. Res.* 87:2531-2540.
29. Halliwell, B. 2001. Role of Free Radicals in the Neurodegenerative Diseases: Therapeutic Implications for Antioxidant Treatment. *Drugs & Aging,* 18:685-716.
30. Iacovitti, L., Stull, N. D., Mishizen, A. 1999. Neurotransmitters, KCl and Antioxidants Rescue Striatal Neurons from Apoptotic Cell Death in Culture. *Brain Res.* 816:276-285.
31. 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 Rad. Biol. Med.* 40:1785-1795.
32. Infanger, D. W., Sharma, R. V., Davisson, R. L. 2006. NADPH Oxidases of the Brain: Distribution, Regulation, and Function. *Antiox. Redox Signal.* 8:1583-1596.
33. Jansson, L. C., Louhivuori, L., Wigren, H. K., Nordström, T., Louhivuori, V., Castrén, M. L., Akerman, K. E. 2012. Brain-Derived Neurotrophic Factor

Increases the Motility of a Particular N-Methyl-D-Aspartate /Gaba-Responsive Subset of Neural Progenitor Cells. *Neuroscience*, 224: 223-234.

34. Kamata, H., Oka, S., Shibukawa, Y., Kakuta, 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.

35. Komuro, H., Kumada, T. 2005.  $Ca^{2+}$  transients control CNS neuronal migration. *Cell Calcium*, 37:387-393.

36. Komuro, H., Yacubova, E. 2003. Recent advances in cerebellar granule cell migration. *Cell. Mol. Life Sci.* 60:1084-1098.

37. Labelle, C., Leclerc, N. 2000. Exogenous BDNF, NT-3 and NT-4 differentially regulate neurite outgrowth in cultured hippocampal neurons. *Dev. Brain Res.* 123:1-11.

38. Lafeber, F. P., Beukelman, C. J., van den Worm, E., van Roy, J. L., Vianen, M. E., van Roon, J. A., van Dijk, H., Bijlsma, J. W. 1999. Apocynin, a plant-derived, cartilage-saving drug, might be useful in the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 38:1088-1093.

39. Lafon-Cazal, M., Pietri, S., Culcasi, M., Bockaert, J. 1993. NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. *Nature* 364: 535-537.

40. Lambeth, J. D. 2004. Nox Enzymes and the Biology of Reactive Oxygen. *Nat. Rev. Immunol.* 4:181-189.

41. Le Belle, J. E., Orozco, N. M., Paucar, A. A., Saxe, J. P., Mottahedeh, J., Pyle, A. D., Wu, H., Kornblum, H. I., 2011. Proliferative Neural Stem Cells Have High Endogenous ROS Levels that Regulate Self-Renewal and Neurogenesis in a PI3K/Akt-Dependant Manner. *Cell Stem Cell* 8:59-71.

42. Lipton, S. A., Choi, Y., Takahashi, H., Zhang, D., Li, W., Godzik, A., Bankston, L. A. 2002. Cysteine regulation of protein function – as exemplified by NMDA-receptor modulation. *Trends. Neurosci.* 25:474-480.

43. Meier, E., Hansen, G. H., Schousboe, A. 1985. The Trophic Effect of GABA on Cerebellar Granule Cells is Mediated by GABA-Receptors. *Int. J. Dev. Neurosci.* 3:401-407.

44. Moldovan, L., Moldovan, N. I., Sohn, R. H., Parikh, S. A., Goldschmidt-Clermont, P. J. 2000. Redox Changes of Cultured Endothelial Cells and Actin Dynamics. *Circ. Res.* 86:549-557.
45. Morán, J., Hernández-Pech, X., Merchant-Larios, H., Pasantes-Morales, H. 2000. Release of taurine in apoptotic cerebellar granule neurons in culture. *Eur. J. Physiol.* 439:271-277.
46. 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.
47. 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.
48. Paoletti, P., Neyton, J. 2007. NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr. Opin. Pharmacol.* 7:39-47.
49. Persico, A. M., Di Pino, G., Levitt, P. 2006. Multiple receptors mediate the trophic effects of serotonin on ventroposterior thalamic neurons in vitro. *Brain Res.* 1095:17-25.
50. Petrónio, M. S., Zeraik, M. L., da Fonseca, L. M., Ximenes, V. F. 2013. Apocynin: Chemical and Biophysical Properties of a NADPH Oxidase Inhibitor. *Molecules.* 18:2821-2839.
51. Powell, S. K., Rivas, R. J., Rodriguez-Boulan, E., Hatten, M. E. 1997. Development of Polarity in Cerebellar Granule Neurons. *J. Neurobiol.* 32:223-236.
52. Qin, L., Liu, Y., Hong, J. S., Crews, F. T. 2013. NADPH oxidase and aging drive microglial activation, oxidative stress, and dopaminergic neurodegeneration following systemic LPS administration. *Glia.* 61:855-868.
53. Rossi, D. J., Slater, N. T. 1993. The developmental onset of NMDA receptor-channel activity during neuronal migration. *Neuropharmacology.* 32:1239-1248.
54. Royer-Pokora, B., Kunkel, L. M., Monaco, A. P., Goff, S. C., Newburger, P. E., Baehner, R. L., Cole, F. S., Curnutte, J. T., Orkin, S. H. 1986. Cloning the

gene for an inherited human disorder – chronic granulomatous disease – on the basis of its chromosomal location. *Nature*. 322: 32-38.

55. Shechter, R., Schwartz, M. 2013. Harnessing monocyte-derived macrophages to control central nervous **system pathologies: no longer “if” but “how”**. *J. Pathol.* 229:332-346.

56. Sorce, S., Karl-Heinz, K. 2009. NOX Enzymes in the Central Nervous System: From Signaling to Disease. *Antioxid. Redox Signaling*, 11:2481-2504.

57. Sotelo, C. Cellular and genetic regulation of the development of the cerebellar system. *Prog. Neurobiol.* 72:295-339.

58. Stefanska, J., Sarniak, A., Wlodarczyk, A., Sokolowska, M., Pniewska, E., Doniec, Z., Nowak, D., Pawliczak, R. 2012. Apocynin reduces reactive oxygen species concentrations in exhaled breath condensate in asthmatics. *Exp. Lung. Res.* 38:90-9.

59. Stefanska, J., Sokolowska, M., Sarniak, A., Wlodarczyk, A., Doniec, Z., Nowak, D., Pawliczak, R. 2010. Apocynin decreases hydrogen peroxide and nitrate concentrations in exhaled breath in healthy subjects. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 23:48-54.

60. Suh, Y.-A., Arnold, R. S., Lassegue, B., Shi, J., Xu, X., Sorescu, D., Chung, A. B., Griending, K. K., Lambeth, J. D. 1999. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature*. 401:79-82.

61. Suzukawa, K., Miura, K., Mitsushita, J., Resau, J., Hirosei, 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.

62. Szab, C., Day, B.J., Salzman, A. L. 1996. Evaluation of the relative contribution of nitric oxide and peroxynitrite to the suppression of mitochondrial respiration in immunostimulated macrophages using a manganese mesoporphyrin superoxide dismutase mimetic and peroxynitrite scavenger. *FEBS Letters* 381:82-86.

63. Tai, K., Truong D. D. 2007. NMDA receptor-mediated excitotoxicity contributes to the cerebral hypoxic injury of a rat model of posthypoxic myoclonus. *Brain Res.* 1133:209-21.

64. Tahirovic, S., Bradke, F. 2009. Neuronal polarity. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 1:a001644.
65. Tárnok, K., Czöndör, K., Jelítai, M., Czirók, A., Schlett, K. 2008. NMDA receptor NR2B subunit over-expression increases cerebellar granule cell migratory activity. J. Neurochem. 104:818-829.
66. 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.
67. Uchino, S., Hirasawa, T., Tabata, H., Gonda, Y., Waga, C., Ondo, Y., Nakajima, K., Kohsaka, S. 2010. Inhibition of N-Methyl-D-Aspartate receptor activity resulted in aberrant neuronal migration caused by delayed morphological development in the mouse neocortex. Neuroscience, 169:609-618.
68. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., Telser, J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Intl. J. Biochem. Cell Biol. 39:44-84.
69. Vieira, H. L. A., Alves, P. M., Vercelli, A. 2011. Modulation of neuronal stem cell differentiation by hypoxia and reactive oxygen species. Prog. Neurobiol. 93:444-455.
70. Zhu, D., Lipsky, R. H., Marini, A. M. 2002. Co-activation of the phosphatidylinositol-3-kinase/Akt signaling pathway by N-methyl-D-aspartate and TrkB receptors in cerebellar granule cell neurons. Amino Acids, 23: 11-17.