



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EL PAPEL DEL GLUTATIÓ Y LAS ESPECIES
REACTIVAS DE OXIGENO EN EL DESARROLLO DE
CEREBELO DE RATA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

BRENDA VIANEY GARCÍA HERNÁNDEZ



**DIRECTOR DE TESIS:
DOCTOR JULIO EDUARDO ROQUE MORÁN
ANDRADE**

Ciudad Universitaria, CD. MX. 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

*Algún día la ciencia y la tecnología estarán al servicio del pueblo
¡Luchemos por eso!*

AGRADECIMIENTOS GENERALES

Universidad Nacional Autónoma de México por ser mi segunda casa y brindarme los mejores recursos que un estudiante puede tener.

A la Facultad de Ciencias, que se compone en conjunto por profesores, alumnos y espacios, por abrirme un lugar y generar un ambiente propicio para la razón.

Al Doctor Julio Morán Andrade por abrirme las puertas de su laboratorio, generar un ambiente constructivo y llevar a cabo la dirección de esta tesis.

Al proyecto PAPIIT-DGAPA IN206213 y Conacyt 179234.

A Mauricio Olguín-Albuerno por su asesoría constante durante este proyecto.

A la técnico Mtra. Guadalupe Domínguez por el apoyo brindado.

A todos los integrantes del laboratorio BL-302 por la incesante retroalimentación.

A la Doctora Lourdes Massieu, la Bióloga Teresa Montiel y el laboratorio AL- 302 del Instituto de Fisiología Celular por su asesoría.

Al Doctor Ricardo Tapia por colaborar con el proyecto con el préstamo del aparato rotarod para las pruebas motoras realizadas, a los integrantes de su laboratorio su ayuda con las pruebas conductuales llevadas a cabo en esta tesis.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis padres a quienes amo profundamente y agradezco su apoyo constante en todas mis decisiones. Por decirme “buen viaje” cada que salgo de casa y no impedirme hacer lo que considero correcto. Gracias por enseñarme a amar, la humildad de mis actos y el valor de la vida.

A mi hermano de quién estoy sumamente orgullosa. Gracias por apoyarme y escucharme cuando lo necesito.

A mi Abuelo Arturo a quién siempre vi tan fuerte y ecuánime que lo llevo como ejemplo. A mi abuelita Macaria que me inspiró desde pequeña el amor por el campo. A mis abuelos que no pude conocer, pero los tengo muy presentes.

A todas las personas que han formado parte de mi vida y me han enseñado con palabras y con el ejemplo, que me han acompañado en un proceso de formación y construcción constante, gracias a quienes me han mostrado que un mundo mejor para todos es posible y debemos luchar por eso colectiva e individualmente.

A Sergio por construir conmigo y re significar el amor, por ser mi compañero con todo el extenso significado de la palabra, por inspirarme día con día a conseguir mis metas. Gracias por tener la capacidad de indignarte por lo injusto y por ser una persona admirable.

A las comunidades de la montaña alta de Guerrero y a mis compañeros de la Brigada Multidisciplinaria de Apoyo a las Comunidades de México por convertirse en una familia para mí y por trabajar tan ardua y apasionadamente por convicción de lo que es justo.

A mi hermosa universidad, a mi hermoso país.

1. RESUMEN.....	7
2. INTRODUCCIÓN	8
<i>Organización histológica</i>	8
<i>Circuitos cerebelares</i>	10
<i>Desarrollo del cerebelo</i>	12
<i>Las especies reactivas de Oxígeno y el desarrollo del sistema nervioso</i>	16
<i>Las especies reactivas de oxígeno y la diferenciación celular</i>	19
<i>Papel de las ERO en la migración celular</i>	20
<i>Apoptosis y las especies reactivas de oxígeno</i>	21
<i>El glutatión</i>	25
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
4. HIPÓTESIS	29
5. OBJETIVO.....	29
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
<i>Tratamiento en ratas</i>	30
<i>Cuantificación de los niveles de glutatión en homogenados</i>	31
<i>Perfusión de los animales</i>	32
<i>Inmunohistoquímica contra BrdU</i>	34
<i>Inmunohistoquímica contra caspasa 3 activa</i>	34
<i>Actividad de Caspasa</i>	35
<i>Análisis de la morfología del cerebelo</i>	35
<i>Pruebas conductuales</i>	36
<i>Medición del tamaño del cerebelo y el grosor de la capa molecular y granular interna</i>	39
<i>Análisis estadístico</i>	39
7. RESULTADOS	39
<i>Efecto de la disminución de los niveles de glutatión en la proliferación y migración de las neuronas granulares de cerebelo</i>	41
<i>Efecto de la disminución de los niveles de glutatión en el proceso de muerte apoptótica</i>	46
<i>Efectos de la carencia de glutatión en la morfología del cerebelo</i>	49
<i>El papel la disminución del glutatión sobre la conducta</i>	54

8. DISCUSIÓN.....	58
<i>Proliferación, migración y apoptosis</i>	59
<i>Cambios morfológicos</i>	62
<i>Pruebas motoras</i>	63
9. CONCLUSIÓN.....	64
10. BIBLIOGRAFIA.....	65

1. RESUMEN

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son moléculas derivadas del oxígeno molecular, las cuales son potencialmente citotóxicas por su capacidad oxidante, sin embargo, actualmente se sabe que éstas pueden participar como segundos mensajeros en vías de señalización que actúan en numerosos procesos celulares como son los observados en el desarrollo del sistema nervioso central: proliferación, migración y muerte neuronal. El estado redox celular está determinado por la concentración y capacidad de amortiguamiento de los sistemas antioxidantes. Entre ellos, el glutatión es uno de los más importantes debido a que su concentración celular es alta y participa en numerosos procesos que impiden el daño bajo condiciones oxidantes. Estudios previos demostraron que este antioxidante es esencial para el correcto desarrollo embrionario de ratones, ya que en su ausencia el desarrollo no se completa y el animal no es viable. En este trabajo, se exploró el efecto de la ausencia de glutatión inducida por BSO – un inhibidor de su síntesis – y el consecuente aumento en los niveles de ERO en procesos específicos ocurridos en el desarrollo: proliferación, migración y muerte neuronal. Se utilizó como modelo el desarrollo postnatal del cerebelo en ratas de la cepa Wistar. Encontramos que la disminución en los niveles de glutatión no afectó la proliferación de las neuronas granulares de cerebelo, no indujo un cambio en la migración celular y tampoco tuvo efecto en la muerte apoptótica que ocurre de manera normal durante el desarrollo. Para evaluar el efecto de una reducción de glutatión en la fisiología celular, se realizaron pruebas conductuales motoras que indican de manera indirecta la participación del cerebelo. Bajo estas condiciones no se encontraron cambios conductuales inducidos por la carencia de glutatión. Estos datos sugieren que el glutatión es importante durante el desarrollo embrionario, mientras que, durante el desarrollo postnatal posiblemente existen mecanismos compensatorios de su ausencia que aseguran el correcto desarrollo del cerebelo.

2. INTRODUCCIÓN

El cerebelo es una región encefálica filogenéticamente conservada situada en la parte posterior de la corteza cerebral; recibe información sensorial de la piel, articulaciones, músculos y ojos por medio de vías aferentes; responde con proyecciones a centros motores del tronco encefálico y la corteza motora y regula movimientos finos como son la postura, el equilibrio y la corrección del movimiento. Se ha propuesto también su participación en procesos del aprendizaje motor así como el desarrollo del lenguaje, incluso en las emociones y en procesos cognitivos (Delgado- García, 2001; O'Halloran *et al.* 2011, Mothersill *et al.* 2015, Argyropoulos, 2105).

Morfológicamente, el cerebelo se compone de dos hemisferios y una región intermedia denominada vermis. Anatómicamente se divide en lóbulos anterior, posterior y floclonodular. En aves y mamíferos, los lóbulos se dividen en unidades más pequeñas denominadas lobulillos y folias (Purves, *et al.*2004).

Organización histológica

A nivel histológico, el cerebelo se organiza en tres capas; cada una de ellas tiene distintos tipos celulares interconectados. La capa externa o capa molecular se caracteriza por la presencia de las arborizaciones dendríticas de células de Purkinje , por los axones de las células granulares denominadas fibras paralelas y dos tipos de interneuronas: las células estrelladas y las células cesto. La capa media es una monocapa formada por somas de las células de Purkinje y de la glía de Bergmann. La capa interna o capa granular se conforma en su mayoría por células granulares, fibras musgosas, interneuronas denominadas células de Golgi, células de Lugaro y fibras trepadoras. Estas últimas llegan hasta la monocapa de células Purkinje y parte de la capa molecular (Voogd & Glickstein 1998; Delgado- García, 2001; Cambray- Deakin and Burgoyne, 1988; Purves 2004).

Respecto al fenotipo, las neuronas cerebelares pueden clasificarse en neuronas inhibitorias GABAérgicas y neuronas excitatorias glutamatérgicas. Dentro del grupo de las neuronas inhibitorias, se encuentran las células de Purkinje, las células en cesto, las células estrelladas y las células de Golgi y Lugaro, mientras que aquellas de fenotipo excitatorio son las neuronas granulares, (Hoshino, 2006). (Figura 1).

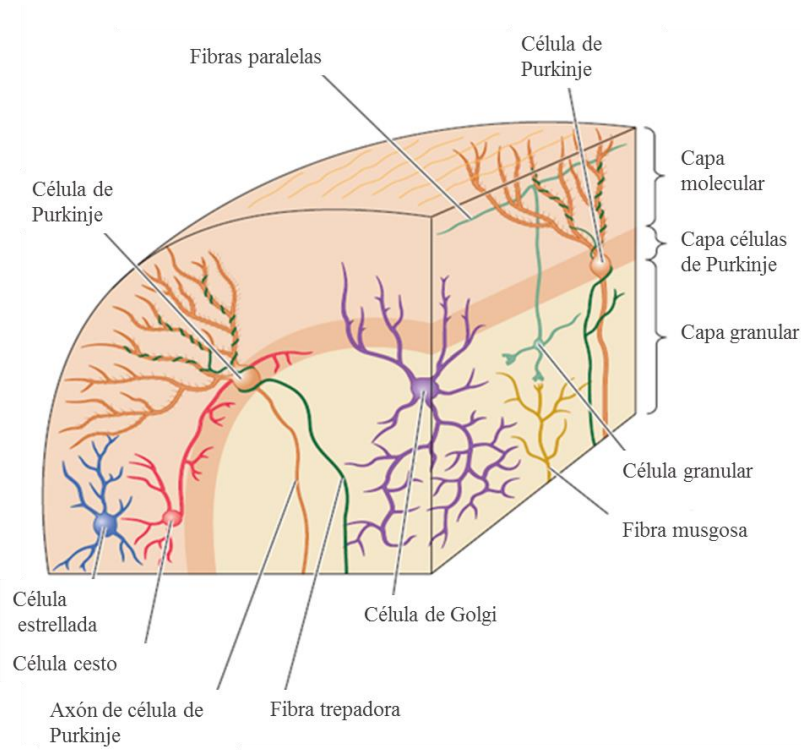


Figura 1. Esquema de la organización histológica del cerebelo. Se pueden observar las tres capas que lo conforman: la capa molecular formada por arborizaciones dendríticas de las células de Purkinje, proyecciones de las fibras trepadoras, fibras paralelas e interneuronas; la capa de células Purkinje formada por la monocapa de los somas de las células de Purkinje y la capa granular en la que se encuentran las células granulares, las fibras musgosas y las células de Golgi. Imagen modificada de Purves et al. 2004.

Circuitos cerebelares

La corteza cerebelar madura recibe tres entradas principales de información: una proveniente de las fibras trepadoras, las cuales se originan en la oliva inferior localizada en el tronco cerebral que ingresa al cerebelo a través del pedúnculo medio y se dirige a las células de Purkinje ubicadas en la capa intermedia de la corteza cerebelar. La segunda y tercera entradas de información provienen de las fibras musgosas que ingresan al cerebelo por el pedúnculo inferior. Un grupo de estas fibras ingresa la información proveniente de la corteza por medio de proyecciones que surgen del relevo de información en el núcleo pontino y el otro grupo ingresa la información propio sensorial proveniente de la médula espinal (Houk *et al.* 1996; Glickstein & Doron, 2008; Bengtsson & Hesslow, 2006) (Figura 2).

Toda la información que entra al cerebelo desemboca en las células de Purkinje. Sus axones establecen contacto con los núcleos cerebelares profundos. Con relación a éstos últimos existen tres pares, dirigen sus proyecciones a diferentes regiones del puente o del tálamo y de esta manera se comunican con vías descendentes y con la corteza cerebral. En cuanto a la información que transmite cada par de núcleos, se sabe que el núcleo fastigial envía sus proyecciones al núcleo vestibular o reticular en el puente y que está asociado con el balance y la postura. Los núcleos dentado e interpósito envían sus axones al tálamo y núcleo rojo y pueden llevar información a la corteza y regular el movimiento voluntario; asimismo, es sabido que el núcleo dentado tiene proyecciones no motoras que activan diferentes áreas corticales (Delgado- García, 2001; Strick, Dum & Fietz, 2009).

Respecto a los circuitos neuronales, es importante mencionar que tanto en roedores como en humanos la formación concluye postnatalmente debido a que el cerebelo continúa su desarrollo después del nacimiento (Altman, 1985; Donkelaar *et al* 2003).

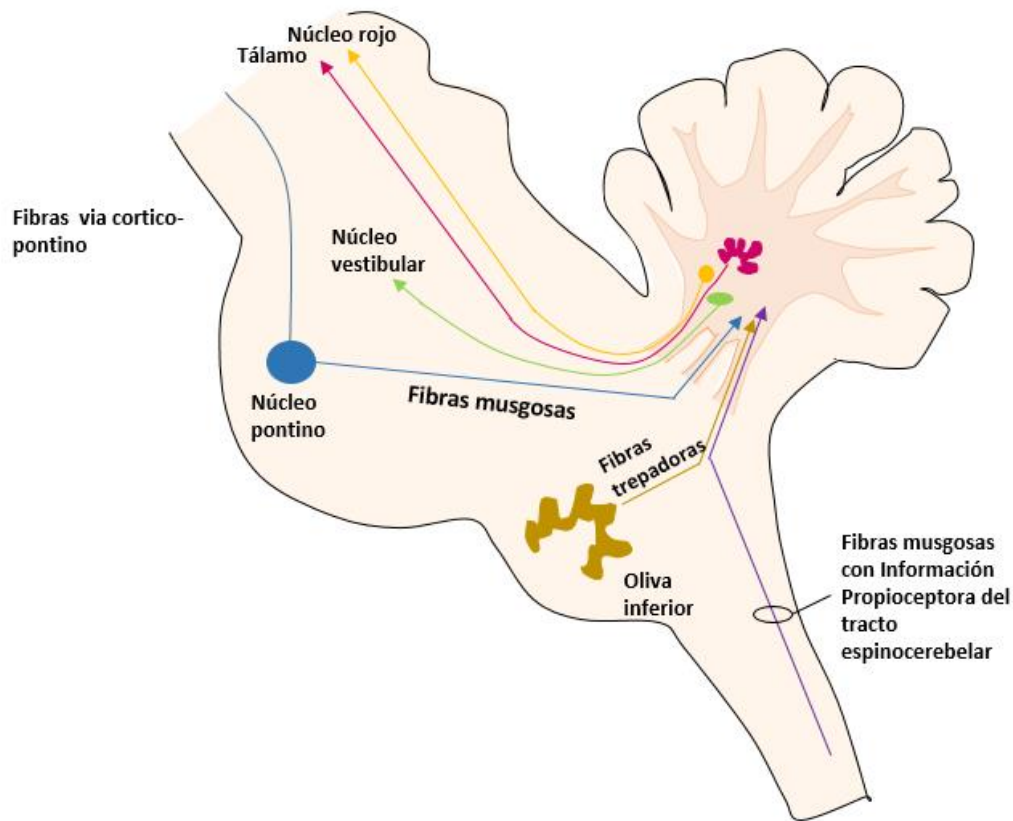


Figura 2. Esquema que representa las entradas y salidas de información en el cerebelo. Existen dos tipos de fibras que conducen las aferencias hacia el cerebelo: unas son las fibras trepadoras que ingresan hasta el árbol dendrítico de las células de Purkinje y otras son las fibras musgosas que ingresan a las dendritas de las neuronas granulares en la capa granular interna. En cuanto a estas últimas fibras, la información que conducen proviene de la oliva inferior ubicada en la superficie ventral del bulbo raquídeo, mientras que las fibras musgosas conducen información proveniente de diferentes fuentes: una es el tracto espinocerebelar y otra el núcleo pontino que es sitio de relevo de información descendente de la vía cortico-pontino-cerebelosa. Todas las entradas de información ingresan por los pedúnculos cerebelar inferior y medio. Respecto a la salida de información, los núcleos cerebelares son un sitio de relevo desde los cuales, las fibras salen por el pedúnculo superior. Del núcleo fastigial se conduce información que proyecta hacia el núcleo vestibular (color verde), del núcleo interpósito (color naranja) surgen proyecciones que se dirigen hacia el tálamo, mientras que en el núcleo dentado (color morado) se releva la información que se dirige hacia el núcleo rojo además de proyecciones no motoras que se dirigen a regiones corticales.

Desarrollo del cerebelo

El neuroepitelio a partir del cual surge el cerebelo sufre modificaciones tanto estructurales como genéticas a lo largo de estadios secuenciales que ocurren durante el proceso de desarrollo. Así, el primordio cerebelar sirve como plataforma para que diversos tipos celulares sean generados. En este aspecto, el cerebelo es una región única en comparación con el resto del encéfalo debido a que presenta dos regiones germinales especializadas desde las cuales surgen tanto células gliales como neuronas.

El proceso de formación del cerebelo comienza con una protuberancia que surge de la pared del cuarto ventrículo (Altman, 1985; Wang & Zoghbi, 2001). En el techo de este ventrículo, se encuentra el neuroepitelio ventricular: una capa de células germinales que da origen a las neuronas de fenotipo GABAérgico -células de Purkinje, las células estrelladas, las células de cesto y las interneuronas de Golgi y las de Lugaro-. Los progenitores de las células granulares surgen de una segunda capa germinal denominada *rhombic lip*; desde este neuroepitelio las células migran hasta la capa granular externa que se encuentra apoyada en la capa molecular donde se sitúan para dar origen a una región altamente proliferativa (Wang & Zoghbi, 2001) Figura 3.

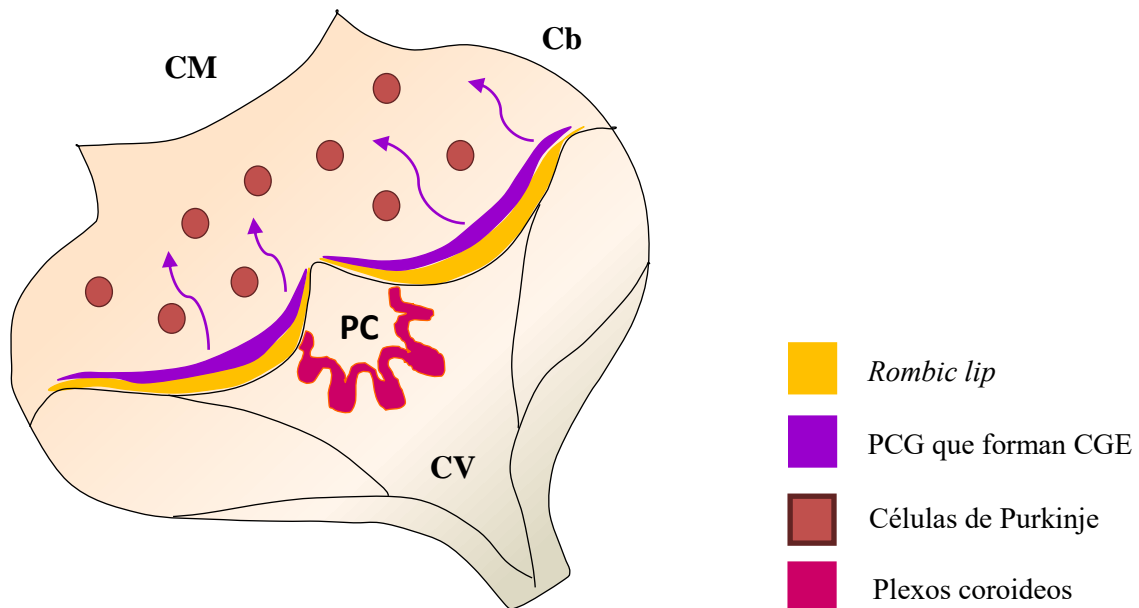


Figura 3. Esquema que muestra con flechas la migración de los precursores de células granulares (PCG) desde la capa precursora (color morado) que se localiza por encima de la a región denominada *Rombic lip* (color amarillo) a partir de la cual surge. La migración de precursores de células granulares da origen a la capa granular externa, que, durante el desarrollo postnatal aumentará en número de células para dar lugar a la capa granular interna a través de la migración neuronal. Las células de Purkinje se encuentran en la región bajo la capa granular externa debido a que migran primero a partir de otra región germinal ubicada en el cuarto ventrículo al igual que las interneuronas. Cb. Cerebelo, CM cerebro medio, CV, cuarto ventrículo.

En rata, la capa granular externa persiste aproximadamente hasta el día postnatal 21. Se divide en dos regiones: la zona de proliferación y la zona premigratoria (Burgoyne & Cambray- Deakin, 1988; Yacubova & Komuro, 2003). Durante los primeros días después del nacimiento, las células se dividen en la zona proliferativa para después situarse en la zona premigratoria (Cambray- Deakin, 1988).

A lo largo del desarrollo se presentan dos marcados aumentos en la proliferación de células granulares. El primero de ellos ocurre en el periodo de embriogénesis, y da lugar a la capa granular externa. El segundo aumento ocurre entre los días postnatales 4-8. Durante este periodo, las células progenitoras proliferan en la monocapa granular externa hasta aumentar el espesor de ésta a 8 células. (Altman & Bayern, 1997; Behesti & Marino, 2009.)

Al salir de la zona proliferativa las células granulares se ubican en la zona premigratoria, se orientan en un plano transversal y extienden dos procesos horizontales situados paralelamente al eje de la folia, los cuales formarán las fibras paralelas (Burgoyne& Cambray- Deakin 1988). Cuando las células se encuentran en la parte apical de la capa molecular se forman otros procesos que mantienen un estrecho contacto con los procesos de la glía de Bergmann; a través de éstos comienzan a migrar hasta la capa de células de Purkinje (Burgoyne& Cambray- Deakin 1988, Altman, 1985). En esta región pierden el contacto con la glía de Bergmann y entran a una fase estacionaria donde ocurren cambios morfológicos: de una forma elongada se derivan a una forma esférica y desarrollan

lamelopodios o filopodios que responden a otros estímulos que guían la migración en la capa granular interna (Komuro & Yacubova, 2003) Figura 4.

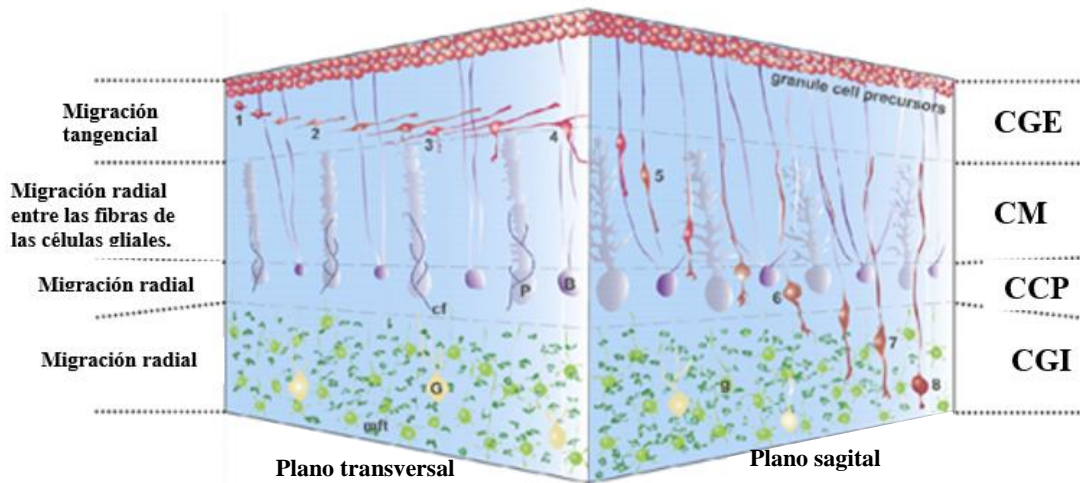


Figura 4. Esquema que representa la migración de las células granulares desde la capa granular externa hacia su disposición final en la capa granular interna. La migración de las células granulares comienza de forma tangencial a la capa granular externa, cuando la célula ingresa a la capa molecular, la morfología es modificada y extiende dos procesos, uno de ellos permanece en la capa molecular donde se bifurca y da lugar a las fibras paralelas, el otro se mantiene en contacto con la glía de Bergmann que guía la migración hasta la capa de células de Purkinje. En esta capa, la neurona asume una forma esférica y pierde contacto con la glía; entonces, comienza una segunda fase migratoria independiente que finaliza en el fondo de la capa granular interna. CGE, capa granular externa, CM capa molecular, CCP capa de células de Purkinje, CGI, capa granular interna. Modificado de Komuro *et al* 2003.

Una señal importante para la maduración y supervivencia de las neuronas granulares es la activación del receptor tipo NMDA por el glutamato liberado por las fibras musgosas; esta señal induce la entrada de cationes de calcio que conduce a la activación de factores de transcripción, necesarios para la supervivencia neuronal. Durante el desarrollo del cerebelo ocurre el proceso de muerte programada en aquellas neuronas que no recibieron despolarización glutamatérgica (Contestabile, 2002; Xifró et al, 2014).

Los mecanismos de muerte se inducen por medio de la activación de la vía JNK que conduce a la fosforilación de la proteína c-jun y en consecuencia induce la transcripción de

genes asociados a muerte. Se ha detectado la activación del ligando Fas río abajo de la fosforilación de c-jun y la activación de caspasas efectoras como la caspasa 3. Esta muerte garantiza la eliminación de las células que no presentan una actividad correcta. En rata se sabe que este proceso de muerte ocurre de forma aumentada alrededor del día postnatal 16 (Contestabile, 2002).

La glía de Bergmann

Como se mencionó anteriormente, la glía de Bergmann juega un papel importante durante el desarrollo del cerebelo ya que sus procesos funcionan como rieles a través de los cuales las células granulares migran hacia la capa de células de Purkinje. Este tipo de glía, conformada por astrocitos, se denomina “De Bergmann” en honor a la primera persona que describió sus fibras; su particular localización y su función durante el desarrollo del cerebelo la hacen una glia especializada. Con respecto a su desarrollo, Altman en 1972 sugirió la posibilidad de que surgieran de la región denominada *Rombic lip* al igual que las células granulares, sin embargo, su proveniencia no se ha podido confirmar aún. Se sabe que se encuentra en el cerebelo desde estadios tempranos durante la etapa embrionaria (Día 17) y, al igual que las células granulares, después del nacimiento (DPN 0- DPN4) se lleva a cabo la migración hasta su posición final. Para el día postnatal 4, el soma ya se localiza por debajo de la capa de células de Purkinje, desde ahí, extiende procesos de forma radial que cruzan la capa molecular y la granular externa y hacen contacto con un pie terminal con la membrana basal (Fan et al. 2013; Buffo & Rossi 2013).

Una vez culminado el desarrollo del cerebelo; los procesos de la glía de Bergmann que se encuentran en interacción con las zonas sinápticas entre las células de Purkinje y las fibras paralelas, forman estructuras denominadas “microdominios” cuya función es capturar el glutamato liberado por las fibras paralelas por medio de los transportadores de glutamato/aspartato que se encuentran en la glía, y así evitar la sobre-estimulación de las células de Purkinje (Buffo & Rossi 2013).

Las especies reactivas de Oxígeno y el desarrollo del sistema nervioso

Como consecuencia de la alta tasa metabólica y riqueza en ácidos grasos polinsaturados, la susceptibilidad al daño oxidativo por ERO es mayor en el cerebro. La lipoperoxidación, oxidación de aminoácidos, muerte apoptótica o necrótica son algunos efectos conocidos de las especies reactivas (Delgado-García, 2001). Es sabido que en enfermedades neurodegenerativas como Parkinson y Alzheimer existe un aumento importante de ERO que causa daño celular; no obstante, se ha sugerido que el peróxido de hidrógeno participa en procesos fisiológicos como regulador de vías de señalización por medio de la oxidación de ciertas proteínas, lo cual promueve un cambio en la función de éstas (Andersen, 2004; Apel & Hirt, 2004).

“Especies reactivas de oxígeno” es un término general que se utiliza para nombrar a las moléculas derivadas de oxígeno que son químicamente reactivas y potencialmente citotóxicas. Dentro de este término se incluyen a los radicales libres como el anión superóxido (O_2^-) y radical hidroxil (OH^-) y a los no radicales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Circu & Aw, 2010).

Evolutivamente surgen como consecuencia del cambio en la composición atmosférica que originó un ambiente oxidante. Son generadas en la célula por diversas fuentes, una de ellas la cadena transportadora de electrones en la mitocondria. La función de este complejo es producir ATP a través de la generación de un gradiente de protones y un flujo de electrones, para ello utiliza O_2 como aceptor que al unirse a H^+ se reduce a agua. Es sabido que existe fuga del 1-2% de los electrones transferidos al O_2 , lo cual lleva a la producción de anión superóxido. Fuentes alternas de ERO incluyen al citocromo p450 en retículo endoplásmico, el sistema xantina/xantina oxidasa y la familia de enzimas NADPH oxidasas (NOX) (Arnér and Nordberg, 2001; Apel and Hirt, 2004) (Figura 5).

Las NADPH-oxidasas se diferencian de las otras fuentes de ERO en que su única función identificada es generar anión superóxido. Estos complejos están compuestos de varias subunidades que catalizan la reducción del oxígeno molecular a anión superóxido por medio de la oxidación de NADPH. La primera isoforma estudiada fue NOX2, presente en fagocitos, donde es bien conocida su participación en el estallido respiratorio de O_2^- como defensa ante agentes patógenos como bacterias (Lambeth, 2004). Posteriormente se estudió la localización de esta enzima en otros tipos celulares del sistema nervioso central. Actualmente se conocen 7 genes de NOX que conforman los homólogos NOX 1-5 y las oxidasas duales, DUOX 1 y 2. La activación de estas enzimas es diversa, la isoforma 4 es constitutivamente activa mientras que la isoforma 2 depende de la interacción entre las proteínas transmembranales gp91phox y p22phox con las subunidades citosólicas p47phox, p67phox, p40phox y una proteína Rho que une a las proteínas Rac1 ó 2. Otras isoformas de NOX están asociadas con la proteína membranal p22 y otras subunidades citosólicas (Leto *et al.* 2009).

La familia NOX está ampliamente distribuida en el sistema nervioso central y en otros tejidos. Se han identificado transcritos de NOX1, NOX2 y NOX4 en homogenados de tejido cerebral. En estudios recientes también se ha mostrado que dichas enzimas aumentan su transcripción y actividad durante el desarrollo del sistema nervioso central (Davisson *et al* 2006; Krause *et al*, 2014) al igual que en el desarrollo postnatal del cerebelo (Coyoy *et al* 2013). Estudios relativamente recientes han demostrado que la expresión o actividad de las isoformas de las NOX están relacionadas con la producción de ERO observada en distintos eventos que ocurren durante el desarrollo como son la proliferación, la diferenciación, la migración y la muerte de distintos tipos celulares.

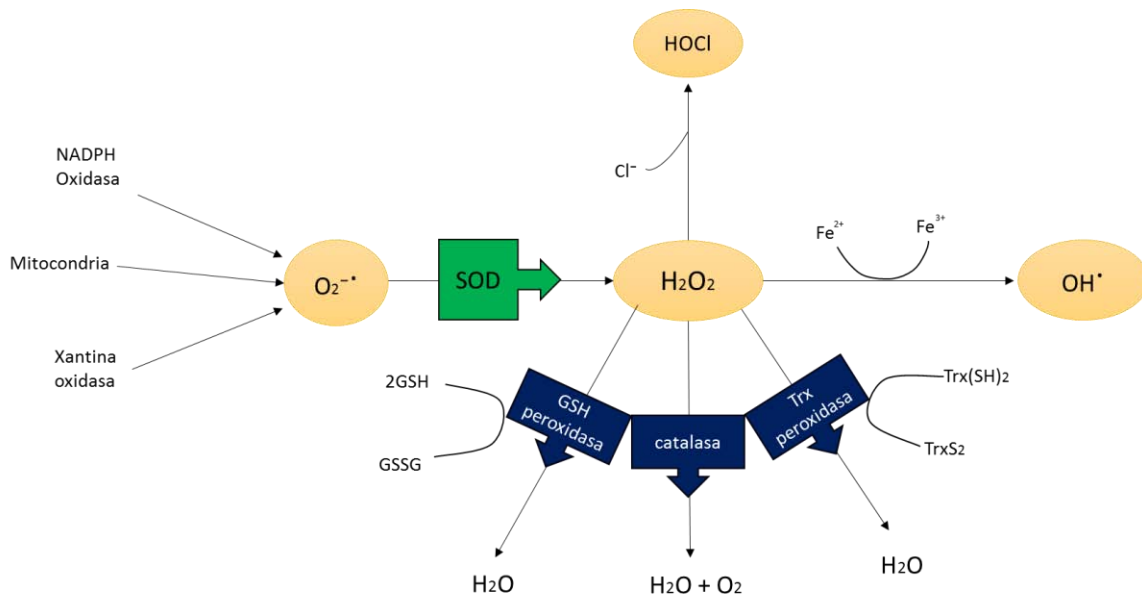


Figura 5. Especies reactivas de oxígeno, mecanismos de formación de otras especies a partir del anión superóxido y de detoxificación. El anión superóxido puede ser producido por diversas fuentes entre las que se encuentran: el grupo de enzimas NADPH oxidasas, la mitocondria y la xantina oxidasa; esta especie puede ser transformada a peróxido de hidrógeno por medio de la enzima superóxido dismutasa (SOD). A su vez, el peróxido de hidrógeno puede sufrir diferentes transformaciones: por una parte, puede sufrir una conversión espontánea, vía la reacción de Fenton dependiente de Fe^{2+} , y generar el radical hidroxil (OH^\bullet), una especie sumamente reactiva. También puede ser usado por la enzima mieloperoxidasa para oxidar el cloruro y formar ácido hipocloroso y por último, el peróxido de hidrogeno puede ser detoxificado y generar agua por medio de las enzimas GSH peroxidasa, catalasa y TRX peroxidasa.

Las especies reactivas de oxígeno y la diferenciación celular

El grupo de Krause y colaboradores en 2006 estudió la participación de las ERO generadas por NOX4 como moléculas señalizadoras implicadas en la diferenciación de cardiomiocitos de ratón a partir de células madre embrionarias. Ellos encontraron que concentraciones nanomolares de peróxido de hidrógeno pueden regular los primeros estadios de la cardiomiogénesis y que la diferenciación celular se afecta en presencia de antioxidantes y en células deficientes de NOX4. También encontraron que altas concentraciones de ERO inhiben la diferenciación.

Estudios previos realizados por el grupo de Kamata (2000) también demostraron que las enzimas NOX participan en la diferenciación de células PC12 a neuronas tipo simpáticas inducida por el factor de crecimiento nervioso. Ambos trabajos asocian la producción de ERO implicada en el proceso de diferenciación con las enzimas NOX como su principal fuente, sin embargo, estudios previos sugieren a las ERO como mensajeros intracelulares que promueven la diferenciación sin asociarlas a una fuente específica. Un ejemplo de esto son los trabajos de Crossin y colaboradores que en 2005 mostraron que las células diferenciadas de células embrionarias corticales presentan una mayor cantidad de ERO, mientras que los astrocitos presentan bajos niveles de ERO. Con esto sugirieron que la producción de ERO determina el fenotipo celular, en otras palabras, determina si una célula embrionaria dará origen a una célula glial o a una neurona. En 2006 mostraron que en neuronas jóvenes se producen niveles altos de ERO en regiones neurogénicas como el hipocampo y el bulbo olfatorio en cerebro adulto, por otro lado estas ERO son producidas cuando las neuronas se diferencian de las células progenitoras multipotentes.

En suma, los estudios citados anteriormente muestran a las ERO como moduladoras de procesos fisiológicos complejos como la diferenciación celular y sugieren a las NOX como su posible fuente.

Papel de las ERO en la migración celular

Se conoce poco sobre el papel que juegan las ERO en la migración celular. Se sabe que en un modelo de células derivadas de endotelio y en leucocitos, las ERO generadas por las NOX promueven migración celular, ya que los inhibidores de estas enzimas redujeron la migración de manera significativa. En un modelo *in vivo* se encontró que NOX2 participa en la migración de células vasculares endoteliales inducida por el factor de crecimiento vascular endotelial (Abid, 2000); no obstante, los resultados aún son contradictorios debido a que otros estudios han encontrado que en modelos de neovascularización inducidos por isquemia, los ratones deficientes de NOX2 presentaron mejor vascularización (Tojo *et al*, 2005).

Aunado a esto, evidencia reciente sugiere que las ERO provenientes de la mitocondria pueden participar también en el proceso de migración de las células endoteliales (Wang *et al*, 2011).

En cuanto a los mecanismos moleculares que podrían estar participando en la migración celular modulada por las ERO, se sabe que:

- 1) las proteínas GTPasas que actúan en la remodelación del citoesqueleto son susceptibles de ser reguladas por el estado redox de la célula. Un ejemplo de ello es la proteína RhoA, ya que las ERO producidas por NOX inhiben a RhoA, lo que genera cambios en el citoesqueleto necesarios para la migración (Stanley *et al*. 2014).
- 2) El peróxido de hidrógeno puede regular a factores de transcripción como AP-1, que inducen la expresión de VEGF, el cual mediante acción parácrina induce la migración.
- 3) El peróxido de hidrogeno también induce la expresión de metaloproteasas que llevan a la disrupción de la matriz extracelular, que es un paso necesario para la migración celular (Yung *et al* 2014).

- 4) Las ERO generadas por Nox1 inducen la desfosforilación y activación de la cofilina, la cual promueve la despolimerización de la F-actina de los microfilamentos (Schröder *et al* 2014).
- 5) La ERO pueden regular la migración de manera independiente a la oxidación de proteínas. Un ejemplo de ello es la glutationilación de la G-actina inducida por el aumento en el ambiente oxidante celular a manera de protección de la función. La actina es susceptible a la oxidación en las cisteínas, principalmente la 374 que se encuentra expuesta. La oxidación de esta cisteína promueve la formación de un puente disulfuro inter o intra molecular, así como la formación de ácidos sulfínicos y sulfónicos que inducen la pérdida de la función de la proteína. La glutationilación es un medio de respuesta contra la oxidación de proteínas que normalmente conduce a la pérdida de su función. Sin embargo, al unirse el glutatión a la actina, ésta se mantiene como G-actina, que es incapaz de ser utilizada para la polimerización de los microtúbulos y por lo tanto promueve la despolimerización del citoesqueleto (Sakai *et al* 2012).

Apoptosis y las especies reactivas de oxígeno

El proceso de muerte apoptótica es un proceso evolutivamente conservado y altamente organizado que se caracteriza por la condensación de la cromatina, la liberación de citocromo C, la formación de cuerpos apoptóticos y la fragmentación del ADN (Jordan *et al* 2003). Algunos de estos sucesos se llevan a cabo por la activación de las proteasas de cisteína - caspasas - que se encuentran como zimógenos inactivos y que se activan por medio de la agregación en dímeros o complejos macromoleculares por la unión de los dominios N-terminal (McIlwain *et al* 2013).

La muerte apoptótica puede ocurrir mediante dos vías principales: la muerte activada por receptor o la muerte mediada por la mitocondria. La primera depende de la activación de receptores de muerte que son miembros de la superfamilia de genes de receptores TNF y de la posterior formación de complejos señaladores inductores de muerte. Cuando el

ligando activa al receptor, proteínas citoplásmicas adaptadoras se unen a una región intracelular de éste, compuesta de aproximadamente 80 aminoácidos, denominada “dominio de muerte”. Estas proteínas adaptadoras se dimerizan y asocian a pro-caspasas iniciadoras –caspasa 8- que se activan por auto-ruptura catalítica (Elmore, 2007).

Es conocido que la apoptosis puede inducirse de forma independiente a la activación del receptor de muerte por diversos eventos como: la ausencia de factores de crecimiento, hormonas y citosinas y por estímulos de estrés oxidativo, radiación y toxinas. La vía intrínseca se inicia con eventos que ocurren en la mitocondria y que promueven cambios en el potencial transmembranal; como consecuencia, se forman poros de transición a través de los cuales, se liberan proteínas pro-apoptóticas - citocromo C, smac/DIABLO- que participan en la activación de caspasas. Además de éstas, otro grupo de proteínas es liberado de la mitocondria: AIF, endonucleasa G y CAD; ellas participan en el proceso de muerte de forma independiente a la activación de caspasas. Las dos primeras se translocan al núcleo, fragmentan del ADN y participan en la condensación de la cromatina. CAD requiere ser escindida por caspasa 3 para activarse e inducir la condensación de la cromatina (Elmore, 2007; Shen &Pervaiz, 2006).

La liberación de proteínas pro-apoptóticas de la mitocondria al citosol involucra la formación de un megaporo en las membranas interna y externa. Este poro permite el ingreso de moléculas pequeñas y agua a la matriz mitocondrial que induce la ruptura membranal. La formación del megaporo, al igual que el cambio en la permeabilidad de la membrana está regulado por proteínas de la familia Bcl-2 cuyos miembros pueden actuar tanto promoviendo, como inhibiendo el proceso de apoptosis (Circu & Aw2008; Contestabile *et al* 2002; Sastry & Rao, 2000; Shen &Pervaiz, 2006) (Figura 6).

También se ha demostrado que existe una vía intrínseca del retículo endoplásmico originada por la acumulación de proteínas mal plegadas y cambios en la homeostasis del calcio, los cuales promueven la activación del receptores del retículo PERK, ATF6 e IRE1 que se relacionan con la activación de caspasa 12 y la consecuente activación de caspasas ejecutoras (Vojtisek, 2006).

Debido a que el proceso de muerte se ve acompañado por un aumento en la generación de ERO, se ha estudiado su papel en la muerte apoptótica (Satoh *et al.*, 1998). Se encontró en estudios realizados por Satoh y col. (1998) que existe un incremento de anión superóxido durante la muerte apoptótica inducida por privación de factores tróficos. En este sentido, se ha observado que el tratamiento con antioxidantes –uno de ellos, la enzima superóxido dismutasa- protege a las neuronas de la muerte por privación de factores tróficos. Estudios posteriores encontraron que tanto el anión superóxido como la activación de vías de la familia de MAPK pueden inducir la activación de caspasa 3 (Morán & Valencia, 2004; Zhuang *et al.* 1998). Tammariello en 2000 estudió la contribución de las proteínas NOX en la muerte apoptótica y concluyó que éstas contribuyen al modelo clásico de la muerte apoptótica. Finalmente, en modelos de muerte neuronal inducida por concentraciones bajas de potasio y por estaurosporina, también se encontró que la muerte está mediada por ERO y que las NOX juegan un papel central en este proceso. (Morán & Valencia, 2004).

Dentro de las vías de señalización que se activan ante un proceso de muerte, las vías JNK y p38 han sido ampliamente estudiadas y se ha demostrado que son reguladas por el ambiente redox. La activación de JNK se da por dos vías: una mediada por TRAF2 que induce la activación temprana de JNK y la otra mediada por ERO. La activación de JNK por ERO se da a través de la proteína ASK1, la cual está regulada por la proteína tioredoxina. Esta proteína está modulada por su estado redox. En su forma reducida es capaz de unirse al ASK1 y bloquear su actividad de cinasa. En presencia de peróxido de hidrógeno, la proteína tioredoxina se oxida y se disocia de ASK1, lo cual permite que ASK1 active JNK (Shen & Pervaiz, 2006). Además, se encontró en un modelo de muerte neuronal producida por bajos niveles de potasio y por estaurosporina, que el proceso de muerte es dependiente de la activación de p38, la cual es mediado por ERO provenientes de NOX (Ramiro- Cortés & Morán, 2009).

Todos estos trabajos demuestran que las ERO juegan un papel importante en la muerte neuronal y que esta muerte es regulada a varios niveles por el ambiente redox de la célula

ya que pueden inhibir o inducir el avance de la muerte y, finalmente, que las fuentes de ERO que participan en dicho proceso son las NOX.

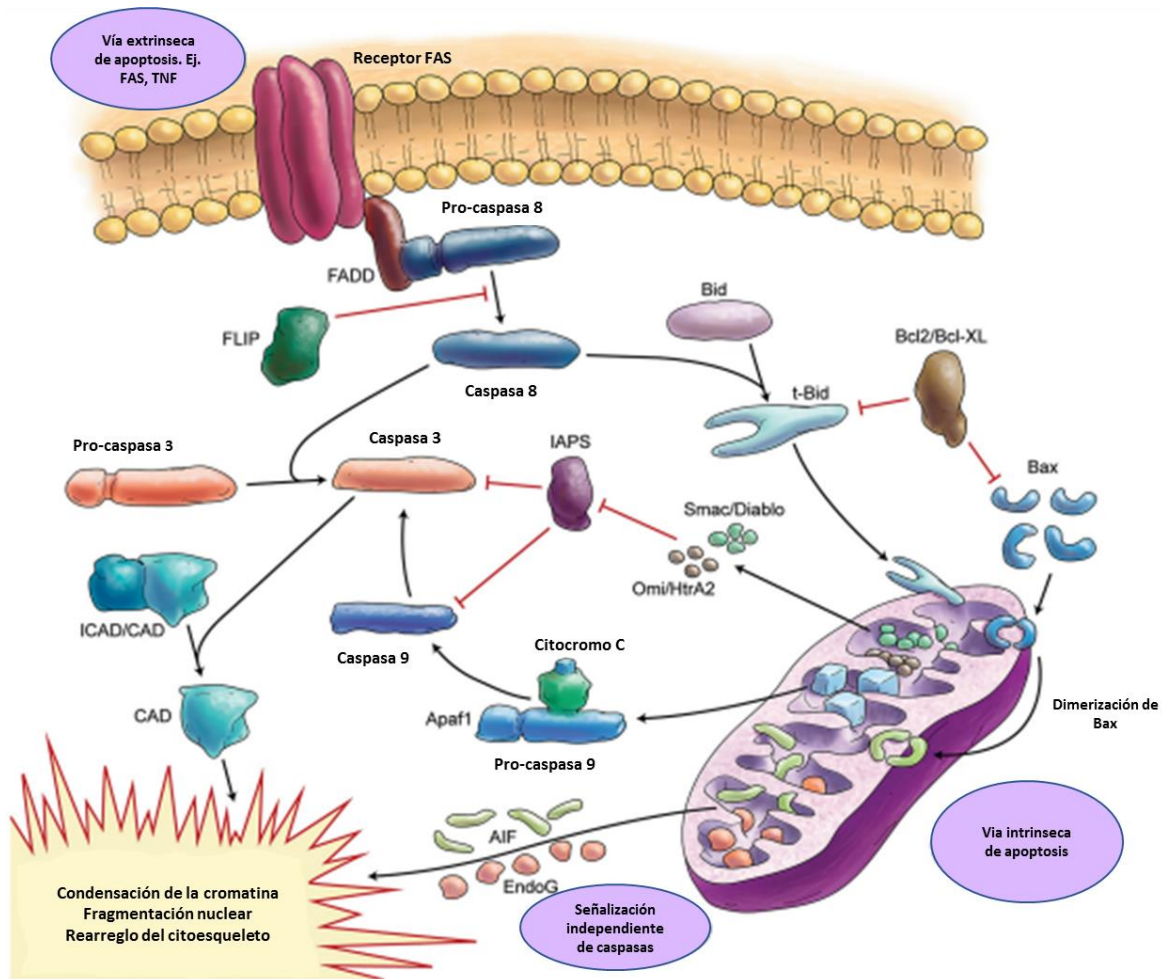


Figura 6. Representación esquemática del proceso de muerte apoptótica. La activación del receptor de muerte por interacción con ligandos FAS y TNF, forma parte de la vía extrínseca de la apoptosis. Este evento conduce a la activación de caspasa 8 que, a su vez, activa a la proteína caspasa 3 de forma directa o de forma secundaria vía mitocondria-caspasa 9. La vía intrínseca de la apoptosis puede desencadenarse después de la vía extrínseca, o bien, por señales de estrés celular y por daño al ADN. Asimismo, puede conducir a la muerte de forma dependiente o independiente a la activación de caspasas. En ambos casos, al igual que sucede con la ruta extrínseca, ocurren sucesos bien caracterizados, propios de este proceso: condensación de la cromatina, fragmentación nuclear y re-arreglo del citoesqueleto. Esquema modificado de Rastegar *et al*, 2015.

El glutatión

Debido a que los niveles de ERO y sus fuentes varían en las diferentes etapas del desarrollo, los sistemas antioxidantes son la primera defensa contra un ambiente oxidativo. En el cerebro se encuentran sistemas como la superóxido dismutasa, una enzima dependiente de cobre/zinc o manganeso que participa en la transformación del radical anión superóxido en peróxido de hidrógeno. Esta última es una especie menos reactiva, pero con una vida media mayor al resto de las ERO y por lo tanto con mayor posibilidad de ejercer sus efectos oxidantes. Debido a esto, existen enzimas como la glutatión peroxidasa (GPx) y la catalasa que transforman al peróxido de hidrogeno a agua y oxígeno molecular (Mavelli *et al.* 1982; Dringen, 2000).

La enzima glutatión peroxidasa (GPx) debe su nombre a que utiliza como donador de electrones al glutatión (GSH) para obtener dos moléculas de agua y glutatión oxidado (GSSG). Sin embargo, el glutatión no sólo es sustrato de la GPx; puede actuar de forma independiente como atrapador de radicales libres gracias a su estructura de tripéptido conformado por glutamato, cisteína y glicina. En este sentido, la función antioxidante del glutatión se debe a la capacidad de la cisteína de donar electrones y protones que llevan a cabo la neutralización de las ERO (Metodiewa & Winterbour, 1984).

Además de su función antioxidante, se ha considerado al glutatión como neurohormona, reservorio de grupos tioles, cofactor de enzimas y agente reductor de otros antioxidantes (Meister, 1981; Dringen 2000).

El GSH está predominantemente presente en su forma reducida, que es su forma biológicamente activa. Bajo condiciones pro-oxidantes, el GSH se oxida y forma un puente disulfuro inter-molecular entre dos cisteínas que lleva a la formación del dímero GSSG.

En mamíferos, existen tres mecanismos para mantener la homeostasis del GSH: la síntesis *de novo*, la captura de fuentes exógenas y la reducción de GSSG (Circu & Aw 2008). La síntesis *de novo* ocurre únicamente en el citoplasma por dos pasos dependientes de ATP

catalizados por las enzimas γ -glutamylcistein ligasa (GCL) - que promueve la formación del dipéptido γ -glutamyl-cisteina- y glutatión sintetasa que añade la glicina para formar el tripéptido. La captura de fuentes exógenas se da por el transporte de γ -glutamyl-cisteina a través de acarreadores especializados de la célula para su uso en la síntesis de glutatión. El sistema de regeneración de GSH se lleva a cabo por la reducción catalítica de GSSG catalizada por la enzima glutatión reductasa mediante una reacción dependiente de NADPH (Meister, 1981). En cuanto a la compartimentalización del GSH, se encuentra en la mitocondria, núcleo y retículo endoplásmico. Éstos constituyen pozas separadas del citoplasma (Circu & Aw 2008) (Figura 7).

Como se mencionó anteriormente, el glutatión participa como agente reductor de otros antioxidantes, al respecto, se sabe que participa en un *loop* oxido-reductor junto con el ácido ascórbico y el α - tocoferol. También puede actuar como chaperona al unirse a los residuos de cisteínas de proteínas e impedir daños no reversibles inducidos por aumento en el potencial oxidante de la célula. Asimismo, puede unirse a proteínas y formar compuestos excretables por medio de la glutatión S- transferasa (Winkler, 1992; Meister, 1995; Salinas & Wong, 1999).

Se considera que funciona como uno de los mayores agentes reductores en sistemas biológicos. Su ciclo de óxido-reducción está estrechamente relacionado con el del ácido ascórbico. Cuando el ácido ascórbico es oxidado, se forma ácido dehidroascórbico (DHA). Éste es sustrato del GSH que lo vuelve a su forma reducida y con ello se evita la disminución de las pozas intracelulares de agentes reductores (Winkler 1992; Rice, 1998, Harrison & May, 2008).

Estudios previos han demostrado que el glutatión podría participar como modulador del desarrollo embrionario, ya que la disminución del glutatión en embriones de rata por la administración de BSO (4mmol/Kg) a la madre, induce un incremento en el número de malformaciones y muerte de los embriones (Hales & Brown, 1991).

Estudios posteriores encontraron que la disminución en los niveles de GSH en ratones por depleción de la subunidad pesada de la enzima γ -cistein ligasa, induce daños en la

gastrulación, inhibe la formación del mesodermo e induce la muerte antes del día embrionario 8.5. Los efectos letales se deben al aumento en la apoptosis y la reducción de la proliferación. Los ratones homocigos recesivos para el gen de esta enzima no completan el desarrollo. Se sugiere que los efectos inducidos por la carencia del glutatión se deben a su papel como antioxidante, ya que en cultivo de células embrionarias, la muerte producida por la carencia de glutatión es recuperada al utilizar el antioxidante precursor del glutatión, N- Acetil Cisteína (Zheng-Zheng Shi, 2000).

Como se abordó previamente, la desregulación del glutatión se relaciona con el proceso de apoptosis. Antecedentes directos obtenidos en cerebelo muestran que la disminución de los niveles de glutatión por administración de BSO en cultivos de células granulares de cerebelo, induce muerte apoptótica y ésta ocurre solamente cuando los niveles de GSH de la mitocondria disminuyen por debajo del 50%, lo que ocurre 24h después la administración de BSO. (Wülleret *al*1999).

Para resumir, estos trabajos muestran los efectos directos que tiene la disminución del glutatión en estadios tempranos de desarrollo y su relación con el proceso de muerte.

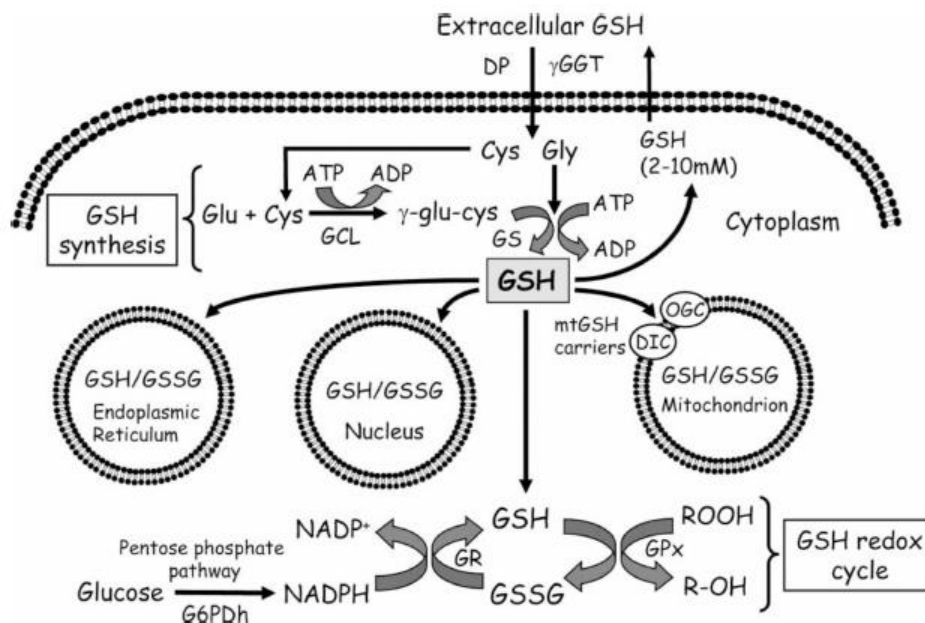


Figura 7. Esquema que representa la síntesis, el ciclo de óxido-reducción y la compartimentalización del GSH. El glutati6n se sintetiza en el citoplasma y se transporta a distintos compartimentos intracelulares. La síntesis de glutati6n se lleva a cabo a partir de glutamato, cisteína y glicina, que ocurre mediante las enzimas glutamil- cistein ligasa y glutati6n sintasa. Ambas utilizan ATP. El ciclo de óxido-reducción se lleva a cabo mediante la enzima glutati6n reductasa en un proceso dependiente de NADPH (Tomado de Circu & Aw 2008).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Numerosas evidencias sugieren que las ERO pueden funcionar como moduladores de los procesos que ocurren durante el desarrollo como la diferenciación, la migración y la muerte neuronal. Dado que el glutati6n es uno de los antioxidantes más importantes del sistema nervioso, es posible que éste regule los procesos en los que participan las ERO.

4. HIPÓTESIS

La reducción crítica en los niveles de glutatión durante el desarrollo postnatal del cerebelo de rata afectará la proliferación, migración y muerte apoptótica de las células granulares, lo que repercutirá en la conducta motora de los animales.

5. OBJETIVO

Conocer el papel del glutatión y las ERO en el desarrollo postnatal del cerebelo en ratas.

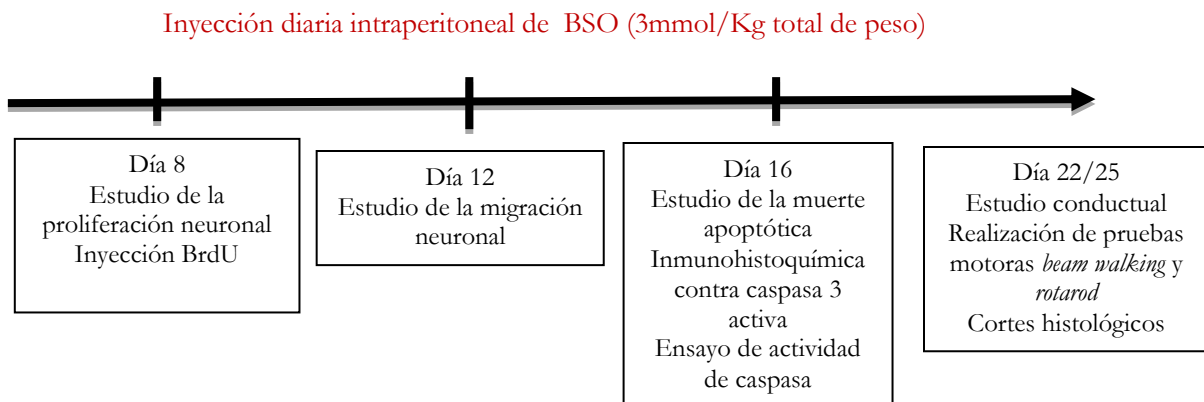
Objetivos particulares:

- Conocer los niveles de glutatión en las distintas etapas del desarrollo postnatal del cerebelo en ratas.
- Conocer los efectos de bajos niveles de glutatión inducidos por BSO en distintos momentos del desarrollo de cerebelo en ratas y su relación con procesos de proliferación, migración y muerte apoptótica.
- Estudiar posibles anomalías a nivel histológico provocado por bajos niveles de glutatión.
- Estudiar mediante pruebas de *beam walking* y *rotarod* si las posibles anomalías histológicas se relacionan con cambios en la conducta motora llevada a cabo por el cerebelo.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

Tratamiento en ratas

Se utilizaron camadas de ratas de la cepa Wistar, siempre con 9 crías y la madre. Se crearon tres grupos, uno control al que no se trató, un grupo vehículo al que se le administró diariamente de forma intraperitoneal solución salina (NaCl 0.9%) y un tercer grupo al que se le administró butionin sulfoximida (BSO) (Sigma-Aldrich) diariamente por inyección intraperitoneal (3mmol/Kg de peso total). Las crías se inyectaron a partir de 48 horas de nacimiento hasta diferentes días correspondientes con la fase de desarrollo a estudiar. Para estudiar cambios en la proliferación de las neuronal granulares de cerebelo se inyectaron del día 2 al 8 postnatal (PN). Para estudiar la migración neuronal se trataron hasta el día PN 12 y para evaluar la muerte apoptótica se inyectaron hasta el día PN 16. Para estudiar la conducta y los cambios morfológicos en el cerebelo al final del desarrollo las ratas se trataron hasta los días PN 22 y 25.



Esquema 1. Diagrama que ilustra el periodo de tratamiento con BSO, así como los ensayos realizados en ratas con diferentes edades para evaluar los procesos de interés durante el desarrollo.

Cuantificación de los niveles de glutatión en homogenados

El tejido cerebelar se extrajo por medio de decapitación por guillotina de forma rápida y se lavó con solución fisiológica (NaCl 0.9%) para quitar el exceso de sangre. En esta solución se separó la región del cerebelo del resto del encéfalo y rápidamente se colocó en 250 µl de buffer de fosfatos KPE con EDTA (Sigma-Aldrich) Y con 0.6 % de ácido sulfosalicílico (Sigma-Aldrich) (que impide la pérdida de la relación GSH/GSSG por acción de la enzima γ glutamil transferasa) y 0.1% de tritón X-100(Sigma-Aldrich). En este mismo volumen se homogenizaron las muestras y posteriormente se centrifugaron a 8000g por 15 minutos.

Los niveles de glutatión se cuantificaron por medio del método de recambio enzimático de Tietze. Este ensayo está basado en la reacción de oxidación del GSH por medio de 5,5-ditio-bis (2-ácido nitrobenzoico) (DNTB) (Sigma-Aldrich), que produce el cromóforo TNB conjugado con glutatión (GS-TNB). Este cromóforo puede ser cuantificado espectrofotométricamente a una absorbancia de 412 nm. El producto es reciclado por medio de la enzima glutatión reductasa dependiente de NADPH (Sigma-Aldrich). La tasa media de formación de TNB es proporcional a la concentración de GSH.

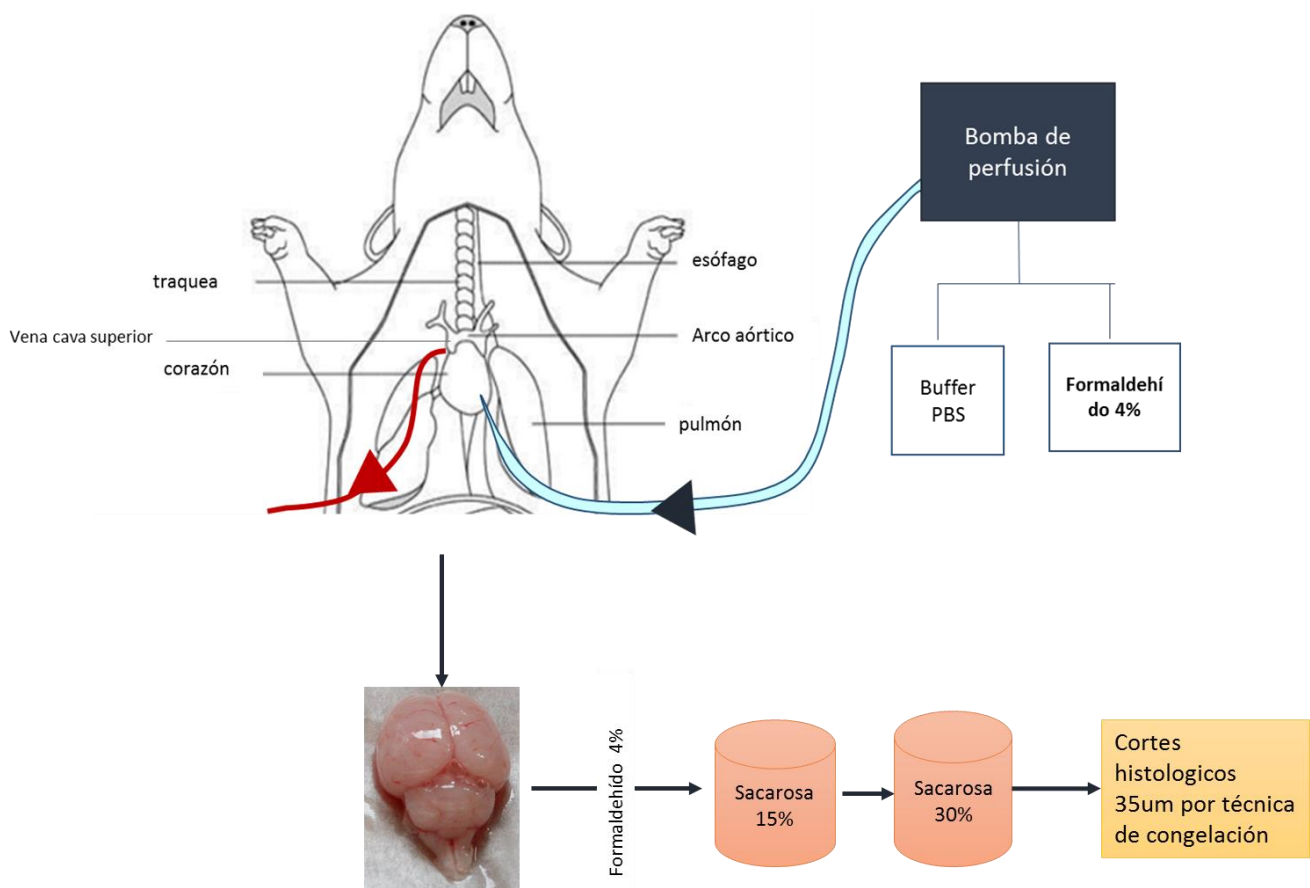
La cuantificación de GSSG se llevó a cabo mediante la adición de 2-vinilpiridina a las muestras, este compuesto se une al glutatión reducido e impide su interacción con el cromóforo; por medio de la enzima glutatión reductasa, el GSSG es reciclado a GSH que sí está disponible para interaccionar con el cromóforo, esto produce el conjugado GS-TNB.

Los valores de GSH o GSSG obtenidos se ajustaron con proteína. Los niveles de proteína en las muestras se cuantificaron por medio del kit *DC detergent compatible protein assay* de BioRad y por medio de la técnica de Bradford (1976).

Perfusión de los animales

Para realizar cortes histológicos y técnicas de inmunohistoquímica, los animales fueron anestesiados vía intraperitoneal con pentobarbital sódico (50mg/kg) (Pet's Pharma), se evaluó el estado de la anestesia mediante indicadores de frecuencia cardiaca y respiratoria disminuida y reflejo podal. Se llevó a cabo una punción intraventricular y través de esta se perfundió con buffer PBS – este buffer contiene NaCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄ (Sigma – Aldrich) a pH 7.5- y posteriormente con paraformaldehído al 4% para fijar el tejido.

Una vez fijado, se extrajo todo el encéfalo y se colocó en paraformaldehído (4%) por 2 días, posteriormente se colocó en un gradiente de sacarosa por dos días cada uno (15 y 30%), luego, se realizaron cortes histológicos sagitales de 35µm de grosor de la región del vermis cerebelar (Esquema 2).



Esquema 2. Diagrama del protocolo utilizado para la perfusión cerebral de las ratas. La rata es anestesiada con pentobarbital sódico (50 mg/kg). Posteriormente se realiza la punción en el ventrículo izquierdo con una jeringa conectada a la bomba de perfusión. Inmediatamente después se realiza un corte en la vena cava superior para que el flujo sanguíneo tenga salida. La perfusión se realiza, primero con buffer PBS para limpiar el tejido y posteriormente con formaldehído 4% para fijar el tejido. Una vez que el tejido se ha fijado, se extrae el encéfalo y se coloca por 2 días en formaldehído 4% para después colocarse en un gradiente de sacarosa al 15 y 30% por 2 días cada uno. Los cortes histológicos se realizan en un criostato por medio de la técnica de congelación.

Inmunohistoquímica contra BrdU

Para evaluar los efectos de la disminución de glutatión en las etapas de proliferación y migración, se realizó una inyección de BrdU -Bromodesoxiuridina (100mg/Kg) (Sigma-Aldrich) - a los 8 días para ambos casos. Se realizó la perfusión al día 8 ó 12, se hicieron cortes histológicos de 35 μ m de grosor.

Los cortes se lavaron 3 veces por 5 minutos con buffer PBS. El ADN se desnaturalizó con HCl 1M por 30 min a 45°C. Posteriormente se hicieron 3 lavados con PBS por 5 minutos. Seguidamente se bloqueó con suero de cabra 3% diluido en PBS + tritón X-100 0.3% por 1 hora y los cortes se sometieron al anticuerpo primario monoclonal anti-BrdU (Sigma-Aldrich) hecho en rata diluido (1:200) en PBS+tritón por dos días a 4°C. Posteriormente se hicieron 4 lavados de 5 minutos con PBS y se colocó el anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 de pollo anti rata diluido 1:500 por dos horas en oscuridad a temperatura ambiente. Concluido este tiempo se hicieron 3 lavados con PBS por 5 minutos. Los cortes se montaron con medio Vectashield con DAPI. Las imágenes fueron tomadas en microscopio confocal (Fluoview FV1000) y analizadas con el programa Image J.

Inmunohistoquímica contra caspasa 3 activa

Para estudiar los efectos de la depleción del glutatión en la muerte neuronal, se utilizaron ratas tratadas desde los 2 días PN y hasta los 16 días PN, en este tiempo se realizaron la perfusión y preparación de cortes histológicos de 35 μ m en la región del vermis. Los cortes se lavaron 6 veces con PBS por 5 minutos, se secó el área alrededor de los cortes y se bloqueó con suero de cabra al 3% diluido en PBS + tritón X-100 0.5% por toda la noche a 4°C. Seguidamente se hicieron 6 lavados con PBS por 5 minutos, los cortes se incubaron con el anticuerpo primario contra caspasa 3 activa Asp 175 diluido 1:600 (Cell signaling). Éste se incubó por 2 días en cámara húmeda a 4°C. Posteriormente se hicieron 6 lavados de 5 minutos con PBS en oscuridad y se incubó el anticuerpo secundario Alexa fluor 488 anti

rabbit, (1:500) (Cell signaling) por 2 horas en oscuridad y a temperatura ambiente. Los cortes se lavaron 6 veces durante 5 minutos con PBS y se montaron con medio Vectashield con DAPI. Las imágenes fueron tomadas en microscopio confocal (Fluoview FV1000) y analizadas con el programa Image J.

Actividad de Caspasa

El ensayo de actividad de caspasa 3 se realizó en ratas de 16 días PN. Este ensayo se basa en la cuantificación de la actividad de la proteasa al cortar un sustrato fluorogénico específico de caspasa 3 (AMC-DEVD). Para esto, el tejido se extrae y se homogeniza en 250µl de buffer de lisis (Tris- HCl 10mM, NaH₂PO₄ 10mM, NaCl 130mM, tritón 1% (Sigma-Aldrich)) posteriormente se centrifugaron a 8000g por 15 minutos, y se realizó la cuantificación de proteína por el método de Bradford. El ensayo requiere de 50 a 100µg de proteína en la muestra. Las muestras se montaron en una placa oscura para fluorescencia de 96 pozos, se les agregó 100µl de buffer de ensayo (Buffer HEPES+ AMC-DEVD+ DTT). Esto se incubó por 5 minutos. En un lector BioRad se programó una cinética de 15 lecturas, una por minuto con longitud de onda de excitación/emisión de 380/430-460. Se obtuvo el cambio de unidades relativas de fluorescencia comparando la absorbancia al final de la cinética respecto a la del comienzo.

Análisis de la morfología del cerebelo

Para analizar los posibles cambios morfológicos en el cerebelo, los animales fueron perfundidos con la técnica descrita anteriormente. Se diseccionó el cerebelo y se realizaron cortes histológicos que se tiñeron con la técnica de hematoxilina- eosina. Los cortes se observaron al microscopio estereoscópico. Se tomaron fotografías que fueron analizadas con el programa ImageJ.

Pruebas conductuales

Prueba de Rotarod

La prueba de Rotarod se utiliza para medir la habilidad que tiene un animal para mantener el balance y coordinación sobre un rodillo giratorio. Debido a que el cerebelo participa en dichos procesos, se utilizó como indicador del daño en la función de dicha estructura. Estudios previos (Kayakabe *et al.* 2014) mostraron que ratones con daño notable en el cerebelo, producido por la mutación del gen que codifica para la proteína transportadora vesicular de GABA, presentan una latencia a la caída significativamente menor en comparación con su grupo control.

Con base en lo anterior, elegimos la prueba de *Rotarod* para saber si el tratamiento con BSO y la consecuente disminución del glutatión repercutía en cambios en la conducta motora. Para ello, se utilizaron dos protocolos diferentes. En todos los casos, antes de la prueba definitiva, los animales fueron entrenados durante 3 días para garantizar la adquisición de la tarea. Previo al entrenamiento, los animales se colocaron durante una hora en la habitación donde se realizaron las pruebas con el objetivo de que se adaptaran a las condiciones de ésta. Se utilizó el rodillo de *rotarod* de mayor diámetro para ratas adultas. La velocidad de movimiento del rodillo para el día de la prueba fue de 10 rpm con una aceleración de 0.01 rpm por segundo. Entre cada entrenamiento y prueba, el rodillo se limpió con alcohol etílico, para evitar el reconocimiento o influencia del olor en la realización de la tarea. La prueba consistió en colocar a las ratas de todos los grupos sobre el rodillo giratorio y medir la latencia -en segundos- a la caída, con un límite máximo de tiempo de 120s en un cilindro giratorio en 6 ensayos independientes. Se comparó esta latencia entre las ratas tratadas y las ratas control de 22 días PN.

En el segundo protocolo de rotarod se implementó debido a que las ratas comienzan a caminar y a sostenerse bien con las extremidades aproximadamente al día 15. El

entrenamiento para la prueba con el protocolo anterior, comienza al día 18. Para evitar el sesgo producido por la madurez motora, se implementó un segundo protocolo y se extendió la edad a la que se les hizo la prueba a 25DPN. Se utilizó una velocidad inicial de 10 rpm con aceleración de 0.2 rpm por segundo y se cuantificó el tiempo máximo de latencia antes de la caída. También se cuantificó la velocidad máxima alcanzada.

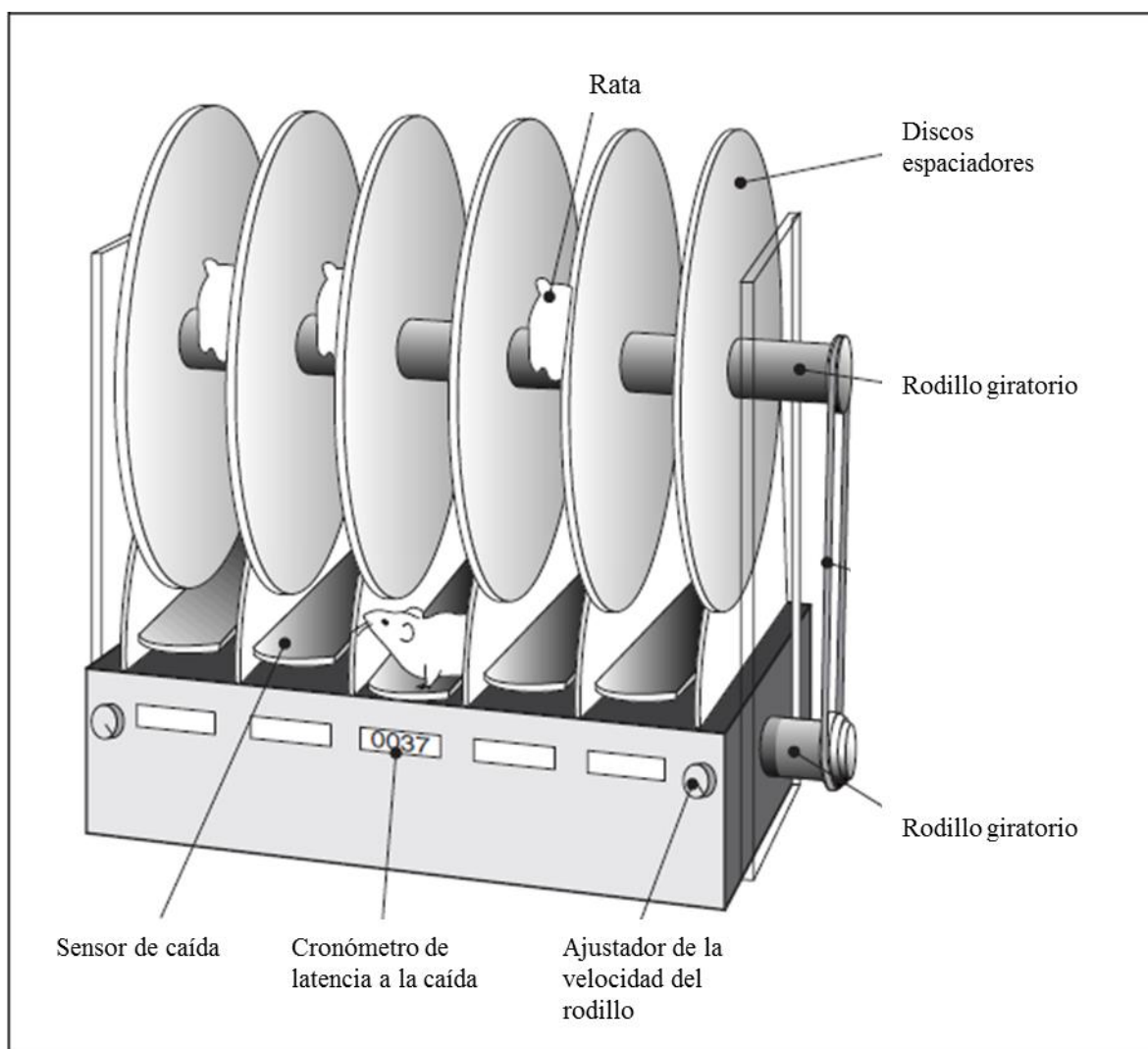


Figura 8. Representación esquemática del aparato Rotarod para pruebas conductuales. Las ratas son colocadas en el rodillo que cuenta con discos espaciadores que permiten que las ratas no se puedan ver. El aparato cuenta con un sensor de caída que detiene el cronómetro en cuanto la rata cae. Imagen modificada de Carter *et al.* 2001

Prueba de Beam Walking

La prueba de *beam walking* consiste en entrenar a las ratas para atravesar una viga que se encuentra a 50cm del suelo. Durante esta tarea, las ratas utilizan la coordinación de las extremidades y el balance de manera no voluntaria, ya se estas pruebas se relacionan con la memoria de trabajo. El estímulo luminoso intenso es tomado como un estímulo aversivo del cual se debe escapar para buscar refugio al otro extremo de la viga. El protocolo seguido para esta prueba, consistió en entrenar diariamente a las ratas a atravesar la viga durante 3 días consecutivos antes del día de la prueba. En la prueba se cuantificó la latencia, en segundos, que tardó en cruzar del lado con el estímulo aberrante hacia el lado con el refugio seguro.

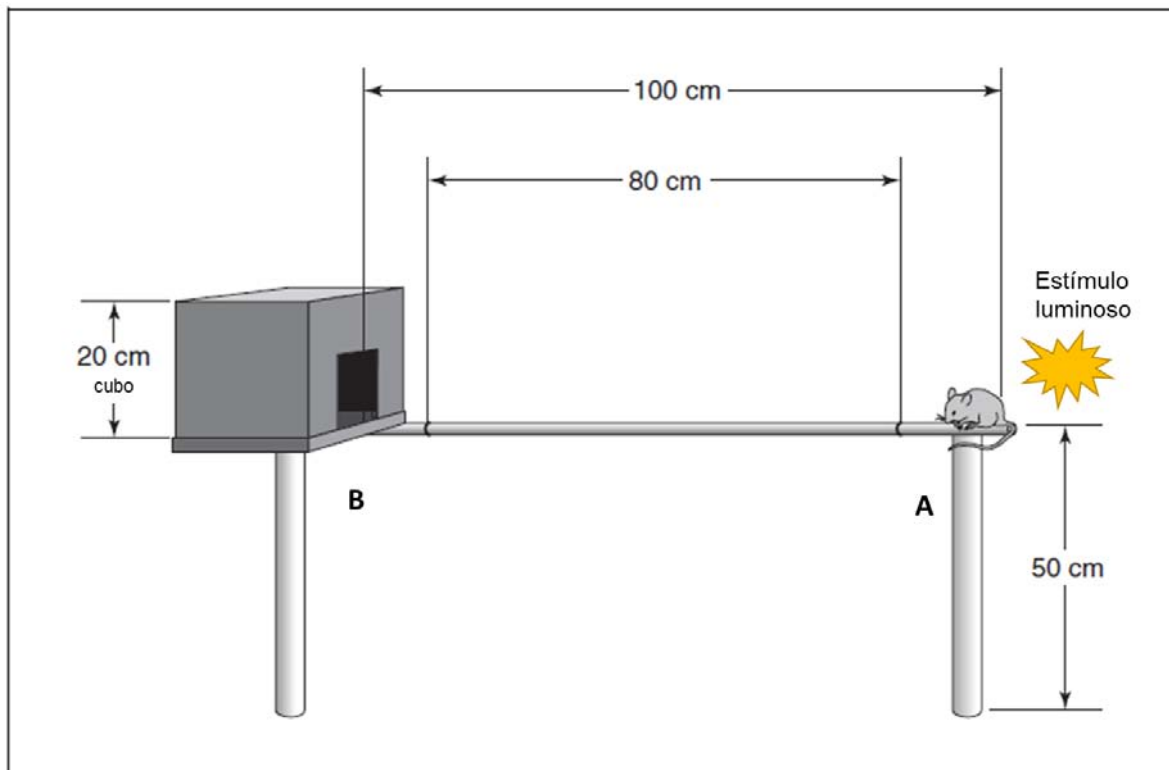


Figura 9. Representación esquemática del aparato con el cual se lleva a cabo la prueba conductual Beam Walking que prueba la coordinación motriz. La rata es entrenada para atravesar la viga en respuesta a un estímulo luminoso intenso en búsqueda del sitio de refugio que se encuentra a 80 cm de distancia. Se cronometra el tiempo que tarda la rata de ir del punto A al punto B. Imagen modificada de Carter *et al.* 2001

Medición del tamaño del cerebelo y el grosor de la capa molecular y granular interna

Los cortes de cerebelo de ratas de 25 días PN fueron teñidos con la técnica de hematoxilina y eosina. El tamaño cerebelar se midió en micrografías con el programa ImageJ, se tomó la distancia en un plano horizontal, desde la folia III hasta la folia IX y la distancia en un plano transversal, desde la folia VI hasta la base del cerebelo en la unión con el puente. El grosor de las capas se midió en tres puntos, la folia III, VI y IX. En cada punto se midió el tamaño de la corteza, la capa molecular, la capa granular interna y la sustancia blanca.

Análisis estadístico

Se analizó la normalidad de los datos mediante la prueba Shapiro-Wilk, dado que los datos no se ajustaron a una distribución normal, se realizaron pruebas no paramétricas de remuestreo (bootstrap) para los experimentos con un tamaño de muestra grande. Los experimentos con tamaño de muestra pequeño se analizaron mediante la prueba de U de Mann-Whitney. En ambos análisis la significancia utilizada fue $p < 0.05$. El número mínimo de muestra utilizado fue $n=3$.

7. RESULTADOS

Con el propósito de determinar cómo es el comportamiento de los niveles de glutatión en el cerebelo a lo largo del desarrollo postnatal, se realizó la cuantificación de los niveles totales de este antioxidante en ratas neonatas de diferentes días de edad. Como se observa en la Figura 10, se encontró que los niveles de glutatión parecen aumentar a lo largo de desarrollo – desde el día 9 hasta el día 20- sin embargo, este aumento no fue significativo, lo cual indica que los niveles de glutatión se mantienen constantes. Estos resultados son muy parecidos a los reportados anteriormente por el grupo de Rice y colaboradores (1998).

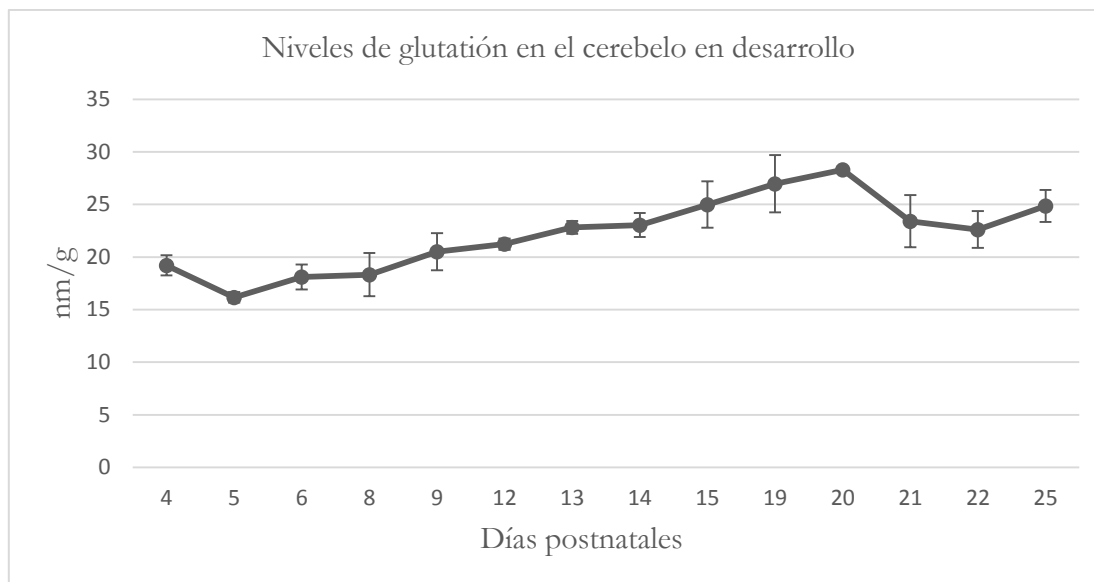


Figura 10. Determinación de los niveles basales de glutatión total en cerebelo durante el desarrollo postnatal desde el día 4 hasta el 25. Se realizó la prueba estadística no paramétrica U de Mann Whitney entre los valores del día 20 y 4 y los de los días 20 y 25. La $p > 0.05$ para ambos casos. $n = 3$.

Los niveles constantes de glutatión durante el desarrollo, no están relacionados con la ausencia de su participación durante este proceso debido a que en la célula hay pozas o reservas de GSH en el núcleo, la mitocondria, el retículo además del citoplasma y el cambio en el ambiente redox podría ser compensado por las otras pozas. Por ello, investigamos el papel del GSH durante el desarrollo del cerebelo. Con el fin de reducir los niveles de glutatión durante el desarrollo de las células granulares de cerebelo, se utilizó butionin sulfoximina, un fármaco que inhibe específicamente la síntesis de glutatión por medio de la inhibición de la enzima γ - glutamil- cistein ligasa (Broquist, 1992). Algunos estudios previos muestran que una dosis del fármaco de 3.8 mmol/kg administrada a ratas neonatas, induce altas tasas de mortalidad mientras que una dosis más baja (3mmol/kg) muestra una tasa de muerte considerablemente menor. Por ello se utilizó esta última dosis. Bajo estas condiciones se observó una reducción significativa en los niveles de glutatión (Figura 11) la cual no indujo la muerte de los animales de 22 días PN tratados con el fármaco. Por otro lado, como se ha reportado (Broquist, 1992; Williams, 2006), se observó

que la mayoría de los animales presentaron cataratas, lo cual es un síntoma común ocasionado por niveles bajos de glutatión que afectan la transparencia del cristalino.

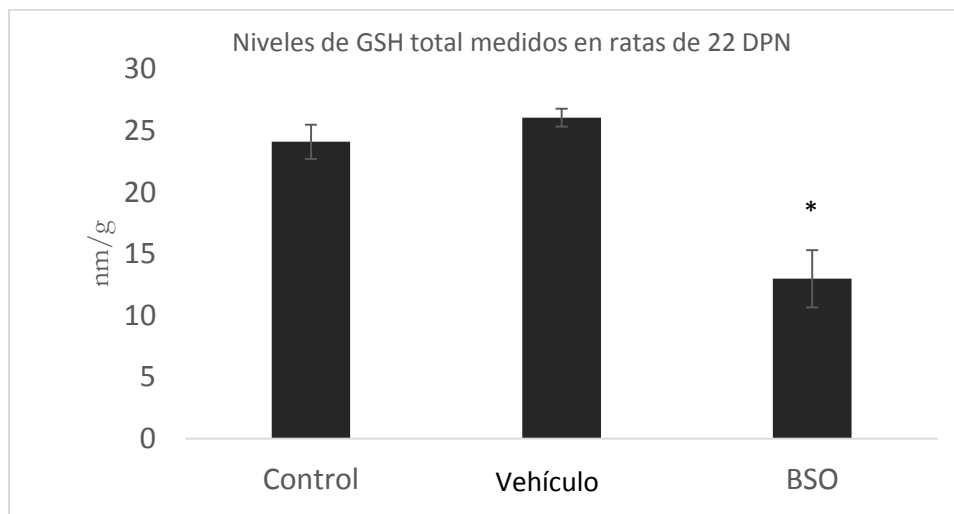


Figura 11. Niveles de glutatión total medidos en ratas de 22 días PN. Las ratas fueron tratadas con una inyección intraperitoneal i.p diaria de BSO 3mmol/Kg (BSO). Los niveles de glutatión disminuyeron significativamente en comparación con los niveles control ($p < 0.01$). Los niveles de glutatión del control y vehículo no presentaron diferencias significativas.

Estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo, demostraron que en cultivos de neuronas granulares de cerebelo, la disminución del 50% de los niveles de glutatión facilita el proceso de muerte. Debido a esto, para la evaluación de los parámetros asociados al desarrollo se utilizó esta dosis de BSO.

Efecto de la disminución de los niveles de glutatión en la proliferación y migración de las neuronas granulares de cerebelo

Boonstra en 2004 demostró que se requieren niveles bajos de ERO para la promoción del ciclo celular, mientras que niveles altos o una exposición prolongada de ERO inducen el arresto celular. Tomando en cuenta este antecedente, exploramos la participación de las

ERO y el glutatión en la proliferación de las células granulares de cerebelo. Estas células tienen un aumento marcado en la proliferación alrededor del día 8 postnatal. A esta edad, las células granulares, proliferan en la capa granular externa desde donde, posteriormente, inician la migración a la capa granular interna (Altman, 1985).

A pesar de las evidencias que sugieren que en otros modelos las ERO participan en el ciclo celular, en nuestro modelo, no hubo diferencias significativas entre los cerebelos de animales control y los tratados con BSO en el número de células positivas a BrdU. Estos datos sugieren que la disminución de glutatión no afecta el arresto o la progresión normal del ciclo celular (Figura 12).

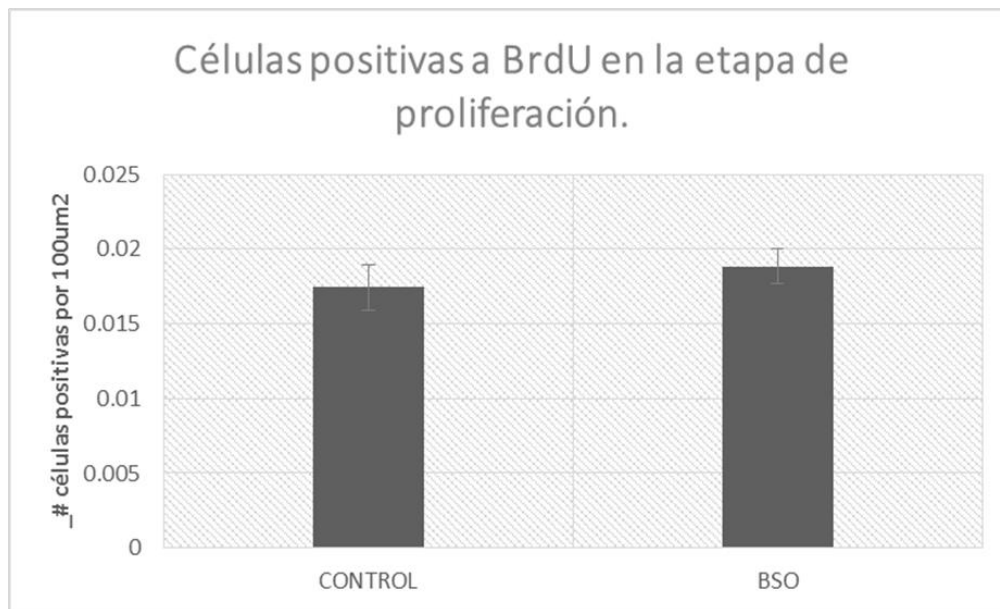


Figura 12. Número de células positivas a BrdU en cortes sagitales de cerebelo de ratas de 8 días PN. El número de células positivas a BrdU se cuantificó en regiones de interés (ROIs) en la capa granular externa exclusivamente. No hay diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los animales tratados con BSO y los animales control.

Sustentados en los numerosos trabajos previos dónde se demuestra la participación de las ERO y de los sistemas antioxidantes en la migración celular (Stanley, 2014; Nimnual, 2003; DeGennaro; 2011; Schröder,2014), se exploró el papel del aumento de las ERO en la migración de las neuronas granulares durante en desarrollo del cerebelo.

La migración se evaluó por medio de inmunohistoquímica contra BrdU. El BrdU fue inyectado intraperitonealmente en el día PN y las ratas fueron sacrificadas el día 12 PN, con el objetivo de localizar a las células que migraron desde el día 8 PN. Para el análisis de las imágenes: primero se determinó una región de interés (ROI) que abarcó las tres capas del cerebelo: capa molecular, capa de células de Purkinje y capa granular interna, con el propósito de estudiar si la migración se detuvo desde la capa granular externa. Para evaluar un posible retraso en la migración antes de la capa granular interna, se obtuvo la relación entre el número de células positivas en la capa molecular y el número de células positivas en la capa granular interna.

Bajo nuestras condiciones, no se encontraron cambios en la migración de las células granulares de cerebelo inducidos por la administración de BSO en comparación con las ratas control. Sin embargo, llamó nuestra atención que la morfología de las células positivas a BrdU en animales control y vehículo difirió de la observada en ratas sometidas al tratamiento con BSO. En estas últimas, el soma se mostró alargado y se pudieron apreciar procesos neuríticos más alargados (Figura 15 flechas) cuya presencia es característica de células que aún no completan la fase de migración. Las células positivas a BrdU en animales control mostraron morfología redonda, que es característica de neuronas ya establecidas en la parte profunda de la capa granular interna (figura 15).

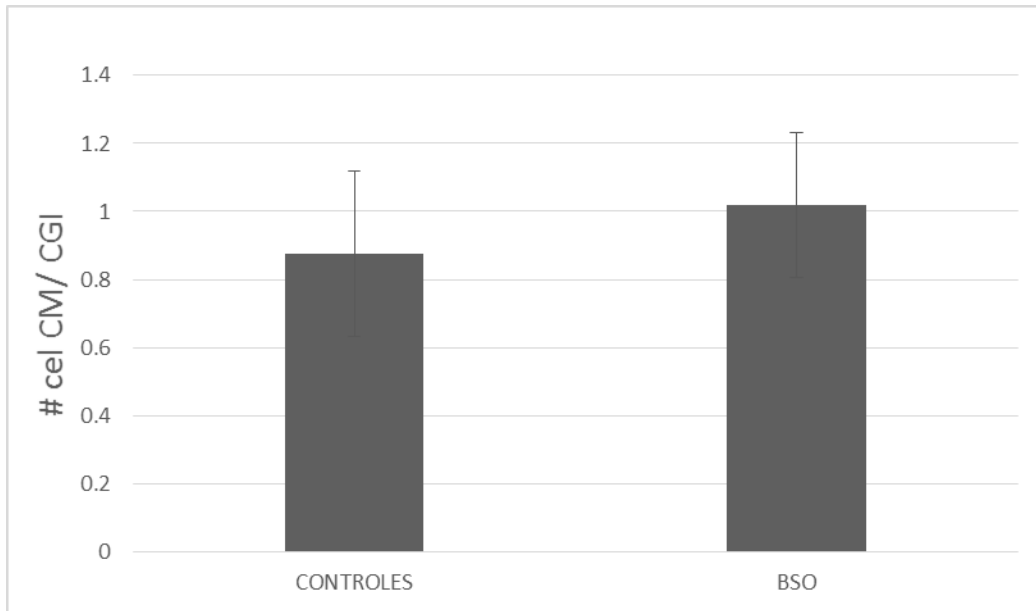


Figura 13. Muestra el número de células positivas a BrdU en cortes sagitales de cerebelo de ratas de 12 DPN que fueron inyectadas con BrdU al día 8 PN. La cuantificación de las células positivas se realizó por medio de ROIs o regiones de interés que abarcaran las tres capas cerebelares. La comparación entre los tratamientos no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$).

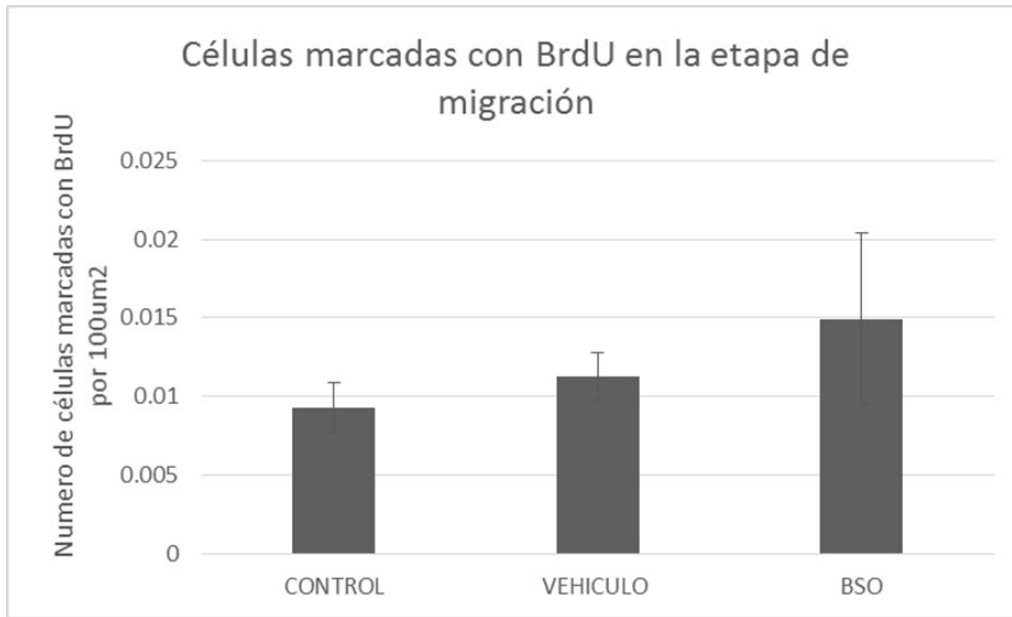


Figura 14. Relación entre el número de células positivas a BrdU en la capa molecular y la capa granular interna. No se mostraron diferencias significativas.

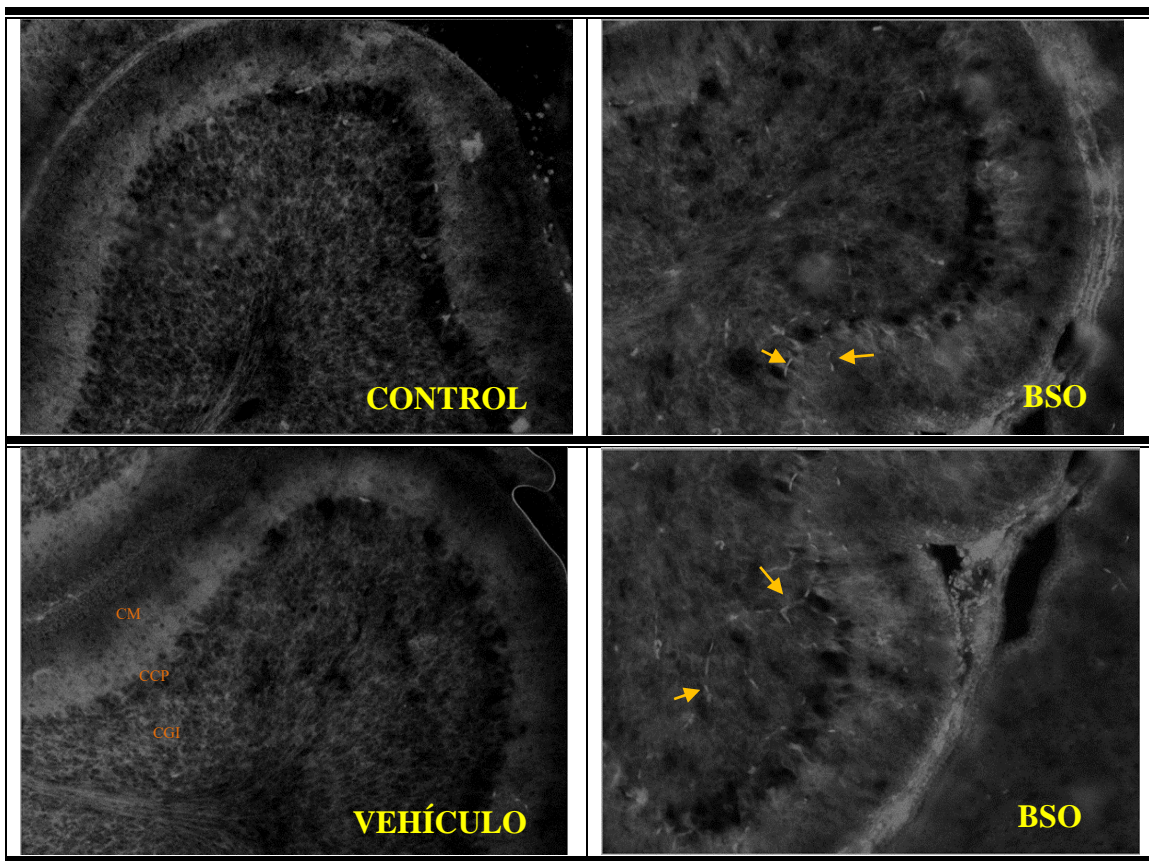


Figura 15. Imágenes tomadas de la parte apical de las folias de cerebelo de ratas de 12 días PN control y tratadas con BSO. Las flechas indican células granulares con somas alargados y procesos neuríticos extendidos, características representativas de células en fase migratoria. CM capa molecular, CCP capa de células de Purkinje, CGI capa granular interna. Las fotografías fueron tomadas en microscopio confocal FV10 (20X) .

Efecto de la disminución de los niveles de glutatión en el proceso de muerte apoptótica

La muerte apoptótica se estudió en las neuronas granulares por medio de la activación de caspasa 3 -caspasa ejecutora en el proceso de muerte-. Las ratas se trataron con BSO desde el día 2 y hasta el día 16 PN y se realizó la técnica de inmunohistoquímica para identificar caspasa 3 cortada en el sitio del ácido aspártico (Asp 175), es decir, la proteína con actividad catalítica. La cuantificación de las células positivas se realizó en las diferentes capas del cerebelo, la capa molecular, la capa de células de Purkinje y la capa granular interna. Los datos mostraron mucha variación en la capa molecular y en la capa de células de Purkinje, a diferencia de la capa granular interna donde los resultados no variaron. En ninguno de los casos se encontraron diferencias significativas en el número de células positivas a caspasa 3 activa entre los diferentes grupos ($p > 0.05$) (Figuras 16,17 y 18). Debido a la variabilidad de los datos, se decidió realizar el ensayo de actividad de caspasa 3. Para esto se utilizó un sustrato fluorogénico específico para caspasa 3 en homogenados de cerebelo de rata de 16 días PN. Bajo estas condiciones, tampoco se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los grupos analizados (Figura 19). Esto sugiere que la disminución de los niveles de glutatión no induce un aumento en la muerte apoptótica de las células granulares de cerebelo a los tiempos evaluados. Cabe mencionar que los niveles de glutatión fueron cuantificados en cada caso, se encontró una disminución mayor al 50% comparado con el control, lo cual nos indica que efectivamente los niveles de GSH disminuyeron a estos días.

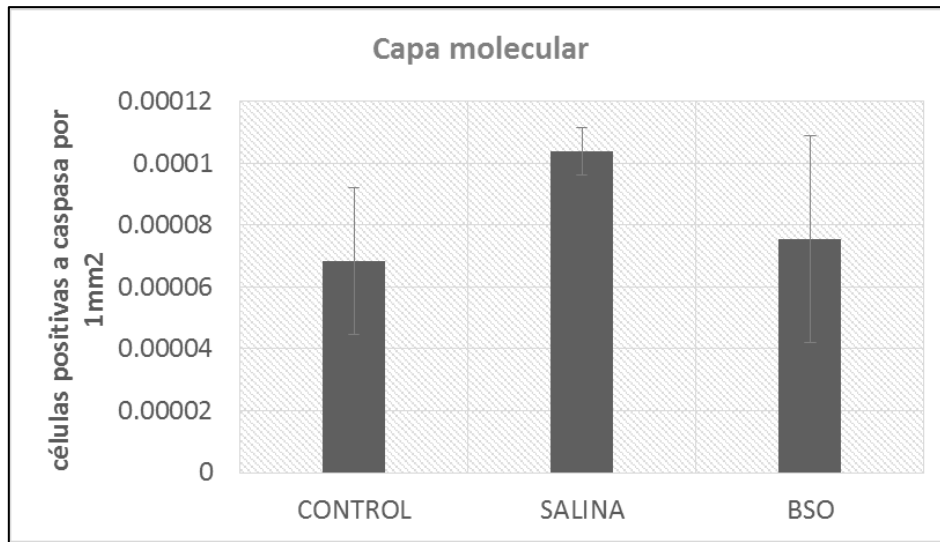


Figura 16. Número de células positivas a caspasa 3 por mm² en la capa molecular. La comparación entre tratamientos mostró que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$).

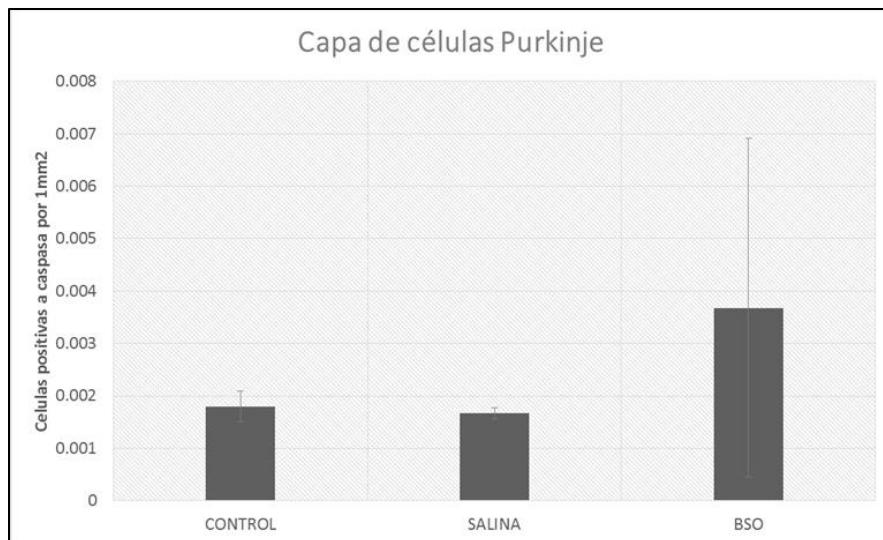


Figura 17. Número de células positivas a caspasa 3 por mm² en la capa de células de Purkinje. La comparación entre tratamientos mostró que no hay diferencia significativa ($p > 0.05$).

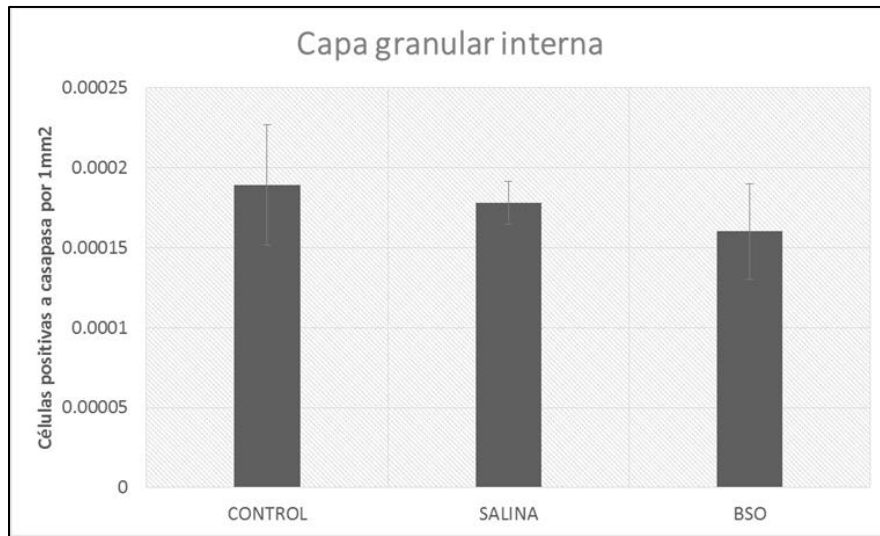


Figura 18. Número de células positivas a caspasa 3 por mm² en la capa granular interna. La comparación entre tratamientos mostró que no hay diferencia significativa ($p > 0.05$).

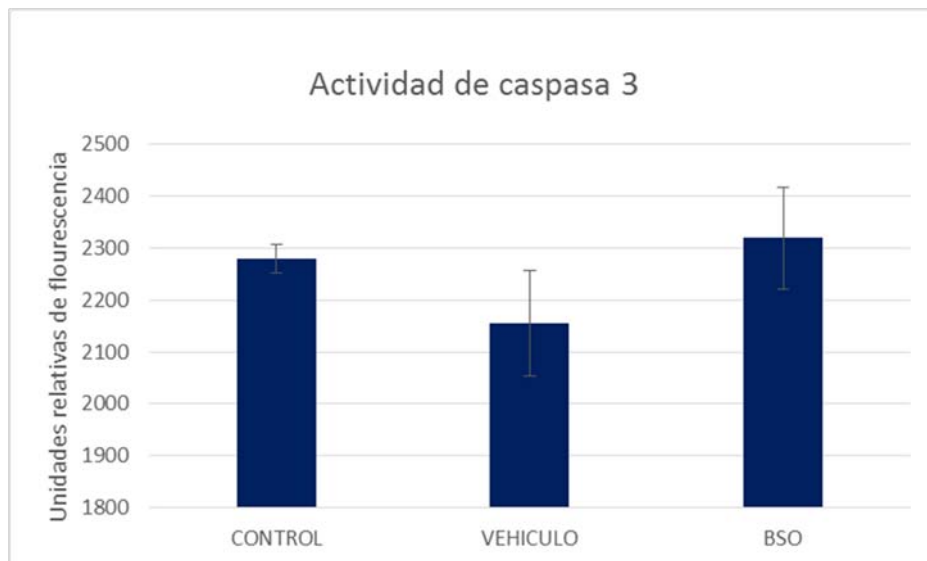


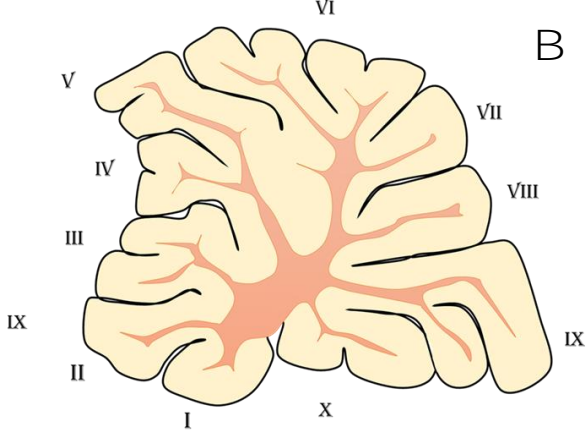
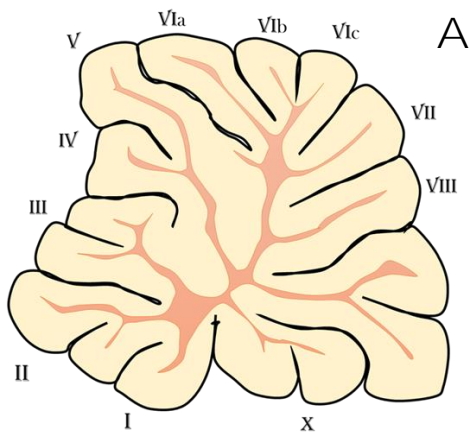
Figura 19. Actividad de caspasa 3 en homogenados de cerebelo de ratas de 16 días PN tratadas con BSO, con solución fisiológica (VEHICULO) y no tratadas (CONTROL). La comparación entre los grupos muestra que no hay diferencia significativa en la actividad de caspasa 3 ($p > 0.05$).

Efecto de la carencia de glutatión en la morfología del cerebelo

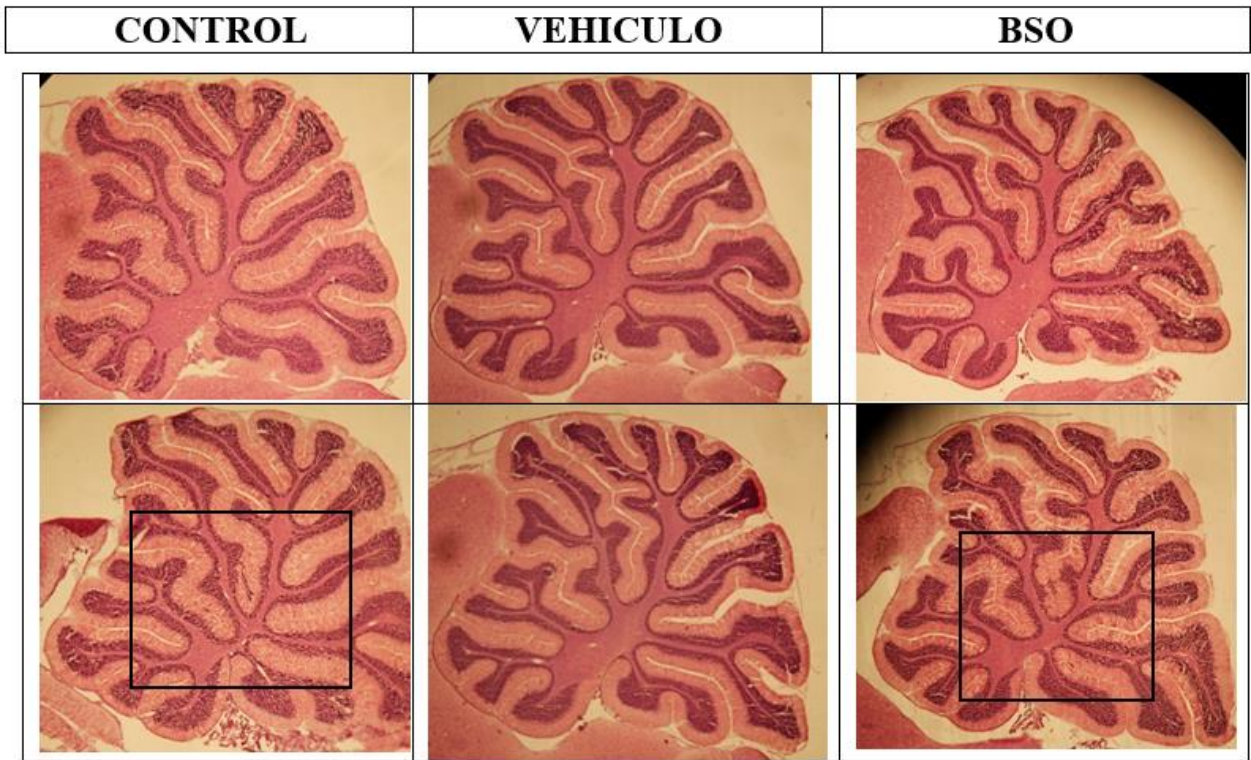
Estudios previos de nuestro laboratorio y de otros grupos mostraron que la desregulación del proceso que ocurre en el desarrollo del cerebelo por aumento en los sistemas antioxidantes (Coyoy, 2012) o inhibición de las proteínas RhoA y Rac 1 (Tolias, 2014) puede inducir numerosos defectos en la morfología del cerebelo, como alteraciones en las folias del cerebelo, la presencia de células granulares ectópicas, discontinuidad en la capa de células de Purkinje y el aumento o disminución del grosor de cada capa de la corteza cerebelar. Por esa razón, se estudió la morfología general del cerebelo en ratas control y tratadas con BSO como se indicó en la sección de Métodos.

La comparación histológica se realizó con dos modelos del patrón de foliación, esto debido a que se observó que la foliación sufre modificaciones a lo largo del vermis. Para ello se realizó el esquema con un corte representativo de un animal del grupo control donde se muestra el patrón modelo de foliación (Figura 20 A). Se realizó un segundo esquema donde se representan las modificaciones observadas en el patrón de foliación de los animales del grupo control en diferentes regiones del vermis (Figura 20 B). Con base en ambos esquemas se comparó la foliación en los diferentes grupos. No se encontraron cambios morfológicos en los animales tratados con BSO en comparación con el grupo control. En términos generales, el patrón de foliación de cerebelos de animales tratados con BSO concuerda con los esquemas realizados (Figura 20 C). Además, se encontró una proporción muy similar de células granulares ectópicas en ratas tratadas con BSO y en las control, generalmente la región donde se presenta en la base de la fisura primaria (Figura 20 D).

Asimismo, se midió el tamaño de algunas regiones del cerebelo de los tres grupos. Se midió el grosor de las capas granular, molecular, la sustancia blanca y la corteza. En ninguno de los casos se encontraron cambios significativos entre los diferentes grupos. Dado estos resultados, se concluyó que el déficit de glutatión no afecta la morfología cerebelar (Figura 21 y 22).



C



D

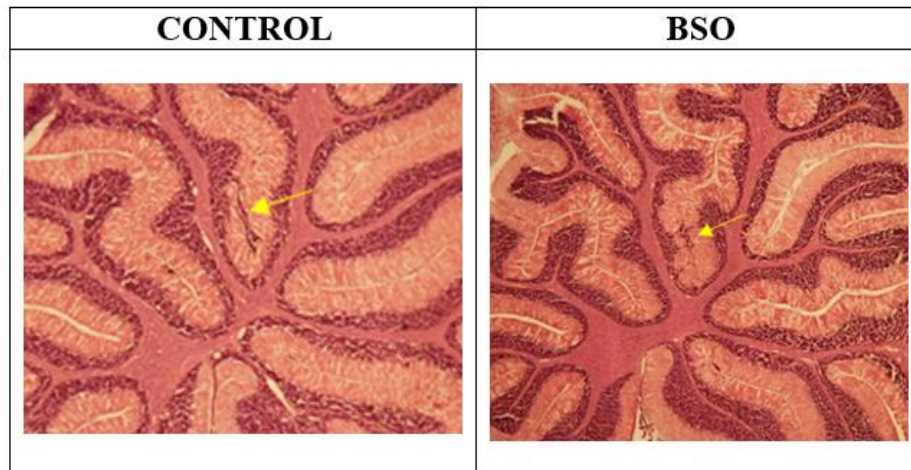
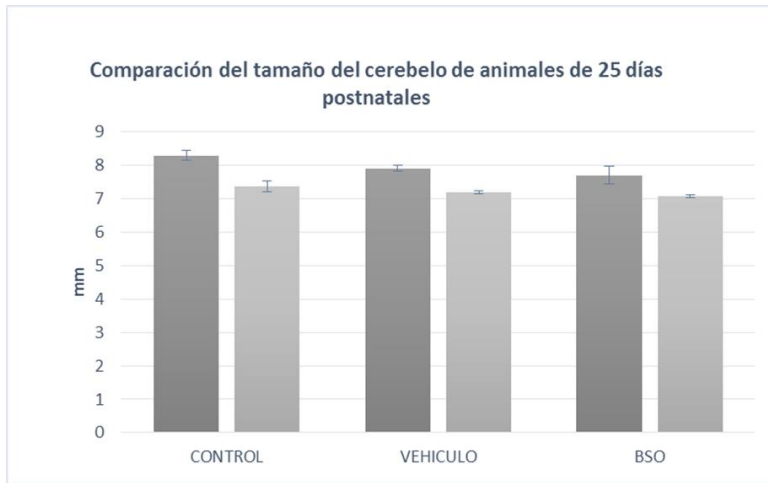


Figura 20. Efectos de la administración de BSO en el desarrollo del cerebelo. La imagen **A** muestra el patrón típico de foliación que se da en el vermis. La imagen **B** muestra los cambios que se observaron en un animal control de acuerdo a la altura donde se realiza el corte. Con base en los esquemas **A** y **B** se realizó la comparación de los cortes histológicos de animales vehículo y tratados con BSO. En las fotografías **C** se muestra que no hay cambios en el patrón de foliación bajo ninguna condición experimental. La figura **D** muestra aberraciones morfológicas presentes en ratas control y tratadas, generalmente encontradas en la fisura primaria. Las imágenes representan un acercamiento de las observadas en la figura **C**.

A



B

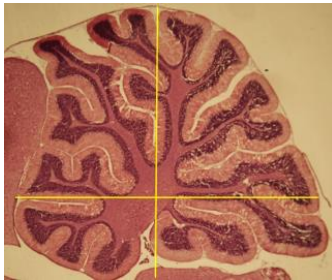


Figura 21. Tamaño de cerebelos de ratas de 25 DPN tratadas con BSO. Se utilizaron dos medidas, la primera (barras gris oscuro, Fig **A**) es la distancia desde la segunda folia a la folia IX (línea amarilla horizontal, Fig **B**) y la segunda (barra gris clara, Fig. **A**) es la distancia de la folia IV o la zona más alta del cerebelo hasta la base de éste IX (línea amarilla vertical, Fig **B**).

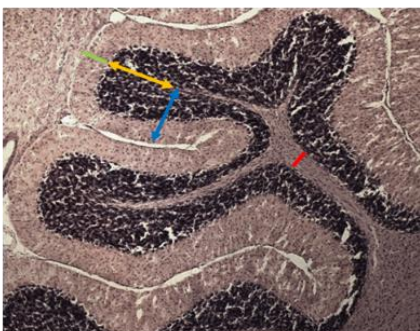
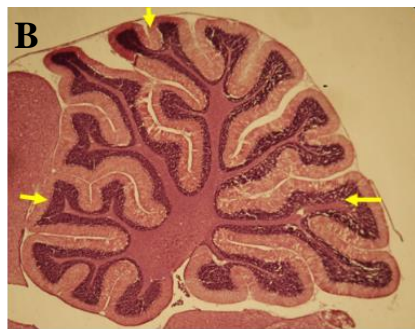
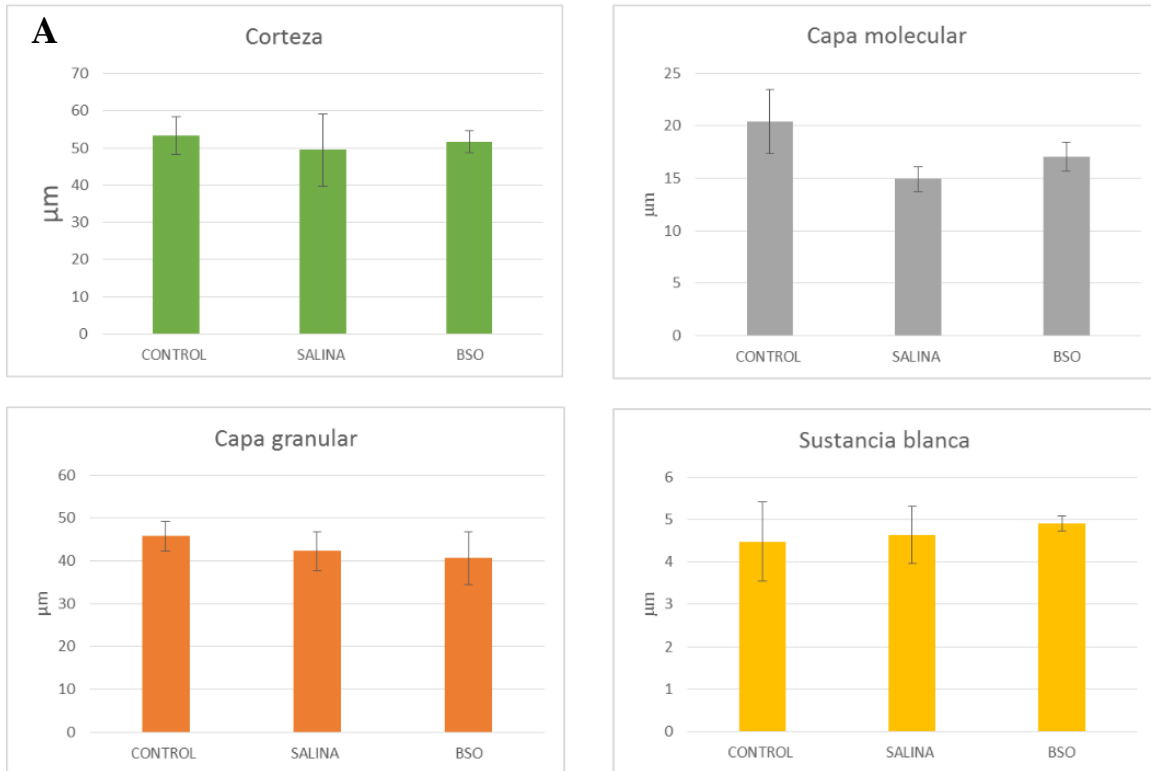


Figura 22. Grosor de la corteza cerebelar, de la capa molecular, de la capa granular interna y de la sustancia blanca de animales tratados con BSO. Se determinaron tres regiones a cuantificar en el cerebelo, la folia III, VI y IX (Imagen superior, panel B) y se midieron distintos parámetros (panel A): grosor de la corteza cerebelar (línea azul, panel B inferior), grosor de la capa molecular (línea verde), grosor de la capa granular interna (línea amarilla) y sustancia blanca (línea roja) panel B inferior. Se obtuvo los parámetros no cambian por la administración de BSO. Prueba estadística de re-muestreo. Las mediciones se realizaron en el programa image J.

El papel la disminución del glutatión sobre la conducta

El cerebelo, como se mencionó anteriormente, participa en la conducta motora a través de la regulación del balance y la postura, por ello se quiso explorar el papel que tiene la carencia de glutatión sobre la conducta motora de ratas de 22 y 25 DPN. Para ello, se utilizaron dos pruebas, la prueba de *rotarod* y la prueba de *beam walking*.

En la prueba de *rotarod* se cuantificó la latencia en segundos hasta la caída con un protocolo de 10 rpm con una aceleración de 0.1 rpm por segundo en ratas de 22 días PN. Debido a la dificultad para entrenarlas por cuestiones de la edad, también se realizaron las pruebas a los 25 días PN; para este último caso se utilizó un protocolo de 0.2 rpm de velocidad y aceleración de 0.1 rpm por segundo. También se registró la velocidad máxima alcanzada. En ambos protocolos, nuestros resultados mostraron una tendencia a disminuir la latencia sobre el *rotarod* en los animales tratados, sin embargo, esta diferencia no fue significativa ($p > 0.05$) para ninguno de los casos (Figuras 23-24 y 25).

En la prueba de *beam walking* se registró el tiempo en segundos en cruzar la viga de un extremo a otro en ratas de 22 días PN. Nuestros resultados indicaron, contrario a lo que se esperaba, un mejor desempeño de los animales tratados con BSO que las ratas control (Figura 26). Este resultado podría atribuirse en parte a las características de la prueba y a la condición de los animales tratados, ya que éstos presentan cataratas como efecto de la carencia de glutatión, lo cual podría conferirle a estos animales un mayor grado de “confianza” para cruzar la viga, debido a que no toman como estímulo aversivo la altura de la barra.

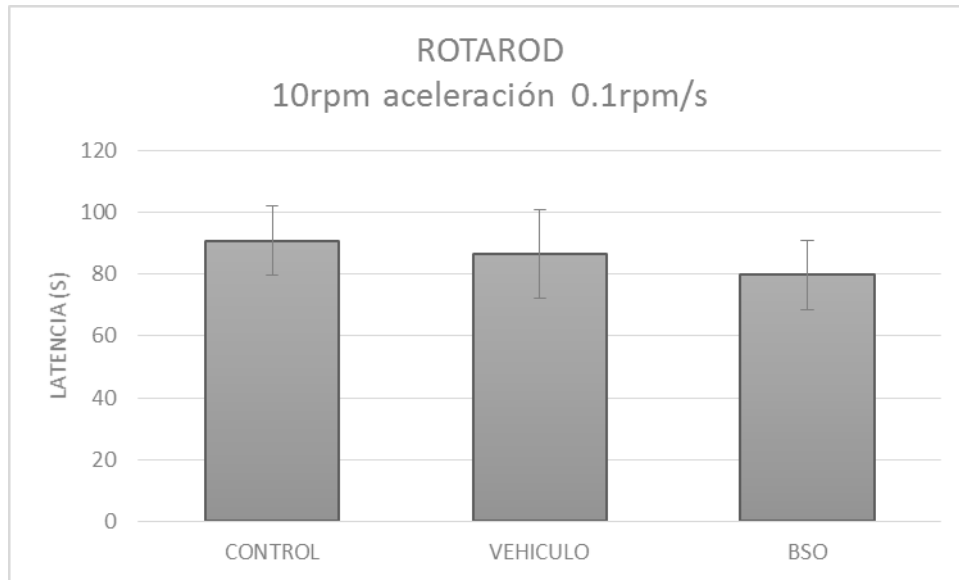


Figura 23. Prueba de rotarod realizada a ratas de 22 DPN, con un protocolo de velocidad de 10 rpm y aceleración de 0.1 rpm por segundo. Las barras muestran la latencia de caída. La comparación entre los grupos mostró que no existe diferencia significativa (prueba de remuestreo, $p > 0.05$)

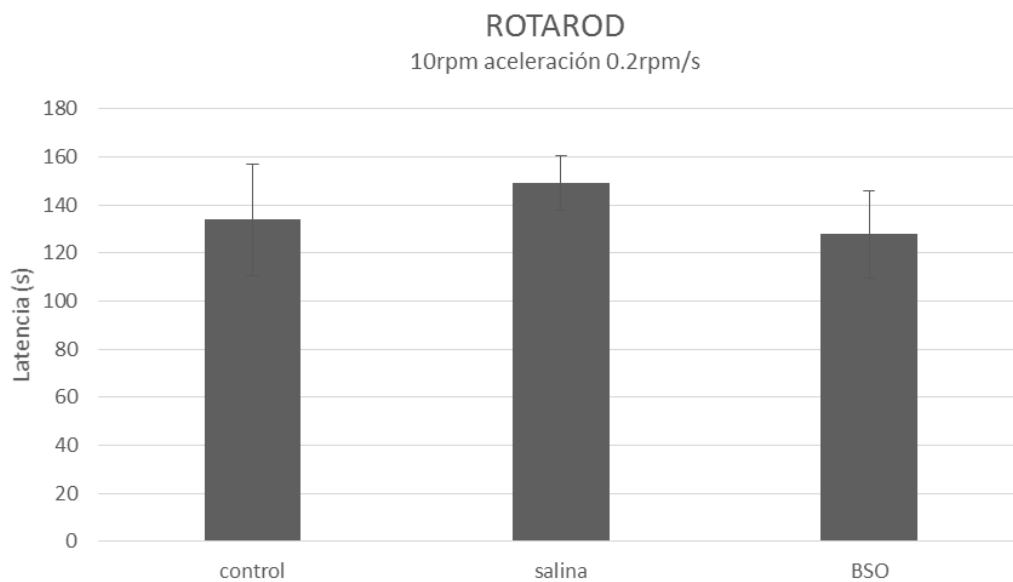


Figura 24. Prueba de rotarod realizada a ratas de 25 DPN con un protocolo de velocidad de 10 rpm y aceleración de 0.2 rpm por segundo. Las barras muestran la latencia de caída. La comparación entre los grupos mostró que no existe diferencia significativa (análisis de remuestreo $p > 0.05$)

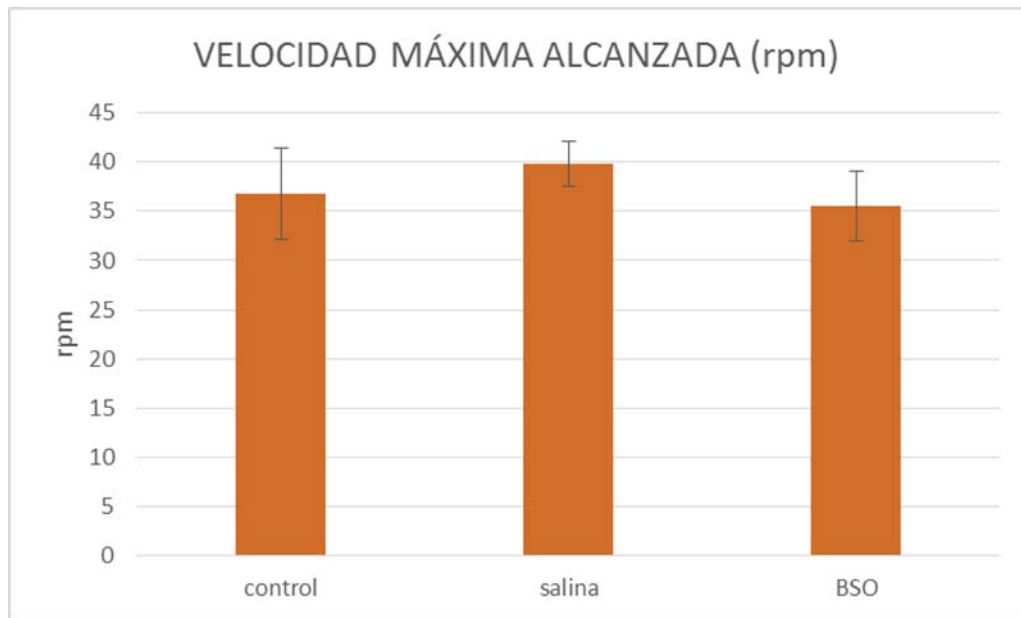


Figura 25. Velocidad máxima alcanzada en la prueba de rotador en animales de 25 DPN. La velocidad se expresa revoluciones por minuto alcanzadas en promedio para cada grupo. La diferencia entre grupos no fue significativa (análisis de remuestreo $p > 0.05$).

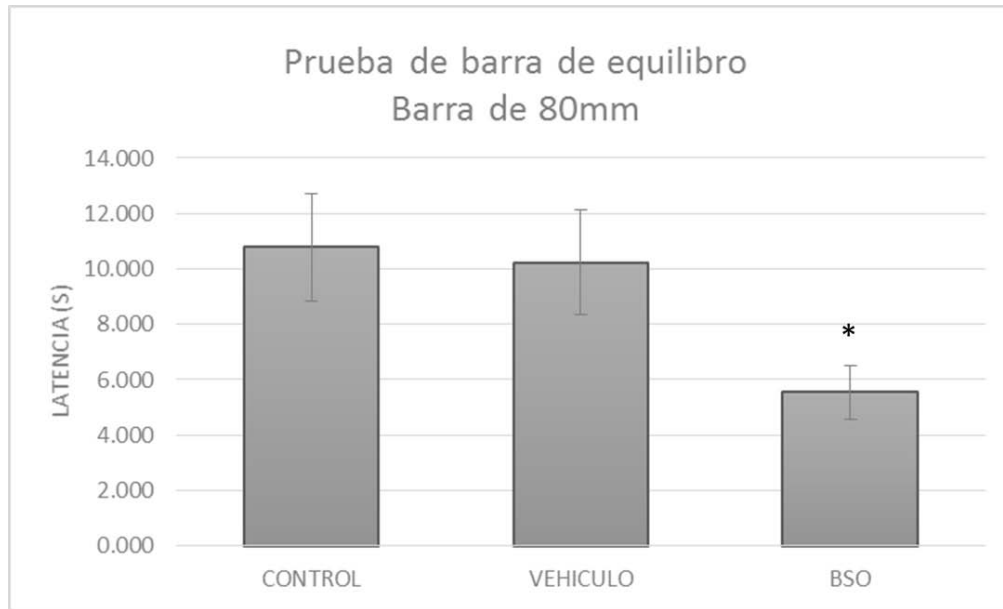


Figura 26. Prueba de equilibrio realizada en una barra de 80 mm de diámetro colocada a 80 cm del suelo. Se cuantificó la latencia en segundos sobre la barra hasta pasar de un extremo de la viga al otro. La comparación entre grupos mostró que el grupo tratado realizó la prueba en menor tiempo en comparación con el grupo control y vehículo (análisis de remuestreo $p < 0.05$).

8. DISCUSIÓN

Aun cuando se ha estudiado la importancia del glutatión en diferentes procesos celulares, existe poca información sobre los niveles de esta molécula durante el desarrollo del sistema nervioso. Refiriéndonos particularmente al cerebelo, la información es escasa y contradictoria. Por una parte, Nanda *et al* (1996) reportaron que los niveles de glutatión presentan un notable incremento durante el desarrollo postnatal del cerebelo, mientras que el trabajo realizado por Rice & Menna (1998) menciona que los niveles de glutatión no aumentan de manera importante durante el desarrollo del cerebelo en comparación con los niveles crecientes de ácido ascórbico. Con la idea de conocer este punto, en este trabajo de tesis evaluamos los niveles de glutatión durante el desarrollo del cerebelo de rata. Nosotros observamos que los niveles de glutatión se mantienen constantes durante el desarrollo postnatal. Estos resultados contrastan con lo propuesto por Nanda y colaboradores (1996): el glutatión no presenta un aumento considerable durante el desarrollo del cerebelo. Su comportamiento durante el desarrollo, más bien confirman lo reportado por el grupo de Rice & Mena (1998). Con esto, podemos decir que la poza de glutatión se mantiene constante durante el desarrollo postnatal del cerebelo no obstante el aumento en la generación de especies reactivas de oxígeno reportado por Coyoy *et al* 2013 durante esta etapa. Esto resulta interesante debido a que nosotros esperábamos obtener diferencias y en específico, un aumento en los niveles de glutatión que permitiera contrarrestar el aumento en la producción de radicales libres. Sin embargo, el glutatión total es producto de la concentración de pozas independientes en retículo endoplásmico, mitocondria, núcleo y citoplasma. Esto podría indicarnos, más bien, que cambia el contenido en una poza u otra, no así la síntesis de GSH. Asimismo, sería interesante evaluar la expresión de la enzima Gpx durante en desarrollo, ya que puede ser esta la que sufra las modificaciones para responder al aumento de radicales libres.

Proliferación, migración y apoptosis

Por otra parte, se ha demostrado que el glutatión tiene una participación importante durante el desarrollo embrionario. Se ha reportado que cuando se inhibe la síntesis de este antioxidante *In Utero*, por la administración de butionin sulfoximina, un alto porcentaje de embriones muere, mientras que los que sobreviven presentan malformaciones (Hales & Brown, 1991). Con base en esto, exploramos el papel del antioxidante en el desarrollo postnatal del cerebelo de rata. Como estrategia experimental se utilizó la reducción crítica en los niveles de glutatión durante el desarrollo. Estudios previos del laboratorio mostraron que el empleo de BSO reduce de manera eficiente los niveles de glutatión en células granulares de cerebelo *in vitro*. Además, en estos estudios se encontró que la disminución en la síntesis de glutatión por administración de BSO hace más susceptibles a las células a la muerte neuronal y que esta muerte se recupera por la administración del antioxidante N-Acetil Cisteína. Dados estos antecedentes se evaluó si estos procesos también podrían ocurrir en un modelo *in vivo* de desarrollo de cerebelo y si estos efectos podrían tener repercusiones en la conducta motora del animal.

Para ello, se abordó el papel del glutatión y las ERO en tres procesos del desarrollo: la proliferación, la migración y la muerte neuronal en animales tratados con BSO (3mmol/Kg de rata). La disminución de glutatión generada por este tratamiento fue significativa y eficiente, debido a que no se presentó mortalidad de las ratas y los niveles disminuyeron más del 50%. Esto se comprobó por la presencia de cataratas en los animales tratados, condición reportada como característica de bajos niveles de glutatión inducidos por la administración de BSO (Ercal et. al. 2011).

Se evaluó la proliferación y migración debido a que se sabe que bajas concentraciones de peróxido de hidrógeno promueven la proliferación y diferenciación celular, mientras que concentraciones elevadas inducen el arresto del ciclo celular y la muerte (Chung et. al 2009; Krause, 2006; Satoh, 1998). Se utilizó la incorporación de BrdU para evaluar las divisiones celulares en la capa granular externa. Las ratas fueron tratadas con BSO desde el día 2PN y hasta el 8 PN, momento en el cual las células granulares proliferan en la capa

granular externa (Altman 1985; Cambray- Deakin, 1988). Nuestros datos no mostraron diferencias en el número de células positivas a BrdU entre las ratas tratadas con BSO y los animales control, lo cual podría deberse a que la carencia en glutatión no generó un aumento drástico de ERO que pudiese inducir arresto del ciclo celular, como sí ocurrió en un estudio de Chung et al. 2009 realizado en células de glioma, lo que llevó a la muerte de estas células.

Por otra parte los experimentos para evaluar la migración mostraron que en animales tratados con BSO no hay retraso en la migración neuronal en la capa granular externa ni en la capa molecular. Sin embargo, de manera interesante, encontramos que las células de la capa granular interna presentaron un soma y procesos alargados, lo que es característico de células que no han completado la migración. Cuando la célula finaliza el proceso, el soma se observa redondo y los procesos son pequeños (Yacubova & Komuro, 2003). Esto podría sugerir que en estos animales ocurrió un retraso ligero en la migración que no se refleja en el número de células en las diferentes capas, pero sí en la morfología en la capa granular interna. Observaciones como éstas se han hecho previamente, por ejemplo, Tolias et. al 2014 demostró que ratones *knockout* para las proteínas GTPasas Rho y Rac 1 presentan desarrollo temprano anormal del cerebelo: formación extemporánea de fisuras y discontinuidad en las capas cerebelares, sin embargo, estas malformaciones fueron compensadas con la edad.

En cuanto a la muerte apoptótica; se sabe que ésta ocurre de manera fisiológica como parte del desarrollo del sistema nervioso central para eliminar aquellas neuronas que no establecieron los contactos sinápticos adecuados. Durante el desarrollo del cerebelo, este proceso presenta un aumento alrededor del día 16 PN. Estudios previos del laboratorio mostraron *in vitro* que las células granulares fueron más vulnerables a la muerte cuando son tratadas con BSO. Debido a esto, esperábamos obtener resultados similares en el modelo *in vivo*, sin embargo, los resultados obtenidos muestran que no hay aumento significativo de la muerte medido por inmunohistoquímica contra caspasa 3 y por actividad de caspasa. Estos resultados podrían deberse a dos situaciones:

1.- Se sabe que el GSH es el antioxidante más importante en la mitocondria, por lo que las pozas de este antioxidante están bien reguladas y son más resistentes a la disminución de los niveles de GSH que en el citoplasma y otros compartimentos subcelulares (Zhivotovsky et. al. 2006; Checa et. al 2009). Además, se conoce que es necesaria una disminución de los niveles mitocondriales de GSH para la promoción de la muerte (Franco & Cidlowski, 2009). La disminución de GSH mitocondrial induce la liberación de citocromo c mitocondrial y el estado pro-oxidante del citosol inducido por depleción de glutatión induce la oxidación que activa su acción pro-apoptótica (Franco & Cidlowski, 2009). Por otro lado, Meister (1995) y Wüller *et al.* (1999) mencionan que es necesario disminuir más del 50% los niveles mictocondriales de GSH para que continúe el proceso de muerte activado en citoplasma. Así, una posibilidad para explicar nuestros resultados es que aun cuando el BSO redujo significativamente los niveles citosólicos de glutatión, el tratamiento no disminuyó suficientemente los niveles de GSH en las pozas mitocondriales.

2.- Se sabe que a excepción de los humanos, primates, cobayos y murciélagos, los animales pueden sintetizar ácido ascórbico (vitamina C) en hígado, gracias a la enzima l-gulonolactona oxidasa. En 1992, Metersson & Meister encontraron que cuando se induce la deficiencia de glutatión por administración de BSO, la síntesis de ácido ascórbico incrementa para compensar los niveles carentes del antioxidante. La facilidad del ácido ascórbico de atravesar la barrera hematoencefálica permite que se encuentre en sistema nervioso y que ingrese a las células a través de transportadores de glutamato y glucosa (Harrison & May, 2008). Estudios realizados también por Meister, mostraron que los efectos producidos por la deficiencia de glutatión podían ser compensados por la administración de ácido ascórbico. En nuestro modelo, es factible pensar que los niveles bajos de glutatión inducidos por la administración intraperitoneal de BSO promovieron un aumento compensatorio en la síntesis de ácido ascórbico, lo que contrarrestó el posible aumento en el nivel de ERO generado por una deficiencia de glutatión. Esta idea podría explicar por qué en células granulares cultivadas tratadas con BSO sí ocurre el proceso de muerte celular. Esta hipótesis se podría poner a prueba mediante la cuantificación de ácido ascórbico en muestras de cerebelo de todos los grupos experimentales.

Cambios morfológicos

La desregulación del potencial redox de la célula por generación de ERO puede inducir cambios en los procesos de desarrollo del sistema nervioso. Debido a que encontramos que el tratamiento con BSO podría estar induciendo retraso en la migración de las células granulares, se estudiaron posibles cambios morfológicos generales mediante el análisis de cortes histológicos de cerebelos de ratas de 25 días PN en los tres grupos experimentales.

Se observaron aparentes células granulares ectópicas así como intrusión de la capa granular interna a la capa molecular en todos los grupos de ratas – grupos tratados, vehículo y control- por consiguiente, se descartó que esta morfología aberrante fuera inducida por el tratamiento. Consideramos que estas aparentes aberraciones observadas en los cortes estudiados se deben a la región donde se realizó el corte. Es importante tomar en cuenta que en la región del vermis, se encuentra el núcleo cerebelar fastigial. Este cúmulo neuronal puede confundirse fácilmente con aberraciones morfológicas como células granulares ectópicas que han sido observadas cuando el desarrollo del cerebelo se altera.

Aunado a lo anterior, al analizar el patrón de foliación por comparación con los esquemas realizados encontramos que, para todos los casos, la foliación es normal, al igual que la frecuencia de cambios. Igualmente, se realizó la medición de las capas cerebelares, así como del tamaño total, sin encontrar cambios significativos en ambos parámetros entre animales tratados y control. Respecto a lo anterior, concluimos que la disminución del glutatión inducida por el tratamiento con BSO no altera la morfología del cerebelo.

Pruebas motoras

Al considerar la posibilidad de que la baja en los niveles de glutatión en cerebelo pudiese inducir daños fisiológicos en las células granulares, se evaluó la conducta motora que en parte es regulada por el cerebelo, mediante pruebas de equilibrio y habilidad motora. Previamente observamos que el grupo de ratas tratadas con el inhibidor de glutatión presentaron temores en la cabeza. Evaluamos la conducta con dos diferentes pruebas, *Rotarod* y *Beam walking*. Estas pruebas se han utilizado en numerosos estudios para evaluar la conducta producida por el cerebelo, sin embargo, se debe aclarar que esta conducta se evalúa mediante pruebas no específicas debido a su complejidad, ya que esta región se encarga en gran medida de la memoria procedural, es decir, memoria de habilidades y hábitos que no requiere un recuerdo consciente y que se infiere a partir de las modificaciones del comportamiento como consecuencia del aprendizaje.

En el caso de la prueba de *Rotarod*, bajo ninguno de los dos protocolos empleados encontramos diferencias en la conducta motora de las ratas. Como se mencionó anteriormente, se debe considerar que esta prueba no es específica del movimiento regulado por el cerebelo. Esta región recibe entrada de información sensorial y olivar y como respuesta genera impulsos inhibitorios (GABAérgicos) sobre los núcleos cerebelares profundos. Estos núcleos dirigen sus proyecciones al puente y tálamo, comunicándose con vías descendentes, por lo tanto no inician el movimiento, pero sí lo regulan mediante la recopilación de información sensorial y la comunicación con la corteza. Actualmente se han explorado otras pruebas como las de Erasmus Leader y condicionamiento de parpadeo para tener una mayor aproximación a la conducta establecida por el cerebelo.

En el caso de la prueba de *Beam Walking*, el resultado obtenido fue contrario al esperado, pues nuestra hipótesis planteaba que con el tratamiento con BSO se inducirían daños fisiológicos que repercutirían en la conducta de balance y coordinación de las extremidades y por ello el grupo de ratas tratadas con el inhibidor tardaría mayor tiempo para realizar la prueba. Contrario a esto, encontramos que las ratas tratadas con BSO realizaron mejor la prueba en comparación con las no tratadas. Este comportamiento observado puede ser

atribuido a algunas variables a considerar: una de ellas es que el tratamiento con BSO administrado sistémicamente induce cataratas que se generan por pérdida progresiva de la transparencia del cristalino. Se ha demostrado que esto sucede cuando el estrés oxidativo excede la capacidad antioxidante del cristalino, lo que conduce a daño celular. Las células del cristalino son ricas en glutatión, por lo que se ven afectadas por su deficiencia (Ercal, 2010). Así, una posibilidad es que la disminución en la capacidad visual de las ratas tratadas lleva a que éstas no consideren como un estímulo aversivo la altura a la que se encuentra la barra en la prueba (80cm), lo que lleva a que completen la prueba con un mejor desempeño que las ratas control.

9. CONCLUSIÓN

El tratamiento con BSO (3mmol/kg) disminuye efectivamente los niveles de glutatión en cerebelo; sin embargo, esta disminución no repercute en los procesos de proliferación, migración y muerte que ocurren en el cerebelo durante el desarrollo. A pesar de que estudios previos encontraron una morfología aberrante en las ratas tratadas con el fármaco, nosotros encontramos que esta morfología es normal. La disminución de los niveles de glutatión no induce cambios fisiológicos que repercutieran en la conducta motora evaluada por las pruebas de *Rotarod* y *Beam Walking*.

Con estos hallazgos, concluimos que no se puede descartar la importancia de la participación del glutatión en los procesos ocurridos durante el desarrollo, como se ha observado en modelos *in vitro*, ya que la ausencia de efecto en los parámetros medidos arroja información importante sobre posibles mecanismos compensatorios ocurridos en el modelo *in vivo* que aseguran el correcto desarrollo de la región –como se ha observado en otros trabajos- Estos procesos deben ser estudiados a profundidad; uno de ellos podría ser la compensación de la carencia de glutatión por el aumento en otros sistemas antioxidantes, como el ácido ascórbico.

10. BIBLIOGRAFIA

Abid, MR; Kachra, Z; Spokes KC & Aird WC. (2000) NADPH oxidase activity is required for endothelial cell proliferation and migration. *FEBS letters*. 3:252-256

Altman, J. (1972). Postnatal development of cerebellar cortex in the rat.I. The external germinal layer and the transitional molecular layer. *J. Comp. Neurol.*163: 427-448.

Altman, Joseph. (1985). Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat : Maturation of the components of the granular layer. . *J. Comp. Neurol.* 231 : 1-26.

Altman, J & Bayer, SA. (1985). Embryonic development of the rat cerebellum. III. Regional differences in the time of origin, migration, and settling of Purkinje cells. *J comp Neurol.* 1: 42-65.

Andersen, J. (2004) Oxidative stress in neudegeneration : cause or consequence ?. *Nature neuroscience reviews*. 19-25.

Appel, K & Hirt, H (2004) Reactive oxygen species : Metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Ann. Rev. Plant Biol.* 55 : 373-399.

Argyropoulos, G.(2015) The cerebellum, internal models and prediction in “non motor” aspects of language: A critical review. *Brain & language*.

Arnér, J & Nordberg J (2001) Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free radical biology and medicine*. 31 (11) :1287-1312.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254.

Behesti, H & Marino, S. (2009). Cereballar granule cells: insights into proliferation, differentiation, and role in medulloblasmtoma pathogenesis. *International Journal of biochemistry and cell biology*. 41: 435-445.

Bengtsson, F & Hesslow, G. (2006). Cerebellar control of the olive inferior. *The cerebellum*. 5:7-14.

Boonstra, J & Post, JA. (2004). Molecular events associated with reactive oxygen species and cell progression in mammals cells. *Gene*. 4: 1-13.

Broquist, HP. (1992). Buthionine sulfoximine, an experimental tool to induce glutathione deficiency: elucidation of glutathione and ascorbate in their role as antioxidants. *Nutr Rev*. 4: 110- 111.

Buffo, A & Rossi, F. (2013). Origin, lineage and function of cerebellar glia. *Pneurobio*.109:42-63.

Cambray- Deakin & Burgoyne R. (1988). The cellular neurobiology of neuronal development: the cerebellar granule cell. *Brain research reviews*, 13 77-101.

Carter, R; Morton, J & Dunett, S. (2001). Motor coordination and balance in rodents. *Current Protocols in Neuroscience*.

Cho, Y. et al. (2006). Dynamic changes in mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during the spontaneous differentiation of human embryonic stem cells. *BBRC*. 348 : 1472-1478.

Circu, M & Aw, T. (2008). Gluthathione and apoptosis. *Free Radic Res*. 8: 689-706.

Circu, M & Aw, T. (2010). Reactive oxygen species, cellular redox systems and apoptosis. *Free radical biology and medicine*. 1- 14.

Contestabile, A. (2002) Cerebellar granule cells and a model to study mechanisms of neuronal apoptosis or survival in vitro and in vivo. *The cerebellum*. 1: 41-55.

Coyoy, A; Olguín- Albuerne, M; Briseño, P & Morán, J. (2013). Role of reactive oxygen species and NADPH- oxidase in the development of rat cerebellum. *Neurochemistry international*: 62 998-1011.

Dale Purves; George Augustine; David Fitzpatrick; William Hall; Anthony LaMantia; James McNamara; Mark Williams. (2004). Neuroscience. Massachusetts, USA: Sinauer Associates.

Davisson, R; Sharma, R & Infanger, D. (2006). NADPH oxidases of the brain: distribution, regulation, and function. *Antioxid Redox Signal*.8:1583-96.

DeGennaro, M; Hurd, T & Lehmann R. (2011). Redox regulation of cell migration and adhesion. *Cell Press*. 22: 107- 115.

Delgado- García. (2001). Estructura y función del cerebelo. *RevNeurol*; 33 (7) 635-642.

Donkelaar, H; Lammens, M; Wesseling, P; Thijseen, H; Renier, W. (2003). Development and developmental disorders in human cerebellum. *J Neurol*. 250: 1025-1036.

Dringen, R. (2000).Metabolism and fuctions of glutathione in brain. *Progress in neurobiology*. 62: 649-671.

Elmore, S. (2007). Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 35(4): 495-516.

Fan, X; Xu, H; Yang, Y; Tang, X; Zhao, M; Liang, F; Xu, P; Hou, B; Xing, Y; Bao, X. (2013). Bergmann glia function in granule cell migration during cerebellum development. *Mol. Neurobiol.* 47(2), 833-844.

Franco, R & Cidlowski, JA. (2009). Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. *Cell Death and Differentiation.* 16: 1303-1314.

Glickstein, M & Doron, K. (2008) Cerebellum connections and functions. *Cerebellum.* 7: 589-594.

Hales, B & Brown, H. (1991). The effect of in vivo glutathione depletion with buthionine sulfoximine on rat embryo development. *Teratology.* 44: 251-257.

Houk, J; Buckingham, J; Barto, A. (1996). Models of the cerebellum and motor learning. *Behavioral and brain sciences.* 19: 368-383.

Jordan, J. (2003). Apoptosis: muerte celular programada. *OFFARM* 22: 100- 106.

Kamata, H and Hirata, H. (1999). Redox regulation of cellular signalling. *Cell. Signal.* 1: 1-14.

Kayakabe, M; Kikizaki, T; Kaneko, R; Sasaki, A; Nakazato, Y; Shibasaki, K; Ishizaki, Y; Saito, H; Suzuki, N; Furuya, N & Yanagawa, Y. (2014). Motor dysfunction in cerebellar Purkinje cell- specific vesicular GABA transporter knockout mice. *Fncel.* 7: 286 1-11.

Komuro, H & Yacubova, E. (2003). Cellular and molecular mechanisms of cerebellar granule cell migration. *Cell Biochemistry and biophysics.* 37: 213- 234.

Komuro, H and Yacubova, E. (2003). Cellular and molecular mechanisms of cerebellar granule cell migration. *Cell biochemistry and biophysics.* 37, 213-234.

Krause, K; Jaquet, V; Nayernia, Z (2014). New insights on NOX Enzymes in the central Nervous System. *Antioxidants and redox signaling.* 20; 2815- 2837.

Lambeth, D. Nox enzymes and the biology of reactive oxygen. 2004. *Nature reviews.* 4:181- 189.

Leto, T; Marand, S; Hurt, D & Ueyama, T. (2009). Targeting and regulation of reactive oxygen species generation by Nox family NADPH oxidases. *Antioxidants and redox signaling.* 11: 2607- 2619.

Li, J; Stouffs, M; Serrander, L; Banfi, B; Bettiol, E; Charnay, Y; Stenger, K; Heinz Krause, K & Jaconi, M. (2006). The NADPH Oxidase NOX 4 drives cardiac differentiation role in regulating cardiac transcription factors and MAP kinase activation. *Molecular biology of the cell.* 17 : 3978-3988.

Mavelli, I, Rigo, A, Fererico, R, Ciriolo, M ; Rotilio, G. (1982). Superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in developing rat brain. *Biochem J.* 204: 535-540.

Harrison, F & May, J. (2008). Vitamin C function in the brain: vital role of ascorbate transporter SVCT2. *Free Radical Biology and Medicine.* 46: 719-730.

Mcllwain, D; Berger, T; Mak, T. (2013). Caspase functions in cell death and disease. *Cold spring harbor perspectives in biology.* 1-28.

Meister, A. (1981). Metabolism and functions of glutathione. *TIBS.* 231-234.

Meister, A. (1995). Mitochondrial changes associated with glutathione deficiency. *Biochim Biophys Acta.* 1: 35-42

Mothersill, O; Knee- Zaska, C; Donohoe, G. (2015). Emotion and theory of mind in schizophrenia- investigating the role of cerebellum. *Cerebellum.*

Nanda, D; Tolputt, J & Collard, K. (1996). Changes in brain glutathione levels during postnatal development in the rat. *Developmental brain research.* 94: 238-241.

Nimnual, AS; Taylor, LJ & Bar- Sagi, D. (2003). Redox- dependent downregulation of Rho by Rac. *Nat Cell Biol.* 5: 236-241.

O'Halloran, C ; Kinsella, G & Storey, E. (2011). The cerebellum and neurophysiological functioning: A critical review. *Journal of clinical and experimental neuropsychology.* 34: 35-56.

Ramiro- Cortés, Y & Morán, J. (2009). Role of oxidative stress and JNK pathway in apoptotic death induced by potassium deprivation and staurosporine in cerebellar granule neurons. *Neurochemistry international.* 55: 581-592.

Rao, N and Berk, C. 1992. Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circ Res.* 593-599.

Rastegar, M; Marzban, H; Bigio, M; Alizadeh, J; Ghavami, S; Zachariah, R. (2015). Cellular commitment in the developing cerebellum. *Fncel.* 450:8 1-26.

Rice, M & Russo- Menna. (1998). Differential compartmentalization of brain ascorbate and glutathione between neurons and glia. *Neuroscience.* 82: 1213 1223.

Sakai, J; Li, J; Subramanian, K, Mondal, S; Bajrami, B; Hattori, H; Jia, Y; Dickinson, B; Zhong, J; Ye, K; Chang, C; Ho, Ye; Zhou, J & Luo, H. (2012). Reactive oxygen species-induced actin glutathionylation controls actin dynamics in neurotrophils. *Immunity.* 37: 1037-1049.

Salinas, AE; Wong, MG. (1999). Glutathione S- transferases- a review. *Curr Med Chem.* 6: 279-309.

Sastry, P. S & Rao, K. (2000). Apoptosis and the nervous system. *Journal of neurochemistry*. 74: 1-20.

Satoh, T; Numakawa, T; Abiru, Y; Yamagata, T; Ishikawa, Y; Enokido, Y & Hatanaka, H. 1998. Production of reactive oxygen species and release of L- glutamate during superoxide anion- induced cell death of cerebellar granule neurons. *Journal of neurochemistry*. 70: 316-324

Schröder, K; Weissmann, N & Brandes, R. (2014). Redox- mediated signal transduction by cardiovascular Nox NADPH oxidases. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 73: 70-79.

Shen, H & Pervaiz, S. (2006). TNF receptor superfamily- induced cell death: redox dependent execution. *The FASEB journal*. 20: 1589-1597.

Stanley, A; Thompson, K; Brakebusch, C & Quondamatteo, F. (2014). NADPH Oxidase complex- derived reactive oxygen species, the actin cytoskeleton, and Rho GTPases in cell migration. *Antioxidants & Redox signaling*. 226- 242.

Strick, P; Dum, R & Fiez J. (2009). Cerebellum and nonmotor function. *Annu. Rev. Neurosci*. 32: 413-434.

Tammariello, S; Quinn, M; Estus, S. (2000). NADPH oxidase contributes directly to oxidative stress and apoptosis in nerve growth factor- deprived sympathetic neurons. *The journal of neuroscience*. 20: 1-5.

Tojo, T; Ushio- Fukai, M; Yamaoka- Tojo, M; Ikeda, S; Patrushev, N; Alexander, RV. (2005) Role of gp91phox (Nox 2)- containing NAD(P)H oxidase in angiogenesis in response to hindlimb ischemia. *Molecular cardiology*. 2347- 2355.

Tolias, K; Mulhearkar, S; Danish, U & Mulherkan, S. (2014). The small GTPases RhoA and Rac1 regulate cerebellar development by controlling cell morphogenesis, migration and foliation. *Developmental Biology*. 2- 15.

Tsatmali, M ; Walcott, E and Crossin, K. 2005. Newborn neurons acquire high levels of reactive oxygen species and increased mitochondrial proteins upon differentiation from progenitors. *Brain research*. 1040 : 137.150.

Tsatmali, M, Walcott, E, Makarenkova, H and Crossin, K. (2006). Reactive oxygen species modulate the differentiation of neurons in clonal cortical cultures. *Mol.Cell. Neurosci*. 33 : 345-357.

Valencia, A & Morán , J. (2004). Reactive oxygen species induce different cell death mechanisms in cultured neurons. *Free Radic Biol Med*. 36: 1112- 1125.

Voogd, J & Glickstein, M. (1998). The anatomy of the cerebellum. *Trends in neuroscience*. 21: 370-375.

Wang, V & Zoghbi H. (2001). Genetic regulation of cerebellar development. *Nature reviews*. 2: 484-491.

Wang, Y; Zang, Q; Lui, Z; Maass, D; Dulan, G; Shaul, PW; Melito, L; Frantz, D; Kilgore, J; Williams, N; Terada, L & Nwariaku F. (2011) Regulation of VEGF-induced endothelial cell migration by mitochondrial reactive oxygen species. *Am J Physiol Cell Physiol*. 3: 695-704

Winkler, BS. (1992). Unequivocal evidence in support of the nonenzymatic redox coupling between glutathione/ glutathione disulfide and ascorbic acid/ dehydroascorbic acid. *Biochim Biophys Acta*. 27: 287-290.

Winterbourn, C & Metodiewa, D. (1999). Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med*. 27: 322- 328.

Wüller, U; Groscurth, P; Beinroth, S; Winter, S; Gleichmann, M; Heneka, M; Löschan, P; Schulz, J; Weller, M & Klockgether, T. (1999). Glutathione depletion and neuronal cell death: the role of reactive oxygen intermediates and mitochondrial function. *Brain research*. 53-62.

Xifró, X; Miñano- Molina A;J, Saura & Rodríguez- Álvarez J. (2014). Ras protein activation is key event in activity-dependent survival of cerebellar granules cells. *J Biol Chem*. 12: 8462-8472.

Yang, S; Lee, S; Oh, S; Jung, Y; Ryu, J; Suh, H; Kim, M; Oh, K & Han, H. (2014). Reactive oxygen species induce MMP12-dependent degradation of collagen 5 and fibronectin to promote the motility of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *Br,J Pharmacol*. 13: 3283-3297.

Zheng- zheng Shi; Osel- Frimpong J; Kala, G; Barrions, R; Habib, G; Lukin, D; Danney, C; Matzuk, M & Lieberman, M. (2000). Glutathione synthesis is essential for mouse development but not for cell growth in culture. *PNAS*. 10: 5101- 5106.

Zhivotovsky, B; Gogvadze, V & Orrenius, S. (2007). Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol*. 47:143- 183.