



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO **UNAM** POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

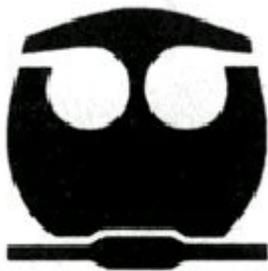
PAPEL DE UNA NADPH-OXIDASA EN LA
MUERTE APOPTÓTICA DE NEURONAS
GRANULARES DE CEREBELO DE RATA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :
**ANGÉLICA BERENICE COYOY
SALGADO**

Tutor: DR. JULIO MORÁN ANDRADE



MÉXICO, D. F.

Marzo 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PAPEL DE UNA NADPH-OXIDASA EN LA MUERTE APOPTÓTICA DE NEURONAS GRANULARES DE CEREBELO DE RATA

RECONOCIMIENTOS

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

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

Dr. José Pedraza Chaverri	Facultad de Química, UNAM
Dr. Julio Morán Andrade	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Jesús Aguirre Linares	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Se reconoce la asesoría técnica de la Biol. Guadalupe Domínguez Macouzet en los cultivos celulares.

El proyecto fue apoyado por CONACyT (36235-N). Durante los estudios de maestría goce de una beca otorgada por CONACyT y parcialmente por DGAPA (IN-222303) para la realización de la presente tesis.

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dr. José Pedraza Chaverri	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. Rolando Hernández Muñoz	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Secretario	Dra. Marina Gavilanes Ruiz	Facultada de Química, UNAM
Suplente	Dra. Rosa Navarro González	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Suplente	Dra. Lourdes Massieu Trigo	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

AGRADECIMIENTOS

A mis padres,

Delia y Ernesto, por darme la vida. Por todo lo que me han brindado incondicionalmente, lo cuál no alcanza espacio para mencionar ni palabras para agradecer.

A mis hermanas,

Bety y Delia por su compañía, su apoyo, por alegrar y cambiar mi vida.

Al **Dr. Julio Morán Andrade** por su ayuda, tiempo, apoyo, por todos los consejos y conocimientos (científicos y principalmente de vida) compartidos, por ser una gran persona.

A mis amigos y compañeros:

Jessi, Sugis, Jaz, Pao, Dione, Alette, Lupita, Bere, José Miguel, Juan, Mauricio, Laila, Andrea, Gaby, Marce, Toño, Chrystian, Tere por los momentos agradables, por la convivencia, por que cada uno a aportado un granito en mi vida, por su disposición y apoyo.

A **Adrian** por todo su amor y apoyo, por comprenderme y por estar a mi lado.

Especialmente agradezco a mi hija **Bety Adrianita** por alegrar y mejorar mi vida, por hacerme muy muy... feliz.

INDICE

	Pág
Abreviaturas	3
Resumen	5
Introducción	
1. Apoptosis	
1.1 Generalidades	7
1.2 Caspasas	9
1.3 Otros factores y proteínas involucradas en el control de la apoptosis	11
2. Especies de oxígeno reactivas	
2.1 Generalidades	12
2.2 Especies de oxígeno reactivas y apoptosis neuronal	15
2.3 Eliminación de las especies de oxígeno reactivas	15
2.4 Fuentes de las especies de oxígeno reactivas	16
3. NADPH-oxidasa	
3.1 Generalidades	18
3.2 Activación de la NADPH-oxidasa	20
3.3 Inactivación de la NADPH-oxidasa	23
3.4 Inhibidores de la NADPH-oxidasa	23
3.5 La NADPH-oxidasa no fagocítica y la familia NOX	23
4. Cultivo de neuronas granulares de cerebelo	26
Antecedentes	27
Hipótesis	29
Objetivos	29
Materiales y métodos	
i. Cultivo de neuronas granulares de cerebelo de rata	30
ii. Viabilidad celular	30
iii. Detección de anión superóxido	31
iv. Actividad de caspasa 3	31
v. Actividad de NADPH-oxidasa	32
vi. Ensayos tipo replica en western	33
vii. RT-PCR	33

viii. Estadística	36
Resultados	
I. Viabilidad celular	37
II. Detección de anión superóxido	39
III. Actividad de caspasa 3	40
IV. Actividad de NADPH-oxidasa	41
V. Ensayos tipo replica en western	42
VI. RT-PCR	43
Discusión	46
Conclusiones	50
Referencias	51

INTRODUCCIÓN

1. Apoptosis

1.1 Generalidades

La apoptosis es un tipo de muerte celular que ocurre de forma ordenada y que requiere de energía y de síntesis de ARN y proteínas (Oppenheim, 1990). Este tipo de muerte se caracteriza por una serie de cambios morfológicos como encogimiento celular, condensación y fragmentación nuclear, compactación de organelos citoplasmáticos, alteraciones en la membrana plasmática y formación de fragmentos celulares o cuerpos apoptóticos que se autodegradan o son fagocitados por células vecinas (Gorman *et al.*, 1995; Thornberry y Lazebnik, 1998). Estas alteraciones impiden el vaciamiento del contenido celular (Chimini, 2002) y la consecuente reacción inflamatoria tisular (Lockshin *et al.*, 2000).

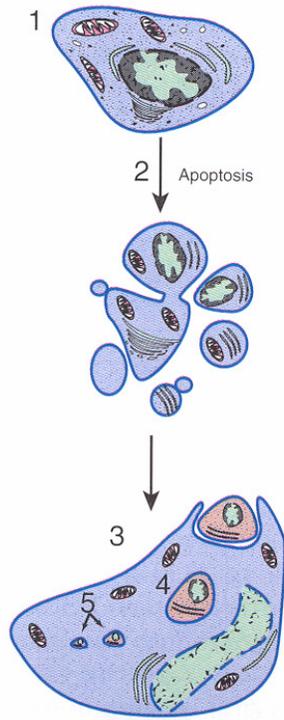
En paralelo, ocurren algunos eventos bioquímicos como la activación de proteasas de cisteína o caspasas, la fragmentación internucleosomal del ADN en fragmentos regulares, la translocación de fosfatidilserina a la capa externa de la membrana y la activación de diversas proteínas encargadas de conducir el proceso apoptótico (Martín y Green, 1995; Golstein, 1997; Cohen, 1997; Nardi *et al.*, 1997; Morán *et al.*, 1999).

A diferencia de la apoptosis, la muerte necrótica es un proceso de degeneración celular pasiva, con lisis generalizada de los componentes intracelulares, ruptura de las membranas internas y plasmáticas y el vaciamiento del contenido citoplásmico y de los organelos al espacio extracelular, con el consecuente proceso inflamatorio del tejido afectado (Fig. 1).

La muerte apoptótica se puede iniciar por dos vías (Fig. 2): la ruta extrínseca y la ruta intrínseca. La primera está mediada por activación de receptores extracelulares que resulta en la formación del complejo de señalización inductor de muerte (DISC), posteriormente se recluta la caspasa-8 que se autoactiva y ésta a su vez activa a la caspasa-3 que degrada a una gran variedad de sustratos subcelulares (Fig. 2).

La ruta intrínseca o mitocondrial se inicia con la salida de citocromo c de la mitocondria al citoplasma, que forma el apoptosoma al asociarse con Apaf-1 y la procaspasa-9 y, que en presencia de ATP activa la caspasa-9, la cual a su vez activa a la caspasa-3 (Fig. 2).

APOPTOSIS



NECROSIS

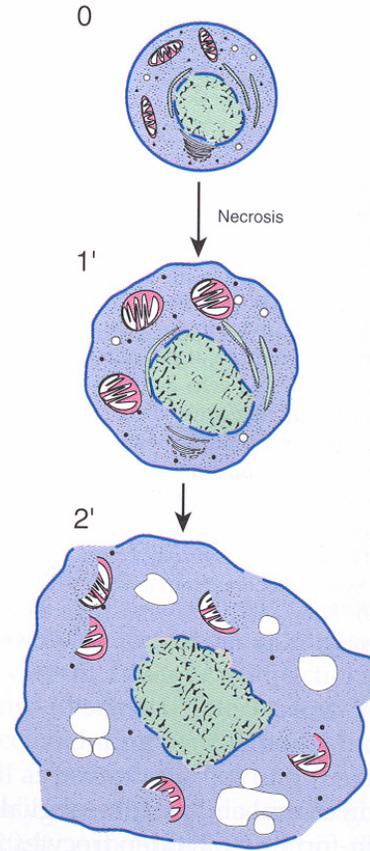


Fig. 1. Diferencias morfológicas entre la muerte celular apoptótica y la muerte necrótica. En la muerte apoptótica, ocurren cambios en el núcleo, en los organelos y en las membranas que llevan a la formación de los cuerpos apoptóticos. En la muerte necrótica hay lesión y vaciamiento del contenido celular.

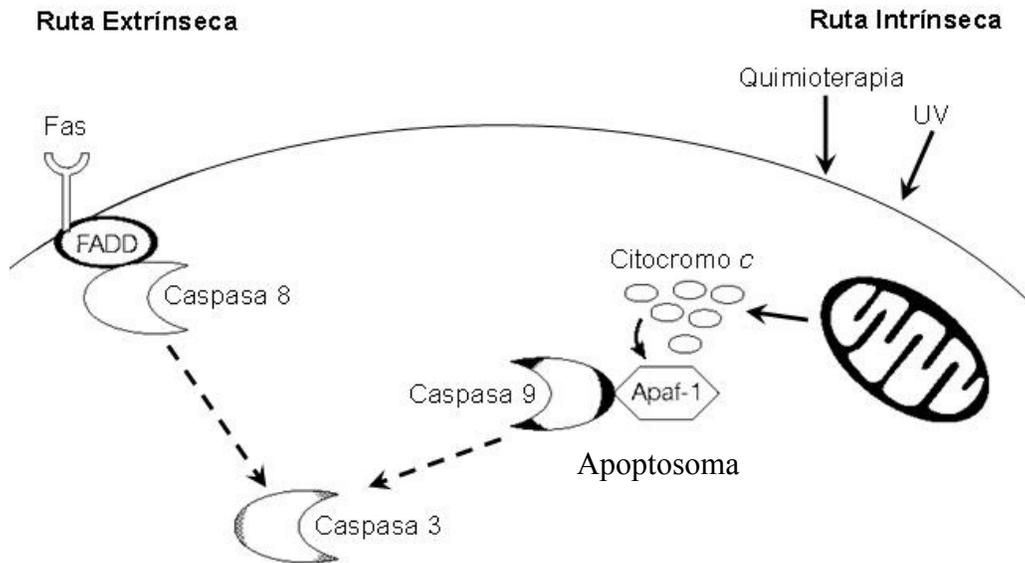


Fig. 2. Rutas de muerte apoptótica. Ruta extrínseca: el ligando (Fas) se une a su receptor (FADD), se recluta y se activa la caspasa 8, la cual activa directamente a la caspasa 3. Ruta intrínseca: se libera el citocromo c de la mitocondria, se une Apaf-1 y caspasa 9 formando el apoptosoma, que en presencia de ATP activa la caspasa 9 y subsecuentemente la caspasa-3. FADD, proteína con dominio de muerte asociada a Fas; UV, luz ultravioleta; (Modificado de Salvesen y Duckett, 2002).

1.2. Caspasas

Las caspasas forman parte de la maquinaria bioquímica que participa tanto en la parte iniciadora como en la ejecutora de la muerte apoptótica. Hasta ahora se han identificado 14 caspasas en mamíferos, de las cuales las caspasas 2, 3, 6, 8, 9, 10 se han relacionado a la apoptosis. Las caspasas se expresan como proenzimas (30-50 KDa) que contienen tres dominios: un dominio amino terminal (predominio), una subunidad grande (~20 KDa) y una pequeña (~10KDa), ambas catalíticas (Fig. 3). De acuerdo a su participación en la cascada proteolítica, las caspasas involucradas en la apoptosis se clasifican en dos grupos: caspasas iniciadoras (como las caspasa-8 y -9) y caspasas efectoras (como las caspasas-3 y -7). Las caspasas iniciadoras contienen un predominio amino-terminal mayor a 90 residuos de aminoácidos mientras que el predominio de las caspasas efectora es de 20-30 residuos de aminoácidos (Shi *et al.*, 2004).

La activación involucra el procesamiento proteolítico entre los dominios con sitios de corte específicos de aspartato, seguido de la asociación de las subunidades pequeña y grande para formar un heterodímero. Dos heterodímeros se asocian para formar un

tetrámero funcional que tiene dos sitios catalíticos que parecen funcionar independientemente (Thornberry *et al.*, 1992; Walker, 1994).

La activación de las caspasas puede ocurrir por la acción proteolítica de la misma caspasa o de una diferente, debido a que comparten la secuencia que incluye al residuo de aspártico

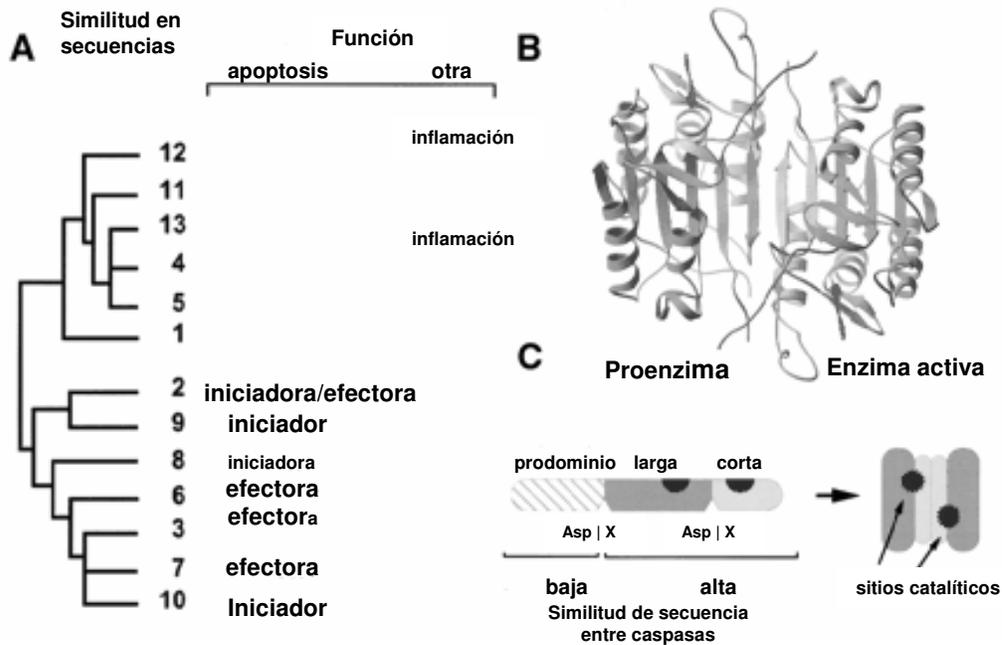


Fig. 3 Clasificación y estructura general de las caspasas. **A.** Algunas de las principales caspasas conocidas y su función, así como la similitud entre ellas de acuerdo a su secuencia. **B.** Modelo de α hélices y hoja β plegada de una caspasa activa. **C.** Estructura de una procaspasa con las tres subunidades o dominios, el prodominio o dominio de muerte, el dominio pequeño y el dominio largo. Las zonas con puntos negros indican los residuos de cisteína, que es el sitio catalítico de las caspasas. (Thornberry *et al.*, 1998).

En el caso de las caspasas iniciadoras, como la caspasa-8, se sugiere que ocurre una autoactivación debido a que las procaspasas tienen una actividad catalítica basal muy baja. La actividad basal es suficiente para activarlas cuando éstas se aproximan por acción de ciertas proteínas adaptadoras (Salvesen *et al.*, 1999). Otras caspasas iniciadoras, como la caspasa-9, pueden activarse por la formación de complejos que promueven su activación (Hengartner, 2000) (Fig. 4). Las proteínas efectoras se activan por un procesamiento directo de las caspasas iniciadoras y actúan en diferentes sustratos

como la poli-ADP-ribosa polimerasa (PARP), láminas de la envoltura nuclear y U1-70 KDa (ribonucleoproteína nuclear pequeña), entre otros.

1.3. Otros factores y proteínas involucrados en el control de la apoptosis.

Las proteínas pertenecientes a la familia de Bcl-2 constituyen un grupo de proteínas asociadas a la mitocondria e involucradas en la apoptosis. Estas moléculas pueden tener una participación proapoptótica, como en el caso de Bax, Bid y Bak o antiapoptótica como el Bcl-2 y Bcl-x_L (Hu *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1999; Nuydens *et al.*, 2000; Hengartner, 2000).

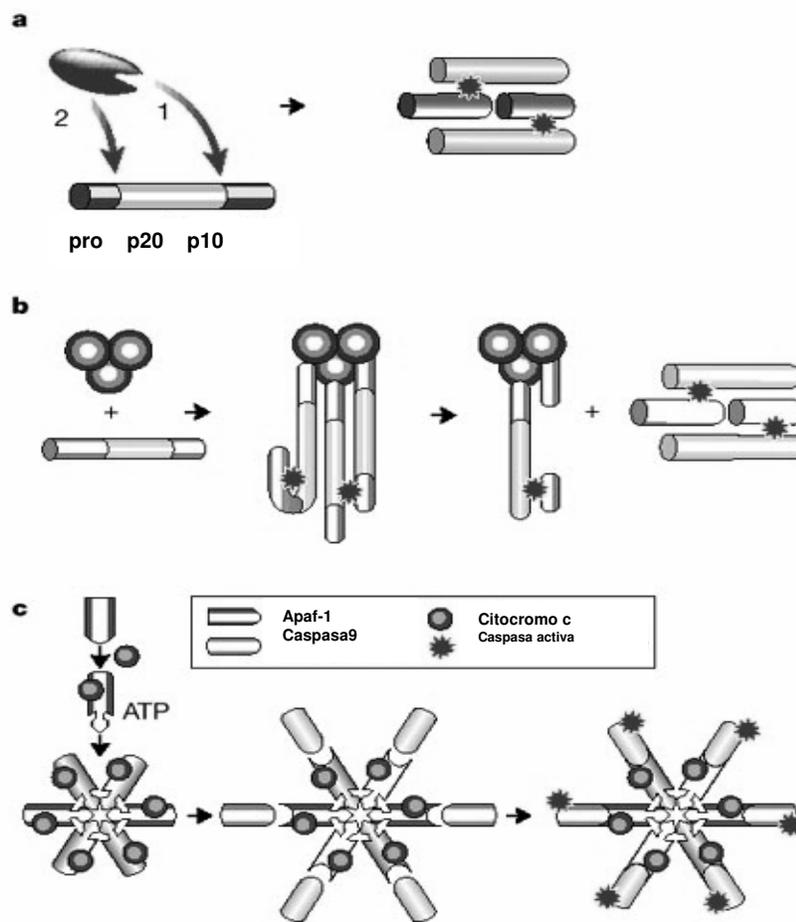


Fig. 4. Activación de caspasas. a) Activación por la fragmentación proteolítica efectuada por otra proteasa. Este mecanismo es el más común para la activación de caspasas efectoras por otra caspasa. b) Activación por proximidad, el reclutamiento de varias moléculas de procaspasa-8 en gran proximidad resulta en su activación. c) Formación de apoptosoma (Hengartner, 2000).

Existen otras moléculas antiapoptóticas como es el caso de las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP). Esta familia de proteínas comprende una gran variedad de moléculas con un alto grado de conservación en su estructura primaria. Se han descrito proteínas en virus (CIAP, OpiAP, CpiAP, AciAP, ASFIAP), en mamíferos (XIAP, cIAP1, cIAP2, NAIP, BRUCE, Survivina, pIAP), en insectos (DIAP1, DIAP2), en nemátodos (CeIAP1, CeIAP2) y en levaduras (SpiAP, AciAP), las cuales parecen estar involucradas en la inhibición de la apoptosis (Deveraux *et al.*, 1999; Hengartner, 2000; Lockshin *et al.*, 2000).

Por su parte, la actividad antiapoptótica de las IAPs es inhibida por una familia de proteínas que contienen un motivo tetrapéptido que une a IAP (IBM, *IAP-binding motif*) (Shi, 2002a; Nachmias *et al.*, 2004; Shi, 2004). Un miembro de dicha familia es Smac/DIABLO (Du *et al.*, 2000; Verhagen *et al.*, 2000). Smac se sintetiza en el citoplasma y se transporta al espacio intermembranal de la mitocondria (Nachmias *et al.*, 2004; Shi, 2004). Cuando se presenta un estímulo apoptótico, se libera al citoplasma e interactúa con IAPs múltiples eliminando la inhibición de caspasas iniciadoras y efectoras mediada por IAPs (Chai *et al.*, 2000; Nachmias *et al.*, 2004; Shi, 2004).

Mecanismos moleculares de la muerte apoptótica

Una de las señales fundamentales para el desarrollo de la muerte apoptótica es el calcio intracelular. Se propone que cuando los niveles de calcio intracelular rebasan o caen por debajo de un umbral, se activa el programa de muerte apoptótica (Chua *et al.*, 2000; Kruman *et al.*, 1999; Overbeeke *et al.*, 1999; Petersén *et al.*, 2000; Sakaguchi *et al.*, 1998). Los cambios en el pH intracelular también pueden desencadenar la muerte apoptótica. En particular, las neuronas son muy sensibles a los cambios en el pH (Ding *et al.*, 2000; Overbeeke *et al.*, 1999).

En los últimos años se ha relacionado una condición prooxidante con la muerte celular necrótica o apoptótica en distintos estados fisiológicos o patológicos (Kroemer *et al.*, 1998; Fiskum *et al.*, 1999; Samali *et al.*, 1999; Nicholls *et al.*, 2000; Valencia y Moran, 2001, 2004). Más recientemente, se ha propuesto incluso que el estrés oxidativo participa como una señal que regula y controla el proceso de muerte apoptótica.

2. Especies de oxígeno reactivas

2.1 Generalidades

Las especies de oxígeno reactivas (EOR) son especies más reactivas que el oxígeno en su estado basal de energía (Halliwell, 1992). Las EOR incluyen radicales

libres, los cuales se definen como una especie molecular o atómica capaz de tener uno o más electrones desapareados en su último orbital molecular (Halliwell, 1989). Dentro de éstos se encuentra el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el radical hidroxiperil ácido (HO_2^{\cdot}), el hidroxilo (OH^{\cdot}), carbonato ($CO_3^{\cdot-}$), peroxilo (RO_2^{\cdot}), y el radical alcoxilo (RO^{\cdot}). Algunas EOR no son radicales libres como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el HOCl, los hidroperóxidos de ácidos grasos, los aldehídos reactivos, el oxígeno en singulete, entre otros (Halliwell, 2002).

Las EOR pueden causar daños al ADN, las membranas biológicas y las proteínas. Las principales modificaciones que producen las EOR en el ADN son la oxidación de las bases púricas, el entrecruzamiento con proteínas y la fragmentación (Martínez *et al.*, 2003). Entre los lípidos, los ácidos grasos insaturados son el principal blanco de oxidación por EOR. La oxidación de los lípidos membranales afecta las interacciones que estabilizan la integridad de la membrana, alterando su función. Por otro lado, el OH^{\cdot} es el principal causante de modificaciones oxidativas en las proteínas. Puede haber oxidaciones de las cadenas laterales de los aminoácidos o en la cadena polipeptídica principal, lo que conduce a su fragmentación, también produce entrecruzamientos proteína-proteína. Los aminoácidos más sensibles a la oxidación son la cisteína y la metionina (Standtman y Berlett, 1998). Otras EOR como el $O_2^{\cdot-}$ son capaces de inactivar algunas enzimas directamente como la NADH deshidrogenasa de la cadena de transporte de electrones en la mitocondria *in vitro* (Zhang, 1990) y algunas proteínas con centro hierro-azufre.

Los procesos de oxidación causados por a las EOR están relacionadas con diversas patologías, pero también con una variedad de procesos fisiológicos durante la reestructuración celular y el desarrollo de los organismos (Ceballos-Picot, 1997). Así, bajo algunas circunstancias, la producción controlada de algunas EOR como el $O_2^{\cdot-}$ es deseable. Por ejemplo, en la eliminación de bacterias por los fagocitos (Curnutte y Babior, 1987) y en diversos tipos celulares como fibroblastos, linfocitos y células endoteliales vasculares donde se produce un aumento de $O_2^{\cdot-}$ en reacciones fisiológicas (Maly 1990; Meier *et al.*, 1990; Murrell *et al.*, 1990).

El $O_2^{\cdot-}$ también parece estar involucrado en la regulación del crecimiento y la señalización intercelular, como lo sugirieron Halliwell y Gutteridge (1986). Los blancos primarios de este tipo de regulación pueden ser los grupos sulfidrilos (RSH), en los residuos de cisteína, los cuales son fácilmente oxidados. Los oxidantes estimulan

sistemas de señalización celular. Los estímulos extracelulares se transducen a través de una variedad de mecanismos, utilizando moléculas de señalización como proteínas cinasas de tirosinas (PTKs), cinasas de serina/treonina, fosfolipasas, Ca^{2+} , entre otras. Las EOR activan, por ejemplo, PTKs y algunas otras proteínas, en las que se incluyen, proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAP), proteínas cinasas C (PKC), la fosfolipasa C- γ (PLC γ) y el Ca^{2+} en las células (Tabla 1).

Tabla 1. Moléculas de señalización reguladas por oxido-reducción en la célula.

Moléculas de señalización	Efecto de las EOR
1. Proteínas cinasas de tirosina receptor EGF, receptor de insulina, receptor PDGF, Src, Lck, Fyn, ZAP-70, Syk, Lyn, Fgr, Hck, Btk, Ltk	Activación
2. Proteínas fosfatasa de tirosina Los residuos de cisteína reducidos son esenciales.	Inactivación
3. Proteínas cinasas de serina/treonina MAP cinasa, JNK, p38, BMK1, Akt, S6 cinasa, PKC	Activación
4. Proteína fosfatasa de serina/treonina PP1, PP2A, calcineurina	Inactivación
5. Proteína G pequeña Ras	Activación
6. Señalización lipídica PLC, PLD, PLA2, cinasa PI-3	Activación
7. Señal de Ca^{2+} Receptor de rianodina, receptor de Ins(1,4,5)P3, ATPasa de Ca^{2+}	Activación
8. Factores de transcripción AP-1 (c-Fos, c-Jun), NFkB (p50), Rel, USF, TTF-1, GR, BPV1E2, NF1, Myb, NF-Y, p53, PEBP2/AML, Oct-2, Egr-1, BZLF1, ATF, CREB, TTF-1, Ku	Inactivación

Abreviaturas: EGF-factor de crecimiento epidermal; PDGF-factor de crecimiento derivado de plaqueta; ZAP- ζ -polipéptido asociado de 70kDA; JNK-cinasa N-terminal c-jun; BMK1-MAP cinasa Big 1; PP-fosfatasa de proteínas; PLD-fosfolipasa D; PLA2-fosfolipasa A2; PI-fosfatidilinositol; Ins(1,4,5)P3-inositol 1,4,5-trifosfato; AP-1- proteína activada 1; USF-factor estimulador río arriba; TTF-1-factor de transcripción tiroideo 1;GR-receptor glucocorticoide; BPV1E2-papiloma virus E2 bovino tipo 1; NF-factor nuclear; PEBP2/AML-polioma virus de leucemia aguda mielógena/ proteína de unión al aumentador; BZLF1-proteína activadora de la transcripción codificada en el virus de Epstein-Barr; GABP-proteína de unión a GA; ATF-factor de transcripción activante; CREB-elemento de unión de respuesta a cAMP.

Las EOR inducen la expresión de muchos genes como c-fos, c-jun, c-myc y un gen de la hemo oxigenasa. Tal expresión puede ser mediada por factores de transcripción en respuesta a la activación de mecanismos de señalización cuesta arriba, activados por las EOR. De hecho, el tratamiento de las células con H₂O₂ induce la activación de factores de transcripción como la proteína activadora 1 (AP-1) y el factor nuclear κB (NF κB) en algunos tipos celulares. Incluso, se ha observado que muchos factores de transcripción son directamente inhibidos por las EOR.

2.2 Especies de oxígeno reactivas y apoptosis neuronal.

Existen evidencias que sugieren que la tensión oxidativa participa activamente en la muerte apoptótica neuronal. Esto ocurre particularmente en algunas patologías del sistema nervioso (Atabay *et al.*, 1996; Kowaltowski *et al.*, 1999; Kroemer *et al.*, 1998; Nicholls y Budd, 2000; Sakaguchi *et al.*, 1998; Samali *et al.*, 1999), así como en la muerte programada neuronal que ocurre durante el desarrollo del cerebro (Schulz *et al.*, 1996; Valencia y Morán, 2001).

Para diversos modelos experimentales se ha sugerido que el H₂O₂ induce la muerte apoptótica, ya sea activando o no las caspasas (Sakaguchi *et al.*, 1998). El O₂⁻ se ha relacionado con la muerte apoptótica neuronal y con la activación de la vía de señalización a través del receptor Fas (Greenlund *et al.*, 1995). También el oxígeno singulete (¹O₂) se ha asociado con los procesos de estrés oxidativo y de daño celular en varios modelos, tanto neuronales como en otros tipos celulares (Chan *et al.*, 2000; Manev *et al.*, 1995; Moreno *et al.*, 2001; Salet *et al.*, 1997; Zhuang *et al.*, 1998).

Se ha propuesto que la tensión oxidativa podría servir como una señal durante el proceso de la muerte, mientras que en otros casos puede servir como un proceso ejecutor de la muerte.

2.3 Eliminación de las especies de oxígeno reactivas

El estado oxidativo en una célula es el resultado del balance entre la producción y la eliminación de las EOR, existen dos tipos de antioxidantes de acuerdo a la forma de eliminar las EOR, los enzimáticos y los no enzimáticos. Dentro del primer grupo se encuentran enzimas como las distintas isoformas de la superóxido dismutasa (CuZnSOD, ECSOD y MnSOD) que convierte el O₂⁻ en H₂O₂; otras como la catalasa o la glutatión peroxidasa transforman el H₂O₂ en agua (Ceballos-Picot, 1997; Halliwell, 1992). En el segundo grupo de antioxidantes se incluyen proteínas del plasma, así como lípidos solubles como el α-tocoferol (forma predominante de la vitamina E) (Chow, 2001;

Ricciarelli, *et al.*, 2001), β -caroteno, flavonoides, melatonina (Gupta *et al.*, 2003; Reiter *et al.*, 2003) y el ácido ascórbico soluble en agua (Kojo, 2004), así como el glutatión (GSH), el cual es el mayor reductor encontrado en todas las células eucariontes, y el ácido úrico (Hlliwel y Gutteridge, 2002), entre otros. Algunas de estas moléculas, como el tocoferol, se localizan en las membranas celulares, evitando reacciones oxidativas en los lípidos y proteínas membranales; otros antioxidantes como el ácido ascórbico, el ácido úrico y el glutatión se distribuyen en el citoplasma (Fig. 5).

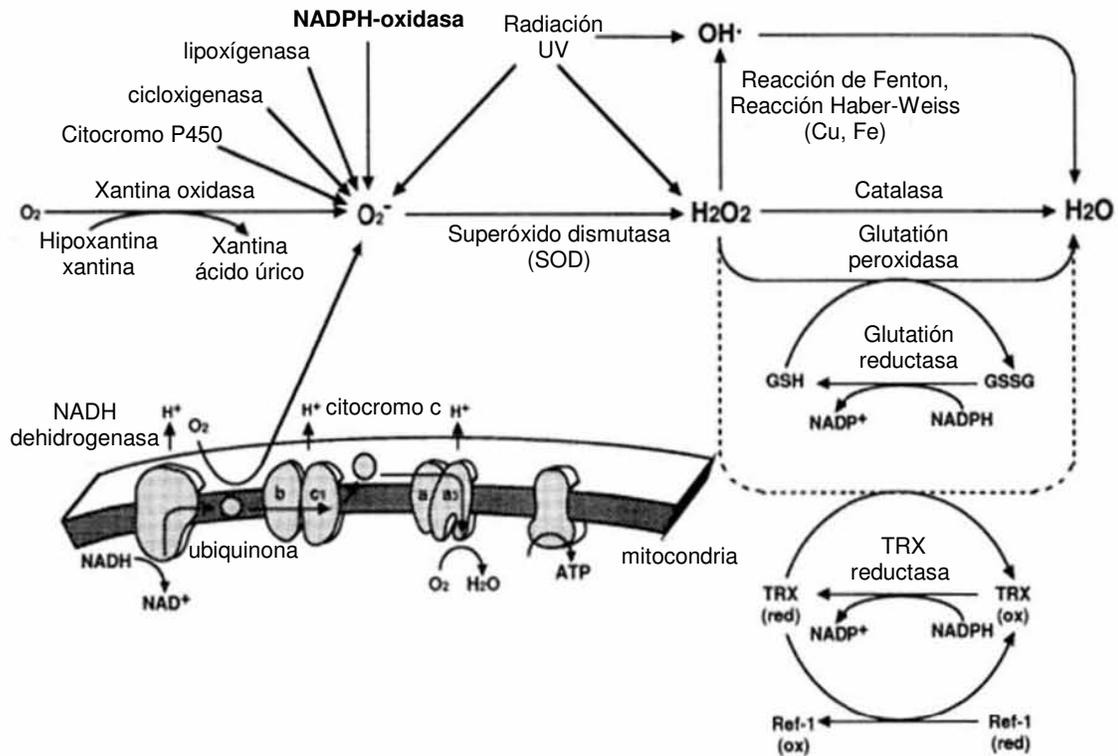


Fig. 5. Producción y eliminación de especies de oxígeno reactivas. El H_2O_2 , el $\text{O}_2^{\cdot-}$ y OH^{\cdot} son generados en la célula por diversas vías. $\text{O}_2^{\cdot-}$ es generado por la pérdida de electrones de la mitocondria, es también generado por la citocromo NADPH P450 reductasa, la hipoxantina/xantina oxidasa, la NADPH oxidasa, la lipoxigenasa y la ciclooxigenasa. Superóxido dismutasa (SOD) convierte el $\text{O}_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 , después el H_2O_2 es degradado a H_2O por la glutatión (GSH) peroxidasa y catalasa. La teorredoxina (TRX) reduce el H_2O_2 . El H_2O_2 produce OH^{\cdot} mediante la reacción de Fenton o Haber Weiss. Las EOR también son generadas por la radiación ionizante (Kamata y Hirata, 1999).

2.4. Fuentes de especies de oxígeno reactivas

El metabolismo energético celular está basado en la producción de ATP, a través de la cadena de transporte de electrones, en la cual el O_2 acepta electrones y H^+ . La

pérdida de un electrón que es transferido al O_2 , produce $O_2^{\cdot-}$. La cadena de transporte de electrones es muy eficiente, normalmente la mayoría del O_2 es consumido y sólo un 1-2% de los electrones se pierden y generan $O_2^{\cdot-}$ mediante el complejo I y II (Halliwell, 1992; Du *et al.*, 1998; Irani *et al.*, 1998; Kowaltowski *et al.*, 1999).

En la membrana del retículo endoplásmico, los electrones pueden escapar del citocromo P450 dependiente de NADPH y reducir al oxígeno para producir EOR. El citocromo P450 es una hemoproteína vinculada a la generación de EOR durante la oxidación de los ácidos grasos insaturados y la bioactivación de xenobióticos como la talidomida o la fenitoína (Sauer *et al.*, 2001). El $O_2^{\cdot-}$ es también generado por la xantina deshidrogenasa que es una flavoproteína citosólica con cuatro centros Fe-S y un átomo de Mb que cataboliza la xantina en hipoxantina y luego en ácido úrico, durante la degradación de las purinas (Lehninger *et al.*, 2000). En algunas ocasiones, se pueden producir modificaciones en la proteína que la convierten en una oxidasa que puede formar $O_2^{\cdot-}$ a partir del O_2 (Enroth *et al.*, 2002).

Otra fuente del $O_2^{\cdot-}$ es la lipoxigenasa o ciclooxigenasa. La síntesis del óxido nítrico también induce de manera secundaria la formación de $O_2^{\cdot-}$. El H_2O_2 y $O_2^{\cdot-}$ en presencia de Fe o Cu mediante la reacción de Fenton o Haber-Weiss son convertidas rápidamente a OH^{\cdot} , el cual es altamente reactivo, e induce serios daños oxidativos. Los EOR también son generados por los rayos y la luz ultravioleta (UV).

Una de las fuentes de anión superóxido recientemente descrita en el sistema nervioso es la enzima NADPH-oxidasa. Esta enzima es responsable de transferir electrones del NADPH al dióxígeno para producir dicho anión. La enzima se ha caracterizado en células del sistema inmune y recientemente se identificó en células de otros tejidos. En un estudio previo se demostró la presencia de NADPH-oxidasa en neuronas periféricas en cultivo y se le asoció a la muerte neuronal apoptótica inducida por la privación del factor del crecimiento nervioso (Tamariello *et al.*, 2000). Hasta ahora se desconoce el mecanismo por el cual la NADPH-oxidasa se activa en estas células.

La enzima NADH-oxidasa es otra fuente importante de $O_2^{\cdot-}$, la cual también se ha encontrado presente en el sistema nervioso, particularmente en las NGC (Martín-Romero *et al.*, 2002), esta enzima se puede diferenciar de la NADPH-oxidasa debido a sus características particulares (Tabla 2).

Tabla 2. Características diferenciales de la NADPH- oxidasa y la NADH-oxidasa.

	NADPH-oxidasa	NADH-oxidasa
Localización celular	Intramembranal	Superficie de la membrana plasmática
Actividad	Produce O ₂ ⁻	Produce O ₂ ⁻ y tiene actividad de isomerasa disulfuro, proporciona resistencia a las proteasas
Activación	Requiere de proteínas ancilares para su activación, responde a factores de crecimiento.	No requiere de proteínas ancilares para su activación, responde a hormonas, factores de crecimiento y particularmente a la 8-metil-N-vanilil-6-noneamida (capsaicina)
Composición	Es una flavoproteína, contiene grupos hemo	No es una flavoproteína, no contiene grupos hemo,
Sustrato preferencial	NADPH, O ₂	Hidroquinonas de la membrana plasmática tal como la coenzima Q ₁₀ , preferentemente NADH, O ₂

Kelker *et al.*, 2001, Kishi *et al.*, 1999

3. NADPH-oxidasa

3.1 Generalidades

La NADPH oxidasa es una enzima membranal que cataliza la producción de grandes cantidades de superóxido (O₂⁻) a través de la reducción del oxígeno, durante la llamada “descarga oxidativa” en células fagocíticas como los macrófagos, los neutrófilos y los eosinófilos (Dinauer *et al.*, 2005). El O₂⁻ es producido por la reducción monovalente del oxígeno empleando los electrones del NADPH, en la reacción:



La NADPH oxidasa es una enzima multimérica compuesta por las subunidades membranales gp91phox y p22phox, que juntos forman el flavocitocromo b₅₅₈, y por tres proteínas citosólicas: p67phox, p47phox, p40phox y la GTPasa Rac (Fig. 6).

Flavocitocromo b558

Este es el componente membranal de la NADPH-oxidasa. Está compuesto de una proteína glucosilada (gp91phox) y una no glucosilada (p22phox) en un complejo 1:1, es conocido como citocromo b558 por su espectro de absorción a 558 nm, y como citocromo b-245 por su potencial de oxidoreducción que es de -245V.

La subunidad catalítica gp91phox es un flavocitocromo muy glucosilado de 570 aminoácidos, contiene sitios de unión de FAD y NADPH y dos grupos hemo no idénticos, coordinados por dos pares de residuos de histidina (Babior, 2004; Biberstine-Kinkade *et al.*, 2001). Se ha propuesto que el flujo de electrones se mueve desde el NADPH al FAD, luego pasa a los grupos hemo, hasta llegar al aceptor final que es el O₂.

p47phox

Es una proteína compuesta de 390 amino ácidos, su secuencia COOH-terminal es muy básica y rica en residuos de serina y de arginina. La secuencia de aminoácidos de p47 phox también contiene dos dominios SH3, un dominio PX, y por lo menos una región rica en residuos de prolina, p47 phox se une al citocromo b558 durante su activación. La p47 phox es la subunidad responsable de transportar el complejo citosólico (p47phox-p67phox-p40phox) del citosol a la membrana plasmática durante la activación de la oxidasa. Es la organizadora de las subunidades de la NADPH-oxidasa, este proceso no ocurre *in vivo* sin una extensa fosforilación de p47phox.

p67phox

Es una proteína de 526 amino ácidos, también contiene dos dominios SH3, cuatro regiones TPR (péptido repetido tetrárico), al menos una región rica en prolina. La p67 phox se asocia débilmente con el citoesqueleto, y es fosforilada durante la activación de la enzima, pero en menor grado que p47phox. p47 phox interactúa con rac 1/2 y con el citocromo b558 y puede regular su actividad catalítica mediante una secuencia llamada dominio de activación.

p40 phox

Es una proteína de 339 residuos de aminoácidos, la cual fue inicialmente identificada a través de su unión con p67 phox. Ésta contiene un dominio SH3 y un dominio PX, y es débilmente fosforilada durante su activación. La subunidad p40 phox no es requerido para la activación de la NADPH-oxidasa en un sistema de células libre, su función *in vivo* es controversial.

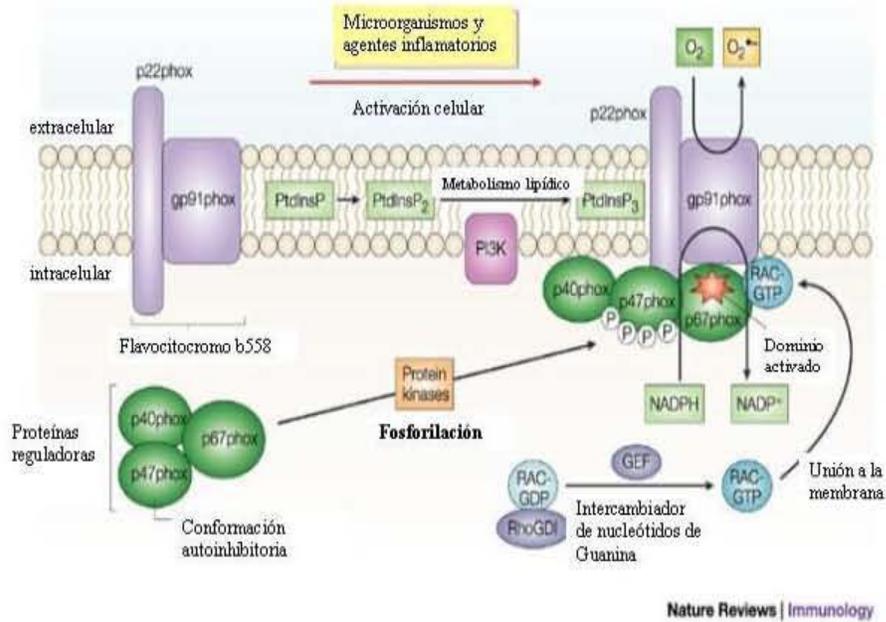


Fig. 6. Modelo de la estructura de la NADPH-oxidasa fagocítica y de su activación. La activación de gp91phox ocurre cuando al menos tres señales se llevan a cabo, lo que produce el ensamblaje de las proteínas reguladoras con el flavocitocromo b558, estas señales son la fosforilación de p47phox, el metabolismo lipídico el cual provee de lípidos a los cuales p47phox y p40phox tienen sitio de unión, así como la translocación de Rac a la membrana y su unión con p67phox para formar el complejo activo (Lambeth, 2004).

Rac

En los neutrófilos humanos, p21-rac2 es la proteína tipo rac más abundante, pero p21-rac1 (92% homóloga con Rac2) está también presente. Como citocromo b558, p47phox y p67phox, Rac es esencial para la activación óptima en un sistema de células libres y en neutrófilos intactos.

3.2 Activación de la NADPH oxidasa

En el estado basal, las subunidades p67phox, p47phox y p40phox se encuentran como un complejo preensamblado en el citosol. Después de la activación, estas subunidades se traslocan a la membrana, para lo cual la subunidad p47phox es fosforilada en múltiples

residuos de serina (Hoyal *et al.*, 2003), lo que elimina la conformación auto inhibida de p47phox y se expone un dominio SH3 en el extremo amino que puede interactuar con el dominio rico en residuos de prolina de p22phox. La subunidad p47phox fosforilada puede unir fosfoinosítidos, lo que también contribuye a su estabilización en la membrana (Ago *et al.*, 2003). La GTPasa Rac se recluta a la membrana de manera independiente del resto de las subunidades (Babior, 2004) para activar a la NADPH-oxidasa (Fig. 5).

Activación en células libres

La NADPH-oxidasa puede ser activada *in vitro* en preparaciones con contenido citosólico y membrana plasmática de los neutrófilos (o las correspondientes proteínas) en presencia de Mg^{2+} , guanósín trifosfato (GTP), y un activante aniónico anfifílico tal como el araquidonato o el dodecil sulfato de sodio, los cuales mimetizan la fosforilación, dando cargas negativas. Este sistema puede también ser activado por proteína cinasa C (PKC) en lugar de los agentes anfifílicos aniónicos.

Activación en fagocitos intactos.

La NADPH-oxidasa puede ser activada mediante un mecanismo dependiente de receptor, así como por uno independiente de receptor. La activación en fagocitos puede ser inducida por factores como partículas de látex, fragmentos del complemento C5a, zymosan opsonizado, péptidos formulados tales como: N-formil-metiona-leucina-fenilalanina (fMLP), leucotrieno B4 (LTB4), factor activador de plaquetas (PAF); diacilglicerol (DAG), ionóforos de calcio (ionomicina, A23187), y activadores de PKC, tales como el acetato miristato forbol (PMA). Los lipopolisacáridos (LPS) de bacterias gram negativo inducen la producción de EOR en monocitos. Otros agentes, tales como la angiotensina II, la principal hormona del sistema renina-angiotensina, estimula la NADPH en neutrófilos.

En condiciones fisiológicas, la descarga oxidativa es promovida por estímulos en receptores específicos tal como fMLP o C5a. El receptor transmite la información a través de la membrana citoplasmática mediante una familia de proteínas G heterotriméricas (proteínas de unión GTP). Las proteínas G después activan enzimas membranales tal como fosfolipasa C (PLC), fosfolipasa A2 (PLA₂), y fosfolipasa D (PLD), provocando un aumento de mensajeros intracelulares. Por ejemplo, la PLC hidroliza lípidos de la membrana, fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (P1P2), en DAG e inositol trifosfato (IP3). El IP3 está involucrado en el aumento de calcio de las pozas intracelulares, mientras que DAG activa la familia de PKC. La activación de PLD produce ácido fosfatídico de

fosfatidilcolina. La activación de PLA2 lleva a la producción de ácido araquidónico, el cual puede ser usado como sustrato para la síntesis de leucotrienos y prostaglandinas. La activación de neutrófilos se acompaña de la activación de muchas proteínas cinasas, tales como proteínas cinasa de tirosina, PKA, PKC y MAP-cinasas, las cuales fosforilan proteínas con importante función celular, como pueden ser los componentes citosólicos de la NADPH-oxidasa.

La p47 phox es una proteína muy básica que en condiciones basales no está fosforilada, y durante la estimulación de los neutrófilos es fosforilada. Cuando las células son activadas con PMA o FMLP se fosforilan de 8-9 sitios de la p47 phox. La primera fosforilación lleva a subsecuentes fosforilaciones en el citosol y en la membrana. La p47 es fosforilada en múltiples sitios en el carboxilo terminal de la proteína, incluyendo los residuos de serina 303 a 379. Mutaciones individuales en cada serina de p47 phox mostraron que solo la serina 379 fue importante para la activación de la oxidasa. Las mutaciones dobles mostraron que dos pares de residuos de serina fosforiladas, serina (303+304) y serinas (359+360) son necesarias para la activación de la NADPH-oxidasa. En neutrófilos humanos, varias proteínas cinasas se han implicado en la regulación de la actividad de la NADPH-oxidasa, dentro de las cuales la familia de PKC parece ser la más importante en la activación mediada por FMLP y PMA.

Otras proteínas de la oxidasa, como p67 phox, p40 phox y p22 phox, son también fosforiladas en neutrófilos humanos. La p67 phox es fosforilada en residuos de serina y treonina por mecanismos dependientes o independientes de PKC. La ERK1/2 puede aumentar la fosforilación de p67 phox en sitios específicos. Una vez que p67 es fosforilado en la treonina 233, p40 es fosforilada en la serina 315 y en la treonina 154 por un mecanismo independiente de PKC. p22 es fosforilado en residuos de treonina por una cinasa activada por ácido fosfático y PKC.

Muchos reportes indican que la fosforilación de p47 phox induce cambios conformacionales, lo cual inicia el ensamblaje de la enzima mediante la activación de los dominios SH3 con las regiones ricas en prolina de p22phox. De hecho, p47 phox contiene dos dominios SH3, uno de los cuales interactúa intramolecularmente con la secuencia de poliprolinas de la misma p47 phox en la proteína no fosforilada. La interacción de p47phox se da con la secuencia de poliprolinas de p22 phox cuando la p47 phox es activada por fosforilación, p47 y p40 phox contienen dominios PX (cerca de 125 aa) que une fosfoinosítidos y puede ayudar al ensamblaje de la oxidasa.

3.3. Inactivación de la NADPH-oxidasa.

El PMA, el FMLP y la C5a, inducen una activación corta de la NADPH-oxidasa. La inactivación rápida puede deberse a la fosforilación de un o mas residuos de serina o a la desfosforilación de p47phox. Se ha sugerido a la fosfatasa 1 de proteínas (PP1) y la fosfatasa 2A (PP2A) como ejecutoras de una desfosforilación rápida. Un posible mecanismo de inhibición de la NADPH-oxidasa es el antagonismo entre las proteínas pequeñas G rac y cdc42.

La identificación de las cinasas y fosfatasas involucradas en la regulación de la NADPH-oxidasa y sus mecanismos, podrían ser útiles para conocer mas del mecanismo de activación y del ensamblaje de la oxidasa y además servir como un nuevo agente terapéutico.

3.4. Inhibidores de la NADPH-oxidasa.

Se han descrito diversas moléculas biológicas endógenas las cuales inhiben la actividad de la NADPH o su activación entre las que destacan el óxido nítrico, esteroides, adrenalina, IL-10 e IL-4. Algunos inhibidores exógenos son conocidos, y el mas usado es el DPI, el cual inhibe el transporte de electrones por gp91phox. La apocinina es una molécula natural que inhibe a la NADPH-oxidasa. Otras moléculas, tales como el 4-(2-aminoetil)-bencelsulfonil fluorado (AEBSF), y el N- α -tosil clorometil fenilalanina cetona, inhiben a la NADPH-oxidasa, evitando el ensamblaje del complejo enzimático

3.5. La NADPH-oxidasa no fagocítica y la familia NOX.

La producción de EOR por varias células no fagocíticas se ha detectado desde hace algunos años, recientemente se han identificado las siguientes enzimas homólogas a gp91phox: NOX1, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 y DUOX2 (Cheng *et al.*, 2001; Lambeth *et al.*, 2000). Las EOR producidas por estas enzimas están vinculadas a diversos procesos fisiológicos, probablemente requiriendo que el O_2^- producido por ellas dismute a H_2O_2 , que tiene mayor capacidad de difusión en los tejidos. Por otro lado, la producción desregulada de EOR por las NADPH -oxidasa se ha propuesto que participa en procesos patológicos como la hipertensión, la aterosclerosis, la diabetes y algunas enfermedades neurodegenerativas (Cai *et al.*, 2003; Harrison *et al.*, 2003; Shimohama *et al.*, 2000; Zekry *et al.*, 2003). Se ha encontrado que la NOX1, la NOX3, la NOX4 y la NOX5 (Cheng *et al.*, 2001; Lambeth *et al.*, 2000) están estructuralmente muy relacionadas con gp91phox

(NOX2), pero funcionalmente tienen unas deficiencias; (i) la NADPH de células no fagocíticas parece generar bajos niveles de superóxido, incluso en células no estimuladas, (ii) aunque su actividad puede estar desregulada en algunas condiciones patológicas, la producción de superóxido es mucho menor que en neutrófilos activados, (iii) una proporción importante del superóxido que se genera es intracelular, mientras que en los neutrófilos activados se considera que el O_2^- se genera en el compartimento extracelular (Li y Shah, 2003).

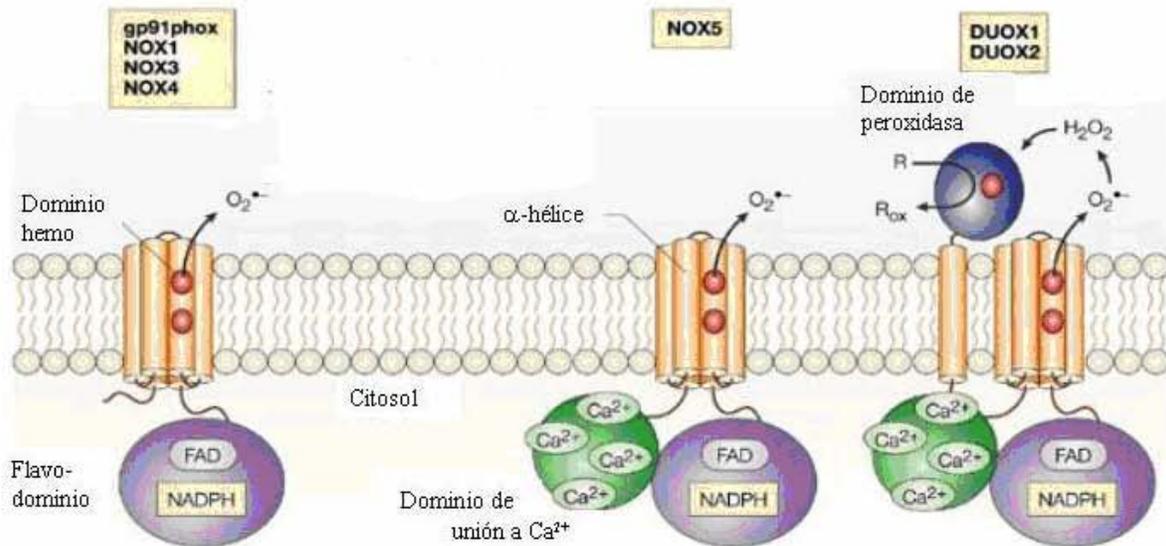


Fig. 7 Estructura de los homólogos de la gp91phox (NOX2). NOX1, NOX3 y NOX4 son las más parecidas tanto en tamaño como en estructura de los dominios a gp91phox (NOX2). NOX5 tiene la misma estructura catalítica que NOX2, pero tiene además un dominio de unión a Ca^{2+} . DUOX1 y DUOX2 tienen la misma estructura que NOX5 más una α -hélice seguida de un dominio homólogo a peroxidasa (Lambeth, 2004).

Con respecto a la regulación de estas nuevas isoformas de NOX, la NOX5 se regula por la elevación del calcio intracelular; la NOX1, la NOX3 y la NOX4 podrían estar reguladas por p67phox y p47phox u homólogos de los mismos (Takeya *et al.*, 2003).

La NOX1, también conocida como Mox1, fue el primer homólogo de gp91phox que se identificó, y se designó como oxidasa mitogénica 1 debido a su función reguladora en el crecimiento y transformación de fibroblastos. Es una proteína idéntica 56% a gp91phox (Suh *et al.*, 1999), la cual tiene 564 aminoácidos; se expresa fundamentalmente en el colon, aunque en menor grado en la próstata, el útero y el músculo liso vascular (Banfi *et al.*, 2003).

El ADNc de la NOX3 codifica para una proteína idéntica 55% a gp91phox (Cheng *et al.*, 2001). La expresión del ARNm de NOX3 es baja y se ha encontrado principalmente

en la placenta y en el tejido fetal de riñón, hígado, pulmón y bazo, por lo que se supone podría tener algún papel en el desarrollo. Se ha encontrado que diferentes mutaciones en NOX3 son responsables de los defectos en el sistema vestibular de un grupo de ratones. Estos ratones mutantes presentan trastornos motores, de coordinación, orientación y comportamiento. Lo anterior, evidencia un grado de especialización de esta NOX y de la importancia de las EOR que ella produce (Paffenholz *et al.*, 2004).

La clonación de otro homólogo de gp91phox en el riñón originalmente se nombró Renox, pero ahora es conocida como NOX4. La NOX4 es una proteína de 758 aa y tiene un 39% de identidad con gp91phox. Se ha encontrado NOX4 en la corteza y en el túbulo renal proximal tanto de ratones como de humanos, y se sugiere una posible función en la detección del oxígeno o en la regulación del crecimiento celular en el riñón. También se ha demostrado que la NOX4 es responsable de la producción de O_2^- en osteoclastos, participando en el proceso de reabsorción ósea (Yang *et al.*, 2001). El homólogo NOX4 se expresa abundantemente en adipocitos (Mahadev *et al.*, 2004). Recientemente se encontró su expresión en astrocitos de rata (Abramov *et al.*, 2005), y en la corteza y en el hipocampo de ratón (Vallet *et al.*, 2005).

La NOX5 es un homólogo distante de la familia NOX (Banfi *et al.*, 2001), que presenta solamente un 27% de identidad con gp91phox. Está compuesta por 737 aminoácidos y contiene una extensión en el amino terminal con cuatro sitios de unión a calcio: tres dominios EF y un cuarto sitio atípico (Banfi *et al.*, 2004). La NOX5 se expresa en órganos linfoides y testículos, pero con dos variantes de “splicing” que dan lugar a las isoformas α y β , respectivamente. En líneas celulares transfectadas con NOX5 se encontró que la generación de superóxido es dependiente de calcio y que esta enzima también es capaz de actuar como canal de protones. El calcio produce un cambio conformacional en NOX5 a través de una interacción intramolecular que activa a la proteína (Banfi *et al.*, 2004).

DUOX1 y DUOX2 tienen una extensión del N-terminal, el cual tiene dos dominios EF y un dominio adicional transmembranal y un dominio de homología a peroxidasa, debido a su dominio EF son activadas por calcio. Ambas son expresadas en la tiroides, están involucradas en la síntesis de hormona tiroidea (Moreno *et al.*, 2002). DUOX1 también se expresa en epitelio respiratorio y DUOX2 en el epitelio rectal (Geitz *et al.*, 2003).

4. Cultivo de neuronas granulares de cerebelo.

Los cultivos primarios de células granulares de cerebelo han demostrado ser un modelo adecuado para el estudio de la apoptosis en neuronas del SNC debido a su fácil manejo y a la homogeneidad de los tipos celulares presentes. Las células granulares de cerebelo (NGC) son las más abundantes en el cerebelo y una gran proporción de ellas son eliminadas durante la maduración del mismo. Si estas células se cultivan en un medio con 25 mM de KCl las neuronas sobreviven y maduran (Morán y Patel, 1989a).

La promoción de sobrevivencia sólo se observa durante periodos críticos de tiempo, lo que corresponde al tiempo cuando las NGC reciben entradas presinápticas glutamatérgicas de las fibras musgosas durante el desarrollo in vivo. Cuando las CGC son transferidas de un medio con K25 a uno con 5 mM de KCl (K5), las células mueren después de 24-48 h mostrando características apoptóticas (Gallo *et al.*, 1987; Schulz *et al.*, 1996; Morán *et al.*, 1999a). La muerte celular apoptótica inducida por la privación de KCl en las CGC ha sido ampliamente caracterizada. Las concentraciones elevadas de KCl aumentan el flujo de Ca^{2+} y esto incrementa la sobrevivencia. Se ha observado que una reducción en los niveles intracelulares de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) dispara el proceso de muerte. Esta muerte puede ser prevenida al incrementar los niveles intracelulares de Ca^{2+} por medio de la adición de ionóforos de Ca^{2+} o por la activación de receptores ionotrópicos permeables a Ca^{2+} . Por otro lado, se puede inducir la muerte de las NGC que están crónicamente cultivadas en K25 si se les inhibe sus canales de Ca^{2+} voltaje dependientes (Kingsbury y Balázs, 1987; Balázs *et al.*, 1988; Pearson *et al.*, 1992; Morán *et al.*, 1999a).

Otro evento temprano relacionado con este proceso es la producción de EOR a nivel citosólico y mitocondrial. Estos dos eventos críticos están comprometiendo la sobrevivencia celular. Otros eventos característicos después de la producción de ROS son la translocación de la fosfatidilserina y la activación de proteasas de cisteína específicas, específicamente la caspasa 3 (Morán *et al.*, 1999^a; Valencia y Morán, 2001).

RESUMEN

La muerte apoptótica es un proceso activo y ordenado que conduce a la eliminación de células durante eventos *tanto* fisiológicos como patológicos. Un modelo *in vitro* utilizado para conocer los mecanismos involucrados en este proceso es el de las neuronas granulares de cerebelo en cultivo (NGC). Estas neuronas, que se cultivan crónicamente en un medio con 25 mM de KCl (K25), mueren apoptóticamente si se tratan con estaurosporina (ST) o si se transfieren a un medio idéntico pero con 5 mM de KCl (K5). Bajo estas condiciones, se observa una fragmentación y condensación del ADN y una activación de las caspasas 3 y 8, entre otras.

Por otro lado, durante la fase inicial de este proceso se presenta una condición de estrés oxidativo. Tanto la muerte neuronal como los indicadores apoptóticos disminuyen significativamente en presencia de antioxidantes como la superóxido dismutasa. Con el medio K25, la inducción de la formación de anión superóxido y de oxígeno singulete ocasionan la muerte neuronal, con características apoptóticas. Así, se ha sugerido que en este modelo la generación de especies de oxígeno reactivas (EOR) puede funcionar como una señal temprana en el proceso de muerte apoptótica, pero se desconocen los tipos de EOR como las fuentes que las generan. En un modelo de neuronas simpáticas en cultivo, la muerte neuronal apoptótica parece depender del estrés oxidativo generado probablemente por la enzima NADPH-oxidasa (NOX), cuyo producto principal es el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$).

Basados en estos antecedentes, en este trabajo se evaluó el papel de la NOX en la generación de EOR involucradas en la muerte apoptótica de las NGC. Para conocer si la NOX genera una condición prooxidante responsable de la muerte neuronal estudiamos la viabilidad medida como reducción de 3-(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) de las NGC tratadas con ST o transferidas a un medio K5 en presencia de inhibidores de la actividad de la NADPH-oxidasa: el difenilenoyodonio (DPI) y el fluoruro de 4-(2-aminoetil) benceno sulfonil (AEBSF). Bajo estas condiciones, tanto el DPI como el AEBSF evitaron parcial o totalmente la muerte neuronal inducida por K5. El AEBSF inhibió casi totalmente la muerte inducida por ST. Estos resultados coincidieron con la evaluación morfológica de las NGC mantenidas en las mismas condiciones experimentales.

Para evaluar la existencia de una señal oxidante temprana relacionada con la muerte de las NGC, la producción del anión superóxido se detectó utilizando microscopía de fluorescencia y dihidroetidina. A las 4 h del tratamiento con K5 y ST, observándose un

aumento significativo en la producción de dicho anión, particularmente en el caso de K5. Dicho aumento disminuyó con los inhibidores de la NADPH-oxidasa en presencia de ambos inductores apoptóticos.

La actividad de caspasa 3 se midió como marcador apoptótico en las NGC tratadas con K5 y ST en presencia y ausencia de los inhibidores de la NADPH-oxidasa. El AEBSF disminuyó significativamente la activación de dicha proteasa inducida por K5 y ST, y el DPI también redujo la actividad de dicha caspasa inducida por K5.

En condiciones control (K25), la actividad de NADPH-oxidasa fue muy baja en las NGC, mientras que el tratamiento con K5 o ST indujeron un incremento sustancial en la actividad de esta enzima alrededor de las 4 h para el caso de K5 y de 6 h para el tratamiento con ST. En estas condiciones, la activación de la enzima se redujo marcadamente en presencia de AEBSF.

Mediante ensayos de réplica en western y RT-PCR, se detectó la presencia en las NGC de cinco subunidades del complejo enzimático de la NADPH-oxidasa, incluyendo a la subunidad catalítica NOX2. Por otro lado, también se identificó la presencia del ARNm de otros homólogos de la subunidad catalítica, particularmente NOX1 y NOX4.

Estos resultados nos permiten sugerir que una NADPH-oxidasa puede tener un papel crítico en la generación de EOR que están involucradas en la muerte apoptótica de las NGC inducida por K5 o ST.

ANTECEDENTES

Se ha descrito que la muerte neuronal en células granulares del cerebelo en cultivo inducida por la privación de potasio tiene características apoptóticas (Morán *et al.*, 1999; Schulz *et al.*, 1996). Cuando las neuronas granulares se transfieren de un medio con 25 mM de KCl a uno con concentración 5 mM KCl, ocurre una muerte celular de aproximadamente 50% y 80% después de 24 y 48 h, respectivamente (D'Mello *et al.*, 1993; Morán *et al.*, 1999; Schulz *et al.*, 1996).

Se ha demostrado que cuando las células en cultivo son privadas de un estímulo trófico que induce muerte celular se genera una condición prooxidante. Si esta condición se inhibe con antioxidantes, se evita parcialmente la muerte, lo que sugiere la participación de las EOR en este proceso (Atlante *et al.*, 2000; Castilho *et al.*, 1999; Itoh *et al.*, 1999; Schulz *et al.*, 1996).

Se ha propuesto que el anión superóxido participa en la muerte apoptótica de las neuronas en cultivo (Atlante *et al.*, 1998; Martín-Romero *et al.*, 2002; Satoh *et al.*, 1998, Valencia *et al.*, 2004). En condiciones de K25, la inducción de anión superóxido y de oxígeno singulete inducen la muerte neuronal con características apoptóticas (Valencia *et al.*, 2004). Así, se ha sugerido que en este modelo la generación de EOR puede funcionar como una señal temprana en el proceso de muerte apoptótica. Por otro lado, otros trabajos sugieren la participación del peróxido de hidrógeno en esta muerte (Itoh *et al.*, 1999; Schulz *et al.*, 1996), sin que quede claro el papel de cada una de estas EOR.

Recientemente se sugirió que una gran proporción de las EOR formadas durante la privación del potasio en las neuronas en cultivo proviene de la actividad de un complejo enzimático membranal, la NADH-oxidasa dependiente de ascorbato (Martín-Romero *et al.*, 2002). En otro modelo, se ha sugerido también que la privación de factor de crecimiento neural (NGF) de neuronas simpáticas en cultivo induce muerte neuronal apoptótica debido a un estrés oxidativo generado por la NADPH-oxidasa (Tammariello *et al.*, 2000). Otro grupo demostró que la activación de este complejo enzimático en neuronas corticales en cultivo participa activamente en la inducción de la muerte neuronal (Noh *et al.*, 2000). También se ha demostrado la presencia de este complejo en neuronas piramidales del hipocampo y en neuronas de Purkinje cerebelares (Mizuki *et al.*, 1998; Serrano *et al.*, 2003).

En otros estudios se ha propuesto que esta enzima podría ser la fuente del $O_2^{\cdot-}$ requerido para la potenciación de largo plazo (LTP) en el hipocampo (Tejeda-Simon *et al.*,

2005; Knapp y Kann, 2002; Thiels *et al.*, 2000). Esta enzima también parece estar involucrada en procesos de isquemia (Walder *et al.*, 1997; Paravicini *et al.*, 2004) y en enfermedades como el Parkinson y el Alzheimer (Hashimoto *et al.*, 2002; Shimohama *et al.*, 2000).

Recientemente se han identificado varios homólogos de NOX2 en diversos tejidos (Lambeth, 2004). Se ha demostrado la presencia de NOX4 en la corteza y en el hipocampo de ratón y parece estar involucrado en el daño producido por EOR en procesos de isquemia (Vallet *et al.*, 2005).

Basados en estos antecedentes, en este trabajo se evaluará el papel de de la NADPH-oxidasa en la generación de EOR involucradas en la muerte apoptótica de las NGC.

HIPÓTESIS

Las EOR, particularmente el anión superóxido, producido por el complejo enzimático NADPH-oxidasa, participan en la muerte apoptótica de las NGC inducida por K5 y ST como una señal inicial de este proceso.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar el papel de las NOX durante la muerte apoptótica de neuronas granulares de cerebelo de rata.

Objetivos particulares

- Determinar la presencia de las diferentes subunidades no catalíticas de la NOX2.
- Determinar la presencia de diferentes homólogos de NOX en las CGN.
- Estudiar la actividad de NADPH-oxidasa en condiciones basales y en respuesta a estímulos apoptóticos como K5 y ST.
- Medir el efecto de inhibidores de NADPH-oxidasa en la viabilidad de NGC bajo condiciones basales y de muerte apoptótica.
- Medir la generación de EOR mediada por una NADPH-oxidasa en condiciones basales y de muerte apoptótica.
- Estudiar el efecto de inhibidores de la actividad de NADPH-oxidasa en algunos parámetros apoptóticos como activación de caspasa 3 en NGC bajo condiciones apoptóticas.

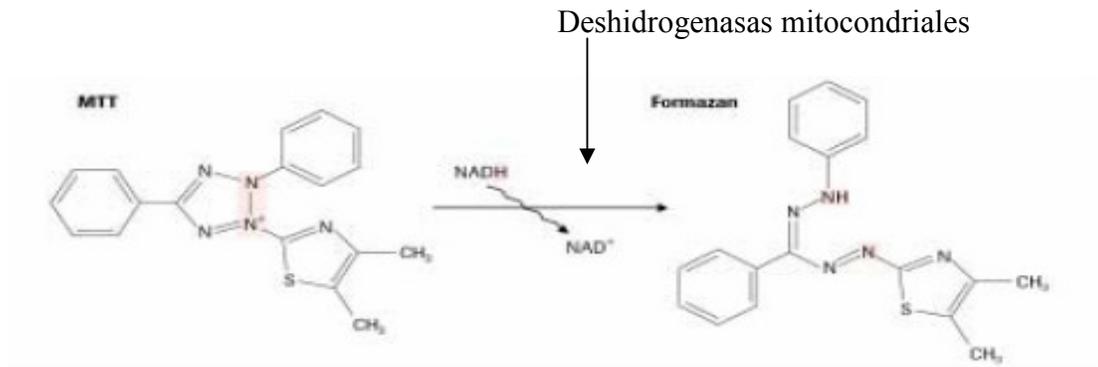
MATERIALES Y MÉTODOS

i. Cultivos de neuronas granulares de cerebelo

Los cultivos de neuronas granulares de cerebelo (NGC) fueron obtenidos de ratas de 8 días postnatales; las células fueron dissociadas y cultivadas a una densidad de 265×10^3 células/cm² sobre cajas de plástico previamente cubiertas con poli-L-lisina (5 µg/ml) por 24 horas. El medio de cultivo contenía medio basal Eagle suplementado con 10% v/v de suero fetal bovino (inactivado previamente por calor), 2 mM de glutamina, 25 mM de KCl, 50 U/ml penicilina y 50 µg/ml de estreptomina. Los cultivos se incubaron a 37 °C en una atmósfera húmeda al 95% de aire y 5% de CO₂. Después de 20 h se añadió citosina arabinósida 10 µM para prevenir el crecimiento de células no neuronales. Las células se mantuvieron durante 6-8 días *in vitro* hasta su uso. De acuerdo a los análisis de inmunohistoquímica se sabe que estos cultivos están constituidos por 95% de neuronas granulares.

ii. Viabilidad Celular

La viabilidad celular fue estimada por el ensayo de [3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5] MTT difenil tetrazolio]. El MTT es transformado en la sal azul de formazán, un compuesto colorido e insoluble, por las deshidrogenasas de mitocondrias activas, siendo la absorbencia directamente proporcional al número de células viables.

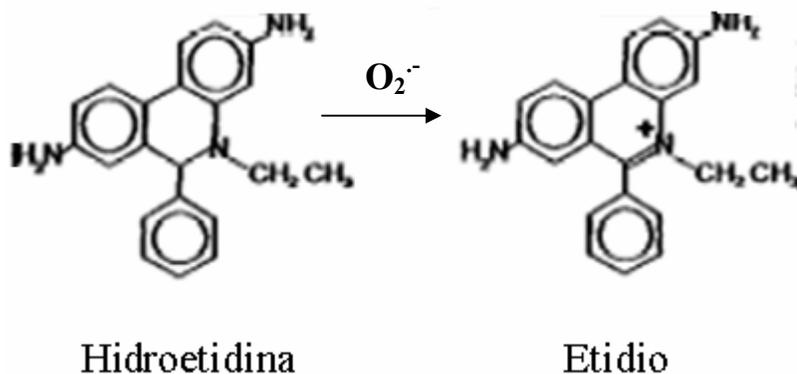


Esta técnica se ha utilizado ampliamente para medir la viabilidad celular en muchos modelos, incluyendo las NGC, donde se ha encontrado una alta correlación entre la transformación del MTT y el contenido de ADN y proteína.

El MTT (0.1 mg/ml de PBS) se añadió a los NGC, que se incubaron por 15 min a 37°C. Se removió el medio con MTT y se añadió DMSO al 100% a las cajas (1 ml/ pozo de 500 µl y 0.5 ml/pozo de 250 µl). Se mantuvieron las cajas durante 15 min a temperatura ambiente en la oscuridad. El azul de formazán formado a partir del MTT se cuantificó espectroscópicamente a una longitud de onda de excitación de 570 nm.

iii. Detección de anión superóxido.

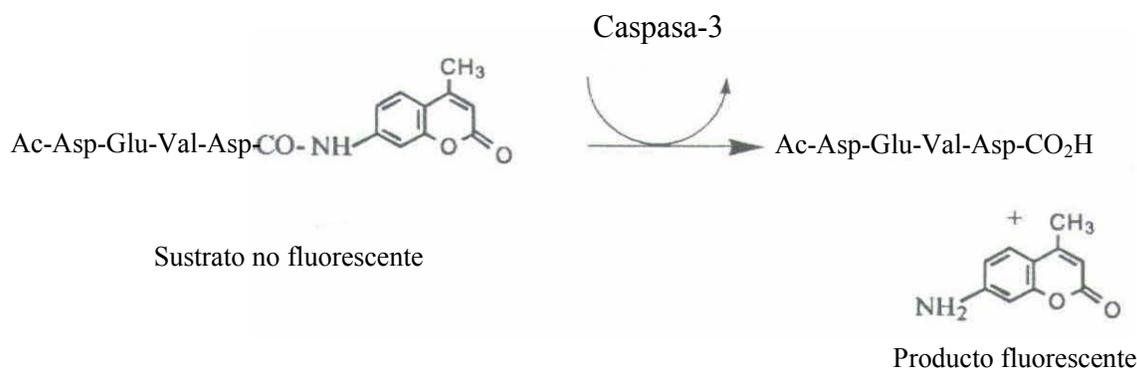
Se determinó la producción de anión superóxido mediante microscopía de fluorescencia usando dihidroetidina. La dihidroetidina al ser oxidada por el O_2^- se transforma en etidio, éste se intercala con el ADN, lo que permite observar el núcleo de la célula de color rojo.



Las NGC se cultivaron sobre cubreobjetos, y 3.5 h después del tratamiento respectivo se incubaron a 37 °C con dihidroetidina (3.2 µM) durante 30 min. Posteriormente las células se lavaron tres veces con PBS, se fijaron con formaldehído al 3% a 4°C durante 15 min, se retiró el fijador, se lavaron con PBS y los cubreobjetos se montaron con PBS-glicerol 1:1 v/v. La preparación se observó en un microscopio de fluorescencia (Nikon Diaphot TMD, Nikon Corporation, Japón) usando el filtro de excitación = 546 nm y emisión = 590 nm.

iv. Actividad de caspasa 3

La actividad de las caspasas fue monitoreada por un método fluorométrico (Thornberry, 1994), basado en la aparición de fluorescencia por la ruptura de un sustrato acoplado a metil-cumarina, con un espectrómetro de luminiscencia (Shimadzu, RF-5301PC). El Ac-DEVD-AMC se utilizó como sustrato para detectar la actividad de la caspasa-3.



Las NGC se lavaron con PBS y homogeneizadas en un amortiguador de lisis. Las actividades se siguieron durante 15 minutos después de la adición del sustrato (25 μ M) al homogenado de células (30 mg/ml) en una solución de estándar (100 mM HEPES; 10% (w/v) sacarosa; 0.1% (w/v) CHAPS; 10 mM DTT; 1 mM EDTA; 20 μ M EGTA; mezcla de inhibidor de proteasas). Los resultados se expresan como DEVD proteolizado y como el cambio en la intensidad de la fluorescencia/h/mg de proteína.

v. Actividad de NADPH-oxidasa

La actividad de NADPH-oxidasa se midió utilizando la técnica descrita por Shpungin y colaboradores (1989). La técnica mide indirectamente la actividad de la enzima NADPH-oxidasa, en presencia de FAD y NADPH, mediante la reducción de citocromo c por el anión O₂⁻ formado.



Las cajas de 60 mm se lavaron 2 veces con PBS a 37°C y se rasparon con 100 μ l del amortiguador salino [KCl 150 mM y NaCl 150 mM (pH 7.4) suplementado con MgCl₂ 1 mM, EGTA 1 mM, NaN₃ 2 mM y DTT 1 mM] más glicerol 2% (v/v). El homogenizado se

recolectó en tubos de 500 μ l y se incubó (100 μ l) a 24°C durante 90 s con el amortiguador, citocromo c (86 μ M), FAD (10 μ M) y SDS (100 μ M). Después de la incubación, se adicionó 0.2 mM de NADPH, y la reducción de citocromo c se midió espectrofotométricamente a 550 nm por 120 s. Finalmente se ajustó el resultado de la actividad enzimática con la cantidad de proteína total por muestra. Los resultados se expresan como la diferencia en la absorbencia por hora por g de proteína. La concentración de proteínas fue determinada por el método de Bradford (1976).

vi. Ensayos tipo réplica en western

Las NGC se lavaron dos veces con un amortiguador salino de fosfatos (PBS) a 37°C y se homogenizaron en el amortiguador de lisis (25 mM Tris HCl; 50 mM NaCl; 1% (v/v) NP-40; 0.2% (w/v) SDS; mezcla de inhibidores de proteasas. Los homogenados (60 mg de proteína por carril) se sometieron a SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Las proteínas resueltas fueron transferidas a las membranas de polifluoruro de vinileno (PVDF) a 100 V por 1 h. Las membranas fueron bloqueadas durante 1 h a temperatura ambiente con 5% de leche seca libre de grasas en TBS. Se pusieron los anticuerpos primarios anti-gp91-phox, anti-p22-phox, anti-p47-phox y anti-p67-phox de origen humano que cruzan con las subunidades de rata (Santa Cruz California, USA), a una concentración de 1:100 durante toda la noche a 4°C. Después se trataron con un anticuerpo secundario anti-goat 1:12500 (ZyMax). Las bandas se visualizaron usando quimioluminiscencia (CDP-Star, Bio Labs), siguiendo el protocolo del fabricante y se expusieron a la placa Kodak XAR-5.

vii. RT-PCR

La técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se utiliza para estudiar la regulación de genes de baja expresión, amplificándolos a partir de sus secuencias de ARN. Esta técnica requiere de la conversión del ARN total a ADN complementario (ADNc) por medio de un a Transcripción Reversa (RT) y amplificación del ADN complementario por PCR (RT-PCR) (Rappolee et. al. 1988, Kawasaki 1989).

Se realizó la extracción del ARN total de NGC utilizando la técnica del tiocianato de guanidina-fenol-cloroformo y precipitación con isopropanol (Chomczynski, 1987). En tubos nuevos y estériles, se rasparon cajas de 100 mm con 1 ml de TRIzol a 4°C. Las muestras se transfirieron a tubos eppendorf de 1.5 ml, se agregaron 200 μ l de cloroformo por 1 ml de muestra y se agitaron con vortex por 30 seg. Las muestras se mantuvieron en

hielo por 5 minutos y se centrifugaron a 15,000 rpm a 4°C por 15 minutos. Al final se obtuvieron dos fases: la inferior de color rojo compuesta por fenol:cloroformo y la porción superior acuosa incolora. El ARN queda en esta última fase, mientras que el ADN y las proteínas se encuentran en la interfase y en la fase orgánica, respectivamente. La fase acuosa se transfirió a otro tubo eppendorf y se agregó un volumen equivalente de isopropanol. La muestra se mantuvo a 4°C durante toda la noche. Las muestras se centrifugaron por 15 minutos a 15,000 rpm a 4°C. El sobrenadante se removió, el precipitado se lavó con etanol al 75% y se centrifugó a 7,500 rpm a 4°C durante 8 minutos. El sobrenadante se removió y el precipitado se lavó nuevamente con etanol al 80%. Posteriormente se centrifugó a 7,500 rpm durante 8 minutos a 4°C. Se disolvió la pastilla de ARN en 40 µl de H₂O-dietil pirocarbonato (DEPC) estéril. Se hicieron diluciones 1:500 y se leyó la absorbencia de estas muestras a 260 y 280 nm. Se determinó la concentración de ARN mediante la siguiente fórmula: µg/µL de ARN = 1 unidad de absorbencia a 260 nm X factor de dilución (500) x 40 / 1000.

Para determinar la integridad del ARN extraído, éste se analizó en geles de agarosa al 1% en condiciones desnaturalizantes. Solamente se utilizaron las muestras en las que el ARN estuviera íntegro, es decir donde se observaran claramente las bandas correspondientes a los ARNs ribosomales 18S y 28S y no se encontrara ARN degradado, ni presencia de ADN.

Se realizó el ensayo de transcripción reversa del ARN total. Para esto se preparó la siguiente mezcla para la reacción:

<u>Reactivos</u>	<u>Concentración Final</u>
ARN Total	5 µg (en un volumen de 10 µl)
Amortiguador RT (5X)	50 mM Tris-HCl pH=8.3 75 mM KCl 3 mM MgCl ₂
DTT (100 mM)	10 mM
dNTPs (10 mM)	0.5 mM de cada dNTP
RT II Super Scrip	400 unidades
Oligo d-T	0.05 µg

La reacción se incubó en un termociclador Techgene a 38°C por una hora. El perfil de los ciclos para amplificar los genes de NOX1, NOX2, NOX4, p47 phox, p67 phox, p40

phox y GAPDH fue el siguiente: Una etapa de desnaturalización a 95°C por 10 min; 35 ciclos de 95°C, 30 seg; 58 °C, 40 seg; 72°C, 2 min. Un paso de extensión final se realizó a 72°C por 5 min. En todos los experimentos se incluyeron controles negativos sin ARN y con ARN sin reacción de RT. La secuencia de oligonucleótidos utilizada para amplificar los genes de NOX1, NOX2, NOX4, p47 phox, p67 phox, p40 phox y GAPDH fue la siguiente:

GENES	SECUENCIAS
NOX1	Sentido 5'-[CCTTCTGGGAAACCTGCCTTTAG]-3' Antisentido 5'-[TGTTGGTCACACTGGATGATAAGC]-3'
NOX2	Sentido 5'-[TGGAGTGGTGTGTGAATGCCAGAG]-3' Antisentido 5'-[CGATGGTTTTGAAAGGGTGCG]-3'
NOX4	Sentido 5'-[AGCCAAGATTCTGAGATTCTGCC]-3' Antisentido 5'-[CCGAGGACGCCCAATAAAAAG]-3'
p40 phox	Sentido 5'-[CTTGGATGATAGCACTGCAC]-3' Antisentido 5'-[CTTCATCTGAAGCTCAATGG]-3'
p47 phox	Sentido 5'-[CAGCCAGCACTATGTGTACA]-3' Antisentido 5'-[GAACTCGTAGATCTCGGTGAA]-3'
p67 phox	Sentido 5'-[TTGGCAGTGGCTTACTTCCAGC]-3' Antisentido 5'-[CAAGACAAAGACGATGTTCCCG]-3'
GAPDH	Sentido 5'-[CCT GCA CCA CCA ACT GC]-3' Antisentido 5'-[CAA TCG CAG CCC CAG CA]-3'

La mezcla de reacción utilizada para la PCR en todos los experimentos fue la siguiente:

<i>Reactivos</i>	Concentración Final
Amortiguador PCR 10 X	20 mM Tris-HCl pH=8.4
	50 mM KCl
MgCl ₂ (50 mM)	1.0 mM
dNTPs (10 mM)	0.2 mM
Oligo sentido	0.5 µM

Oligo antisentido	0.5 μ M
Taq ADN polimerasa	2.5 unidades

Una vez que se realizó la RT-PCR, se llevó a cabo una electroforesis de los productos obtenidos. Se separaron 35 μ l de producto de RT-PCR con amortiguador de carga 1X para ADN en un gel de agarosa al 1.5% preparado con Tris-borato EDTA (TBE) 0.5 X.

viii. Estadística

Los resultados se analizaron con una prueba t de Student, la significancia utilizada fue de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Para conocer si la NADPH-oxidasa genera una condición prooxidante responsable de la muerte neuronal, se realizaron experimentos de viabilidad. Las NGC cultivadas en K25 por 7-8 DIV se transfirieron a un medio con K5 en presencia de DPI (260 nM y 520 nM) o AEBSF (20 μ M y 40 μ M), que se han descrito como inhibidores de la actividad de este complejo. Después de 24 h del tratamiento se observó que el DPI y el AEBSF evitaron parcialmente la muerte neuronal con respecto al K5. La protección de los inhibidores fue dependiente de la concentración. En la evaluación morfológica también se observó que se preservó la estructura de las neuronas en la presencia de ambos inhibidores (Figs. 8 y 9). Por otro lado, la viabilidad de las NGC tratadas con ST (0.5 μ M) se redujo un 50%, y el AEBSF (40 μ M y 80 μ M) protegió a las células de la muerte inducida por este compuesto (Figs. 8 y 9).

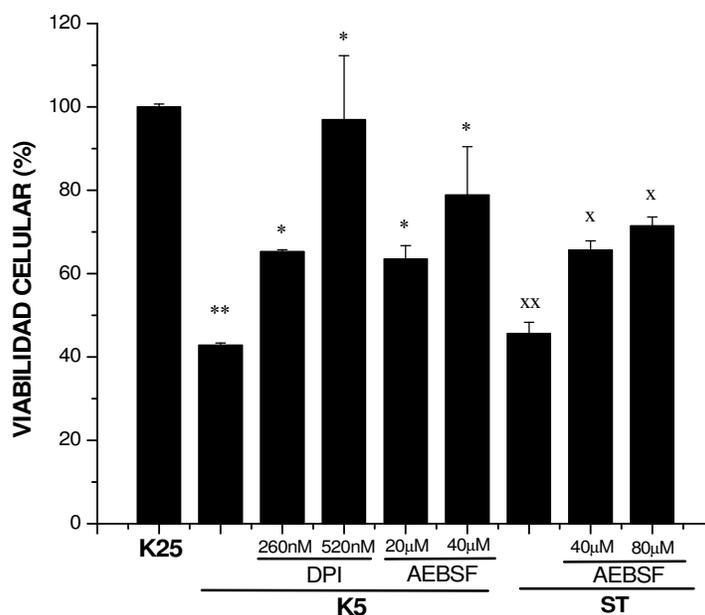


Fig. 8. Los inhibidores de la NADPH-oxidasa disminuyen la muerte de las NGC inducida por K5 y ST. La viabilidad se midió como transformación de MTT. Los inhibidores de la NADPH-oxidasa, AEBSF (10 y 20 μ M) y el DPI (260 y 520 nM) se añadieron simultáneamente al estímulo apoptótico

y la viabilidad se midió después de 24h. Promedios \pm D.E. n=5. **, ^{xx} P<0.05 Vs. K25, * P<0.05 Vs. K5, ^x P<0.05 Vs. ST,

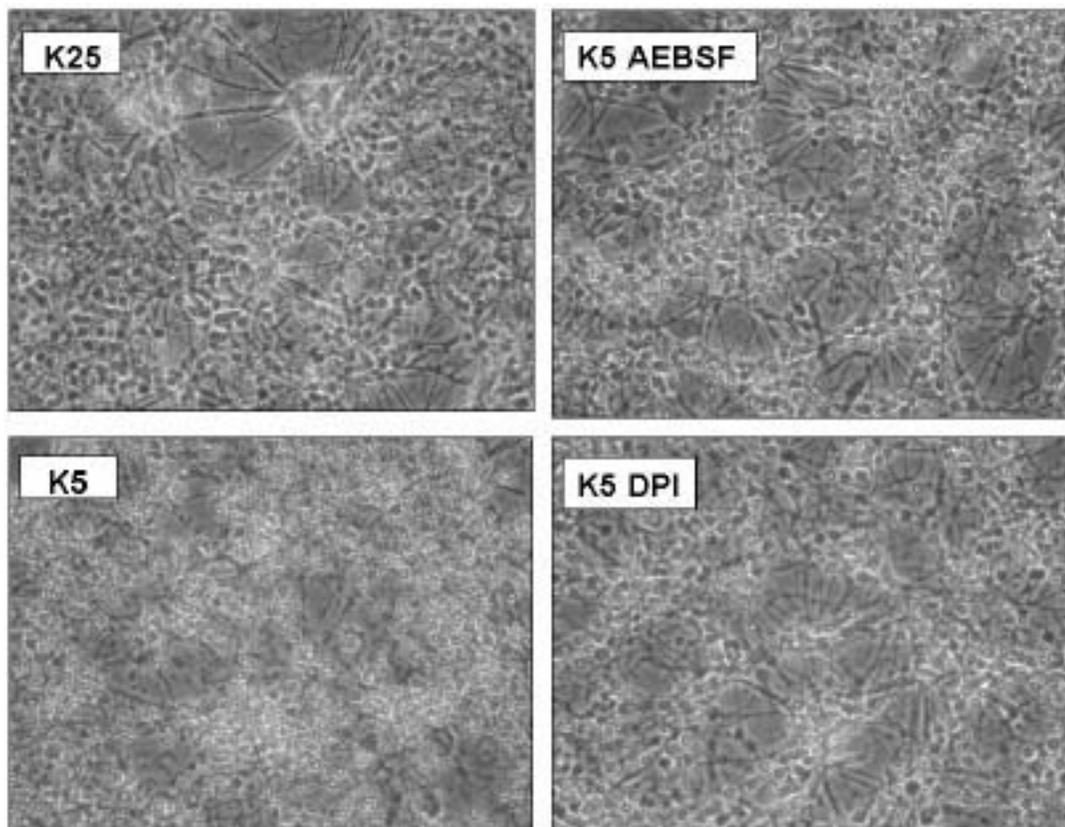
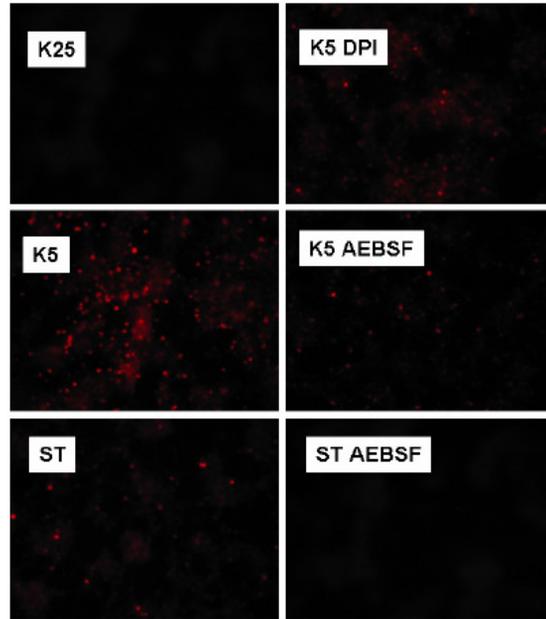


Fig. 9. Los inhibidores de la NADPH-oxidasa preservan la morfología celular en condiciones apoptóticas. Las NGC se observan morfológicamente similares a las control con los inhibidores de la NADPH-oxidasa después del estímulo apoptótico. La observación morfológica se realizó mediante microscopía de campo claro (20 X), después de 24 h del estímulo apoptótico (5 mM de KCl, 0.5 μ M de ST) con y sin una administración simultánea de los inhibidores de la NADPH-oxidasa AEBSF y DPI.

Se determinó la producción de anión superóxido mediante microscopía de fluorescencia usando dihidroetidina. La dihidroetidina al ser oxidada por el O_2^- se transforma en etidio, éste se intercala con el ADN, lo que permite observar el núcleo de la célula de color rojo. Bajo estas condiciones, se observó un aumento en la cantidad de anión superóxido alrededor de las 4 h del cambio de medio. El tratamiento con ST también promovió un aumento de células positivas a las 4 h; sin embargo, este aumento fue menor al observado con K5. La cantidad de células positivas disminuyó en presencia

de los inhibidores de la NADPH-oxidasa (AEBSF y DPI) con ambos inductores apoptóticos (Figs. 10A y 10B).

A



B

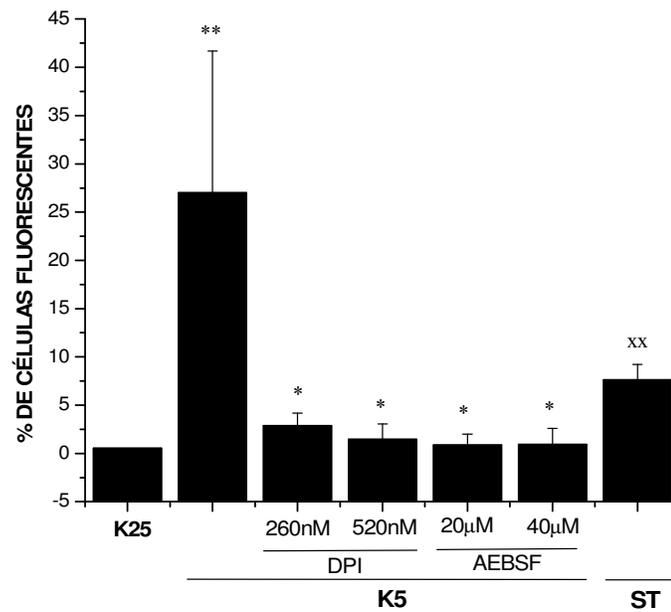


Fig. 10. Los inhibidores de la NADPH-oxidasa reducen la producción del anión superóxido después del estímulo apoptótico. Utilizando dihidroetidina y microscopía de fluorescencia (20 X) se determinó

la producción de anión superóxido a las 4 h del estímulo apoptótico (5 mM de KCl, ST) y con la administración simultánea de AEBSF 20 μ M y 40 μ M o DPI 260 nM y 520 nM, inhibidores de la NADPH-oxidasa. **A** Fotografías representativas. **B** Gráfica del porcentaje de células positivas a dihidroetidina respecto al total de las células presentes en la preparación. Promedios \pm D.E. n=4.**, ^{xx} P<0.05 Vs. K25, * P<0.05 Vs. K5.

Medimos la actividad de caspasa 3 como indicador de muerte apoptótica. Se realizó un seguimiento temporal (2 a 11 horas) y se observó un aumento en la actividad desde las 6 h inducido con K5, respecto al control (K25). Para probar el efecto de los inhibidores de la NADPH-oxidasa, las células se trataron con AEBSF (20 y 40 μ M) y DPI (260 y 520 nM) simultáneamente al cambio de medio. Bajo estas condiciones se observó que la actividad de la caspasa 3 disminuye significativamente y esta disminución depende de la concentración de los inhibidores. Las células tratadas con ST presentan un aumento en la actividad de caspasa 3 y el AEBSF (40 y 80 μ M) también provocó una disminución de la actividad de caspasa 3 (Fig.11).

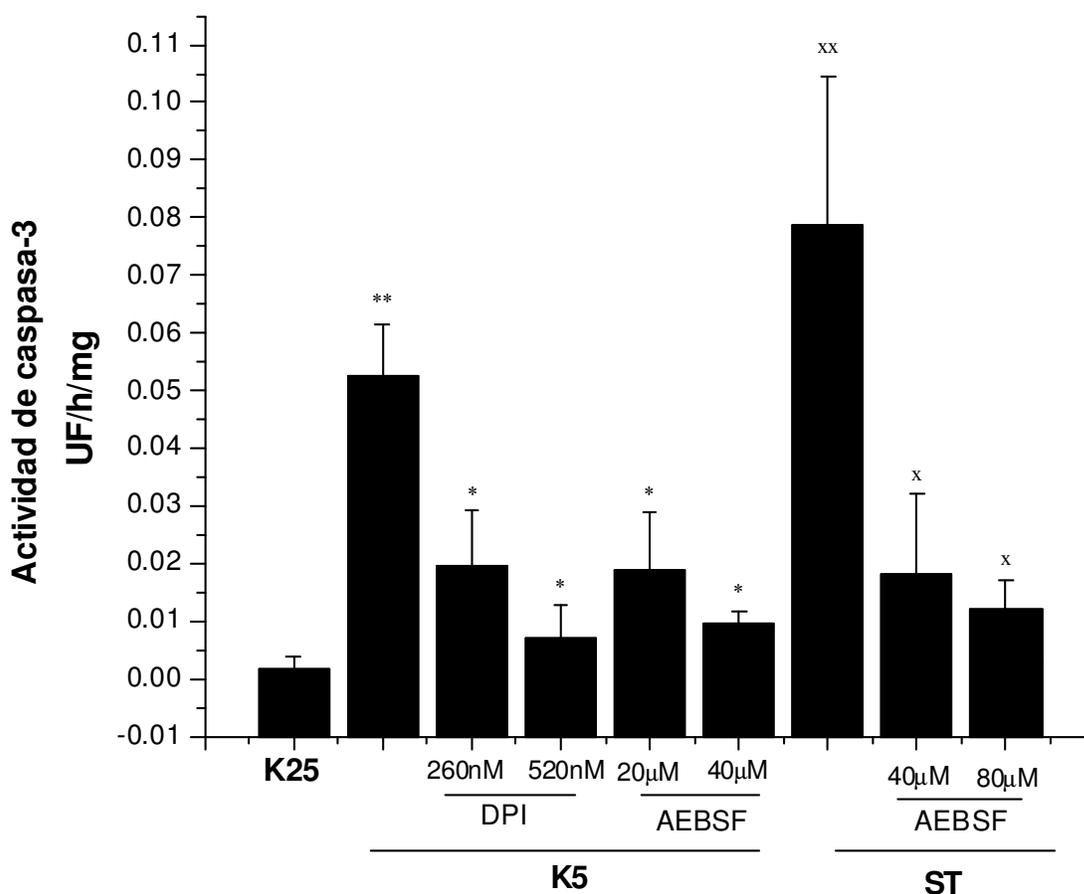
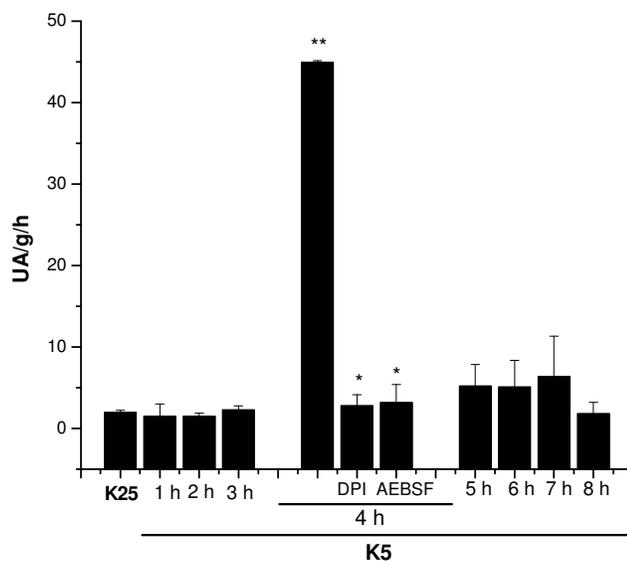


Fig.11. Disminución de la actividad de caspasa 3 con los inhibidores de la NADPH-oxidasa en NGC. La actividad de caspasa 3 se midió a las 8h de los estímulos apoptóticos (K5 y ST) más los

inhibidores de la NADPH-oxidasa, AEBSF (20 y 40 μ M), DPI (260 y 520nM) con K5; AEBSF (40 y 80 μ M) con ST. Promedios \pm D.E. n=5. **, ^{xx} P<0.05 Vs. K25, * P<0.05 Vs. K5, ^x P<0.05 Vs. ST,

A

Actividad de NADPH-oxidasa



B

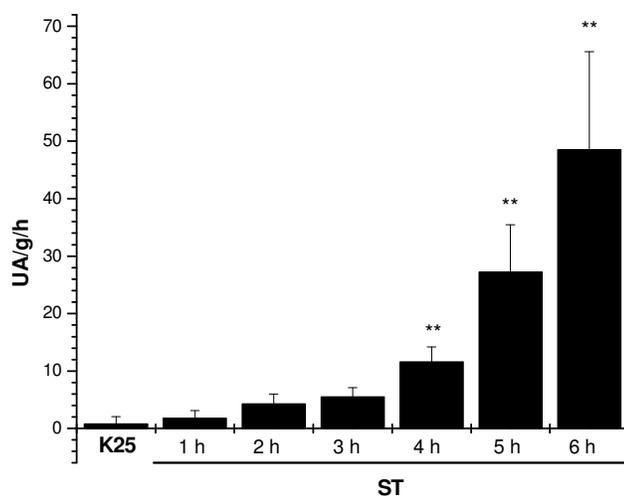


Fig. 12. Inducción de la actividad de la NADPH-oxidasa con los estímulos apoptóticos de K5 y ST en las NGC. **A.** La actividad de la NADPH-oxidasa se cuantificó mediante la oxidación de citocromo c, 1-8 h del cambio de medio a K5. A las 4 h del tratamiento con K5 se administró

conjuntamente DPI 520 nM o AEBSF 40 μ M. **B.** Seguimiento temporal (1-6 h) de la actividad de la NADPH-oxidasa en las NGC tratadas con ST. Promedios \pm D.E. n=6.**, ^{xx} P<0.05 Vs. K25, * P<0.05 Vs. K5.

La actividad de NADPH-oxidasa es muy baja o nula en las NGC crecidas con K25. Sin embargo, en las células a las cuales se les cambió el medio de 25 mM a 5 mM de KCl se observó un aumento marcado en la actividad de la enzima alrededor de las 4 h (Fig. 12A). En el caso de la ST se observó un aumento en la actividad a las 5 y 6 horas de tratamiento (Fig. 12B). La presencia de DPI (520 nM) o AEBSF (40 μ M) produjo una inhibición en la actividad de la enzima inducida por K5 (Fig. 12A).

Utilizando ensayos de replica en western, se identificó en NGC cuatro de las subunidades de este complejo enzimático: gp91 phox, p22 phox (subunidades membranales), p47 phox y p67 phox (subunidades citosólicas). Por medio de RT-PCR se identificó el mRNA de gp91 phox, p47 phox, p67 phox y p40 phox (Figs. 13,14, 15). En estos casos se utilizaron macrófagos de médula ósea de rata como controles positivos.

Recientemente se han encontrado diversos homólogos de la subunidad catalítica de la NADPH-oxidasa (NOX2) en diversos tejidos. De manera interesante, nosotros también detectamos la presencia de ARNm para NOX 1 y NOX 4, mediante RT-PCR (Fig. 16). Se realizó un PCR semicuantitativo para determinar si los niveles del ARNm de alguna de estas isoformas de la subunidad catalítica de la NADPH-oxidasa (NOX2) modificaba su expresión con los estímulos apoptóticos (K5 y ST). En estos ensayos se observó que no hubo un cambio en la expresión del ARNm a las 4 h con ninguno de los estímulos apoptóticos (Fig. 17). Para esto, se realizó previamente una curva de ciclos (20, 25, 30, 35 y 40 ciclos) para determinar en que ciclo de amplificación se detectaban cambios en la expresión del ARNm. Para el caso de la NOX1 y NOX2 se utilizaron 30 ciclos, para la NOX 4 se emplearon 35 ciclos y para el gen de control de expresión (GAPDH) se utilizaron 20 ciclos.

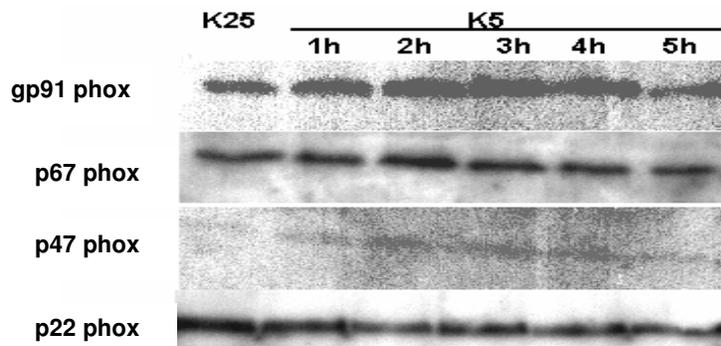


Fig. 13 Presencia de la proteína de algunas de las subunidades de la NADPH-oxidasa en NGC. Se observa la expresión de gp91 (NOX2), p22 (ambas membranales) en las NGC a

diferentes tiempos (1, 2, 3, 4 y 5 h) después del estímulo apoptótico (K5). También se observa la presencia de dos de las subunidades citosólica p67 phox y p47 phox.

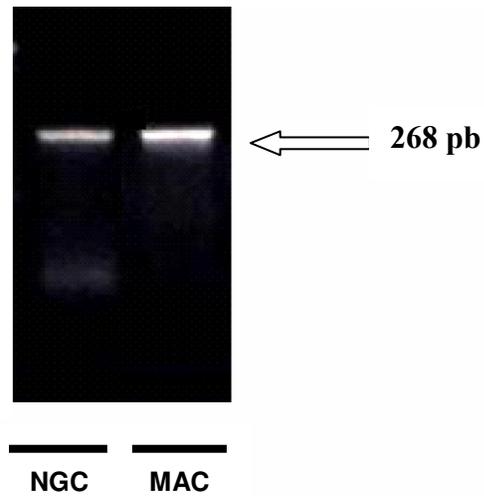


Fig. 14 Presencia del ARNm de NOX2 en NGC. Se identificó mediante RT-PCR la expresión de NOX2 en NGC cultivadas en K25, se utilizaron como control positivo macrófagos de médula ósea de rata.

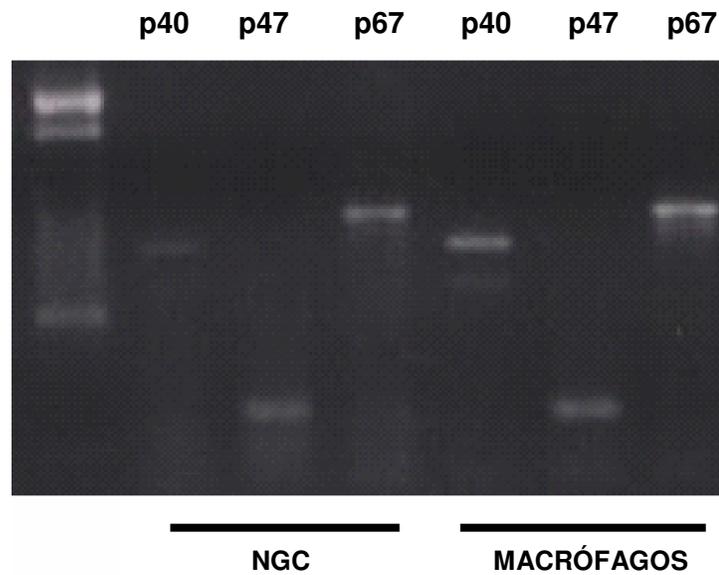


Fig. 15 Presencia del mRNA de p47 phox, p67 phox y p40 phox en NGC. Se identificó mediante RT-PCR la expresión de p47 phox, p67 phox y p40 phox en NGC cultivadas en K25, se utilizó como control positivo macrófagos de médula ósea de rata.

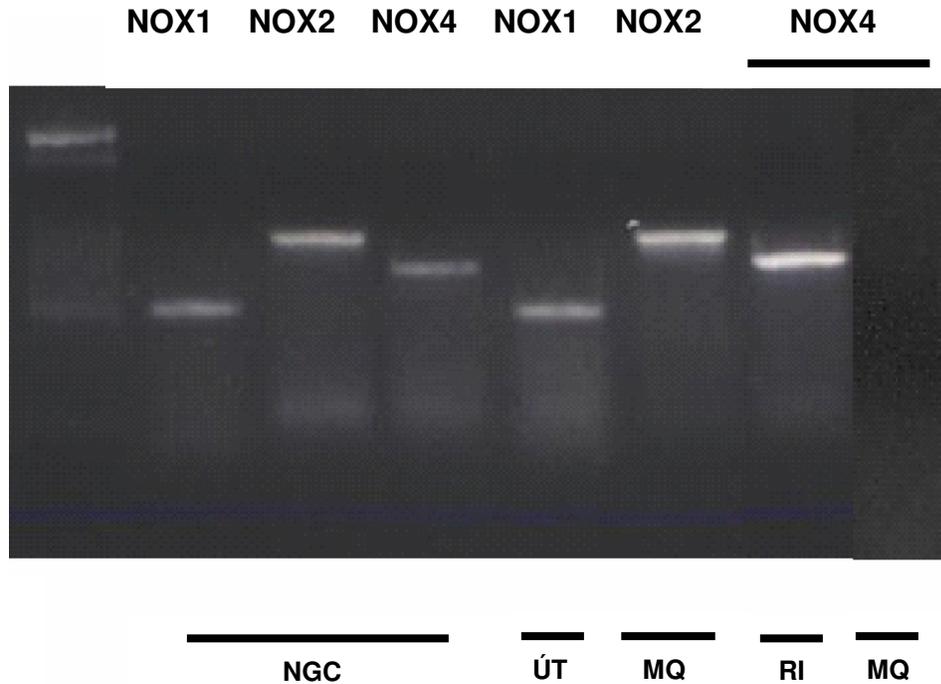


Fig. 16 Presencia del mRNA de NOX1, NOX2 y NOX4 en NGC. Se identificó mediante RT-PCR la expresión de NOX1, NOX2 y NOX4 en NGC cultivadas en K25. Como controles positivos se utilizaron útero (ÚT), macrófagos de médula ósea (MQ) y riñón (RI) de rata (respectivamente). Como control negativo para la NOX4 se utilizaron macrófagos de médula ósea de rata.

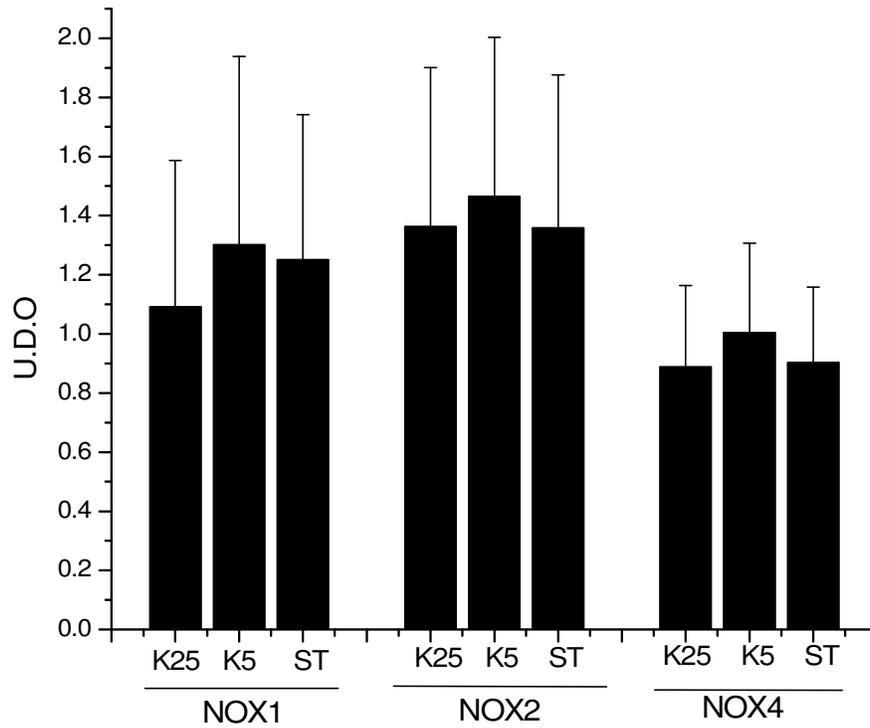


Fig. 17 Expresión del mRNA de NOX1, NOX2 y NOX4 en NGC sujetas al estímulo apoptótico de K5 y ST. RT-PCR semicuantitativo para la NOX1 Y NOX2 (30 ciclos), para NOX 4 (35 ciclos), a las 4 h del estímulo apoptótico (cambio de medio de 25 mM de KCl a 5 mM de KCl y estaurosporina 0.1 μ M en K25) expresado como unidades arbitrarias de densidad óptica (U.A. de D. O.) corregidas con GAPDH. Las barras son promedios \pm D.E., n= 5.

DISCUSIÓN

Los estudios recientes han demostrado que la generación de EOR es importante para que se lleve a cabo la muerte apoptótica (Ceballos-Picot, *et al.*, 1997; Valencia y Morán, 2001; Valencia y Morán, 2004). En un trabajo previo realizado en el laboratorio, durante la muerte apoptótica de NGC inducida por K5, se observó la producción de EOR alrededor de las 4 h del estímulo (Valencia, 2001). Esto se corroboró en el presente trabajo utilizando dihidroetidina, que detecta preferentemente $O_2^{\cdot-}$. De igual manera, en la muerte apoptótica de NGC inducida por ST también observamos generación de $O_2^{\cdot-}$ alrededor de las 4 h; sin embargo, la producción fue menor que con K5. Así, se ha sugerido en este modelo que la generación de EOR puede funcionar como una señal temprana en el proceso de muerte apoptótica previa a la aparición de parámetros tempranos de apoptosis como la translocación de la fosfatidilserina y la activación de las caspasas (Valencia *et al.*, 2001; Valencia *et al.*, 2004). En otros trabajos se ha sugerido la participación de otras EOR como el peróxido de hidrógeno en la muerte apoptótica de neuronas granulares (Schulz *et al.*, 1996), sin que quede claro el papel de cada una de estas EOR.

Muchos estudios sugieren que el $O_2^{\cdot-}$, el 1O_2 y el H_2O_2 podrían ser los responsables del proceso de muerte. Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de estudios realizados al respecto, no se ha definido cuáles son las EOR responsables de la muerte (Ceballos-Picot, *et al.*, 1997). El anión superóxido parecería ser determinante para la ejecución de la muerte inducida tanto por K5 (Valencia *et al.*, 2001) como ST; sin embargo, no se pueden descartar otras EOR debido a que estas especies son muy inestables y se interconvierten rápidamente, pudiendo generarse una reacción en cadena que lleva a la formación de otras EOR.

Aun cuando se acepta que las EOR juegan un papel crítico en los mecanismos de muerte apoptótica, se desconocen los mecanismos y fuentes que las generan en respuesta a los diferentes estímulos apoptóticos. Se han propuesto diversas fuentes de EOR como la mitocondria, que ha sido considerada una de las fuentes principales no sólo en la muerte apoptótica sino también necrótica. Recientemente, se sugirió la importancia de otras fuentes de EOR como la NADPH-oxidasa. Por ejemplo, en las neuronas simpáticas en cultivo se atribuyó a la NADPH-oxidasa un papel fundamental en la muerte neuronal apoptótica inducida por privación de NGF (Tammariello *et al.*, 2000). Esta enzima también se ha encontrado en neuronas piramidales del hipocampo, en neuronas

de Purkinje cerebelares (Mizuki *et al.*, 1998; Serrano *et al.*, 2003), entre otras, sin que se haya precisado su función. En el presente trabajo, evaluamos la posibilidad de que la NADPH-oxidasa esté involucrada en la generación de EOR involucradas en la muerte apoptótica de las NGC.

En este estudio detectamos por primera vez la presencia del complejo NADPH-oxidasa en las NGC, particularmente las proteínas gp91-phox, p22-phox, p47-phox y p67-phox. Estos resultados coinciden con un trabajo realizado por Kim *et al.*, (2005), en donde se encontró p47 phox y gp91phox en varias regiones del cerebro, incluyendo el cerebelo. Los niveles de las subunidades de NADPH oxidasa parecen no modificarse por el tratamiento con K5, por lo que ésta no parecería ser una forma de regulación de su actividad. En este sentido se ha propuesto que la activación de la NADPH-oxidasa depende de la fosforilación de algunas de sus subunidades (p47-phox y p67-phox) por distintas cinasas (PKC: PKC α , PKC β II, la PKC ζ , y la PKC δ) (Fontayne *et al.*, 2002) y calcio (Zhou *et al.*, 1997).

El empleo de inhibidores de la NADPH oxidasa (DPI y AEBSF) disminuyó significativamente la producción de este anión inducida por K5 y ST. Estos mismos inhibidores también protegieron a las células de la muerte inducida por K5 y ST. Sólo en el caso de la combinación de ST y DPI la viabilidad no sólo no mejoró, sino que se redujo marcadamente, probablemente por un efecto tóxico sinérgico aún desconocido. El DPI inhibe a la enzima impidiendo el transporte de electrones por lo que no hay reducción del oxígeno. Se sabe que todos los homólogos de la gp91-phox transportan los electrones desde el FAD al NADPH, por lo que si este sitio se inhibe, ninguno de los homólogos estaría contribuyendo a la producción de EOR. Por otro lado, el AEBSF impide el ensamblaje de la NADPH-oxidasa por lo que impediría la activación de los homólogos que requieren que se ensamblen las proteínas citosólicas y membranales, como es el caso de NOX1, gp91phox y NOX3, no así NOX4 que no requiere las subunidades citosólicas.

La actividad de caspasa 3 inducida por K5 y ST se redujo marcadamente por acción de los inhibidores de la NADPH-oxidasa, lo cual coincide con la disminución de la actividad de esta proteasa por antioxidantes (Valencia y Morán, 2001). En algunos estudios se ha mencionado que la S-nitrosilación y la oxidación de residuos tiol podría regular la actividad de las caspasas (Baker *et al.*, 2000; Ueda *et al.*, 2002), ya que se ha observado que el NO mantiene a la caspasa 3 como zimógeno (forma inactiva), muestra que la desnitrosilación de esta proteasa la activa y produce apoptosis (Mannick *et al.*,

1999). Quizás este pueda ser alguno de los mecanismos por el cual las EOR regulen la apoptosis.

Un punto importante es la correlación de la generación de O_2^- y la activación de la NADPH-oxidasa inducidas por condiciones apoptóticas. En nuestro estudio encontramos que la producción de O_2^- coincidió temporalmente con la actividad de la enzima, la cual se inhibió marcadamente con DPI y AEBSF.

Las evidencias encontradas sugieren una participación de la NADPH-oxidasa en la muerte apoptótica de las NGC, lo cual coincide con trabajos realizados en neuronas corticales y periféricas (Tammariello *et al.*, 2000; Noh *et al.*, 2000) basados en el empleo de ratones deficientes en la subunidad catalítica de gp91phox (NOX2). En resultados preliminares de nuestro grupo, se utilizaron estos ratones para corroborar estos resultados en las NGC; sin embargo, bajo nuestras condiciones no se observaron cambios entre las NGC silvestres y las deficientes de gp91phox. Esto nos ha llevado a proponer que otros de los homólogos de la enzima podrían estar presentes en las NGC y ser los responsables de la generación de EOR involucrados en la muerte por K5 y ST.

En este trabajo, detectamos la presencia del ARNm de gp91phox (NOX2) y de sus homólogos NOX1 y NOX4, lo que refuerza la idea de la importancia de la NADPH-oxidasa. La redundancia en la expresión de los homólogos de esta enzima probablemente contribuye a compensar la falta de uno de los homólogos, como se ha observado en la enfermedad de granulomatosis crónica en la que NOX1 compensa parcialmente la actividad de la NOX2, ausente en estos pacientes (Rosenzweig y Holland, 2004). Por otro lado, otra explicación de la existencia de estos homólogos podría ser la existencia de una actividad especializada de estos homólogos vinculada con procesos fisiológicos y patológicos, como se reportó en ratones (Vallet *et al.*, 2005) donde la NOX4 involucrada en daño isquémico puede ser regulada a nivel del ARNm por tiempos relativamente largos. Nosotros no observamos cambios en la expresión de los ARNm de NOX1, 2 y 4 de NGC tratadas con K5 o ST. Por otro lado, apreciamos que la NOX4 está presente en una menor cantidad respecto a NOX1 y NOX2, lo que podría indicar una función particular de las NOX.

Todos estos resultados apoyan la idea de una participación de la NADPH-oxidasa en este proceso; sin embargo, no se descarta que las EOR generadas por la mitocondria sean importantes para la ejecución de la muerte apoptótica. Se ha observado que la generación de O_2^- por la mitocondria es indispensable para activar a la NADPH-oxidasa (NOX1) (Deouki *et al.*, 2005). En otros modelos como las células HL 60, se ha observado

que la ST induce muerte apoptótica y hay una generación de EOR, pero la producción de estas especies la atribuyen a la mitocondria (Cai y Jones, 1998).

En conclusión, en este trabajo sugerimos que el estrés oxidativo podría ser una señal inicial de la muerte apoptótica y que la NADPH-oxidasa podría tener un papel central, aunque no único, en la activación del programa apoptótico, siendo el anión superóxido el responsable inicial de la inducción de la muerte apoptótica de las neuronas del cerebelo en cultivo. Es necesario considerar que las EOR forman parte de muchas vías de señalización celular que no son necesariamente exclusivas del proceso apoptótico y que además existen otros factores que también participan en la muerte celular.

CONCLUSIONES

- Los ARNm y las proteínas de las subunidades de la NADPH-oxidasa, p47 *phox*, p67 *phox*, p22 *phox*, gp91 *phox* están presente en las NGC.
- Las NGC expresan el ARNm de NOX1, NOX2 y NOX4, homólogos de la familia de las NOX.
- La actividad de la NADPH-oxidasa aumenta entre las 4 y 6 horas después de un estímulo apoptótico inducido por K5 y ST en las NGC
- Los inhibidores de la NADPH-oxidasa inhiben la muerte inducida por K5 y ST en las NGC
- Los inhibidores de la NADPH-oxidasa disminuyen la producción de O_2^- inducido por K5 y ST en las NGC.
- Los inhibidores de la NADPH-oxidasa inhiben marcadores apoptóticos como la caspasa 3.

Los resultados obtenidos apoyan la posibilidad de la participación de una NADPH-oxidasa en la muerte apoptótica en neuronas granulares. En este trabajo sugerimos que el estrés oxidativo podría ser una señal inicial de la muerte apoptótica y que la NADPH-oxidasa podría tener un papel central, aunque no único, en la activación del programa apoptótico, siendo el O_2^- el responsable inicial de la inducción de la muerte apoptótica de las neuronas del cerebelo en cultivo.

REFERENCIAS

- Abramov AY, Jacobson J, Wientjes F, Hothersall J, Canevari L, Duchen MR. 2005. Expression and modulation of an NADPH oxidase in mammalian astrocytes. *J Neurosci*, 25: 9176-84.
- Ago T, Kuribayashi F, Hiroaki H, Takeya R, Ito T, Kohda D, Sumimoto H. 2003. Phosphorylation of p47phox directs phox homology domain from SH3 domain toward phosphoinositides, leading to phagocyte NADPH oxidase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 4474-9.
- Atabay C, Cagnoli E, Ikonovic M, Manev H. 1996. Removal of serum from primary cultures of cerebellar granule neurons induced oxidative stress and DNA fragmentation: protection with antioxidants and glutamate receptor antagonist. *J Neurosci Res*, 43: 465-75.
- Atlante A, Gagliardi S, Marra E, Calissano P. 1998. Neuronal apoptosis in rats is accompanied by rapid impairment of cellular respiration and is prevented by scavengers of reactive oxygen species. *Neurosci Lett*, 245: 127-30.
- Atlante A, Valenti D, Gagliardi S, Passarella S. 2000. A sensitive method to assay the xanthine oxidase activity in primary cultures of cerebellar granule cells. *Brain Res Brain Res Protoc*, 6: 1-5.
- Atlante A, Calissano P, Bobba A, Azzariti A, Marra E, Passarella S. 2000. Cytochrome c is released from mitochondria in a reactive oxygen species (ROS)-dependent fashion and can operate as a ROS scavenger and as a respiratory substrate in cerebellar neurons undergoing excitotoxic death. *J Biol Chem*, 275: 37159-66.
- Babior BM. 2004. NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol*, 16: 42-7.
- Baker A, Santos BD, Powis G. 2000. Redox control of caspase-3 activity by thioredoxin and other reduced proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, 268: 78-81.
- Balázs R, Jorgensen OS, Hack N. 1988. N-methyl-D-aspartate promotes the survival of cerebellum granule cells in culture. *Neuroscience*, 27: 437-51.
- Banfi B, Clark RA, Steger K, Krause KH. 2003. Two novel proteins activate superoxide generation by the NADPH oxidase NOX1. *J Biol Chem*, 278: 3510-3.
- Banfi B, Tirone F, Durussel I, Knisz J, Moskwa P, Molnar GZ, Krause KH, Cox JA. 2004. Mechanism of Ca²⁺ activation of the NADPH oxidase 5 (NOX5). *J Biol Chem*, 279: 18583-91.

- Biberstine-Kinkade KJ, DeLeo FR, Epstein RI, LeRoy BA, Nauseef WM, Dinauer MC. 2001. Heme-ligating histidines in flavocytochrome b(558): identification of specific histidines in gp91(phox). *J Biol Chem*, 276: 31105-12.
- Cai H, Griendling KK, Harrison DG. 2003. The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Trends Pharmacol Sci*, 24: 471-8.
- Cai J, Jones DP. 1998. Superoxide in apoptosis. Mitochondrial generation triggered by cytochrome c loss. *J Biol Chem*, 273: 11401-4.
- Castilho R, Manus W, Nicholls D. 1999. Oxidative stress, mitochondrial function and acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *J Neurochem*, 72: 1394-1401.
- Ceballos-Picot I. 1997. The role of oxidative stress in neuronal death. *Neuroscience Intelligent Unit*. Springer. NY, USA. pp 203.
- Chan WH, Yu JS, Yang SD. 2000. Apoptotic signalling cascade in photosensitized human epidermal carcinoma A431 cells: involvement of singlet oxygen, c-Jun N-terminal kinase, caspase-3 and p21-activated kinase 2. *Biochem J*, 351: 221-32.
- Cheng G, Cao Z, Xu X, van Meir EG, Lambeth JD. 2001. Homologs of gp91 phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4 and Nox5. *Gene*, 269: 131-140.
- Chai, J., Du, C., Wu, J.-W., Kyin, S., Wang, X., Shi, Y. 2000. Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature*, 406: 855–62.
- Chimini G. 2002. Repulsive encounters. *Nature*, 418: 139-141.
- Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162: 156-9.
- Chow CK. 2001. Vitamin E regulation of mitochondrial superoxide generation, *Biol Signals Recept*, 10: 112-24.
- Chua BT, Guo K, Li P. 2000. Direct cleavage by the calcium-activated protease calpain can lead to inactivation of caspases. *J Biol Chem*, 275: 5131-35.
- Cohen, G. M. 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*, 326: 1-16.
- Curnutte JT, Kuver R, Babior BM. 1987. Activation of the respiratory burst oxidase in a fully soluble system from human neutrophils. *J Biol Chem*, 262: 6450-2.
- D'Mello SR, Galli C, Ciotti T and Calissano P. 1993. Induction of apoptosis in cerebellar granule neurons by low potassium: inhibition of death by insulin-like growth factor I and cAMP. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 10989-93.

- Desouki MM, Kulawiec M, Bansal S, Das GM, Singh KK. 2005. Cross talk between mitochondria and superoxide generating NADPH oxidase in breast and ovarian tumors. *Cancer Biol Ther*. Dec, 4: 1367-73.
- Deveraux Q, Reed J. 1999. IAP family proteins-suppressors of apoptosis. *Genes and Develop*, 13: 239-252.
- Dinauer MC. 2005. Chronic granulomatous disease and other disorders of phagocyte function. *Hematol*, 89-95.
- Ding D, Moskowitz S, Li R, Lee SB, Esteban M, Tomaselli K, Chan J, Bergold P. 2000. Acidosis induces necrosis and apoptosis of cultured hippocampal neurons. *Exp Neurol*, 162: 1-12.
- Du G, Mouthys-Mickalad A, Sluse F. 1998. Generation of superoxide anion by mitochondria and impairment of their function during anoxia and reoxygenation in vitro. *Free Radic Biol Med*, 25: 1066-74.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Wang, X. 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation during apoptosis. *Cell*, 102: 33–42.
- Enroth C, Eger BT, Okamoto K, Nishino T, Nishino T, Pai EF. 2000. Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: structure-based mechanism of conversion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 10723-8.
- Fiskum G, Murphy AN, Beal MF. 1999. Mitochondria in neurodegeneration: acute ischemia and chronic neurodegenerative diseases. *J Cereb Blood Flow Metab*, 19: 351-369.
- Fontayne A, Dang PM, Gougerot-Pocidallo A, Benna JE. 2002. Phosphorylation of p47^{phox} sites by PKC : effect on binding to p22^{phox} and on NADPH oxidase activation. *Biochemistry*, 41: 7743-50.
- Gallo V, Kingsbury A, Balazs R and Jorgensen OS. 1987. The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J Neurosci*, 7:2203-13.
- Geiszt M, Witta J, Baffi J, Lekstrom K, Leto TL. 2003. Dual oxidases represent novel hydrogen peroxide sources supporting mucosal surface host defense. *FASEB J*, 11: 1502-4.
- Geiszt M, Lekstrom K, Brenner S, Hewitt SM, Dana R, Malech HL, Leto TL. 2003. NAD(P)H oxidase 1, a product of differentiated colon epithelial cells, can partially replace glycoprotein 91phox in the regulated production of superoxide by phagocytes *J Immunol*, 171: 299-306.

- Greenlund LJS, Deckwerth TL and Johnson EM 1995. Superoxide dismutase delays neuronal apoptosis: a role for reactive oxygen species in programmed neuronal death. *Neuron*, 14: 303-315.
- Golstein P. 1997. Controlling cell death. *Science*, 275: 1081-82.
- Gorman, A. M., Orrenius, S., Ceccatelli, S. 1995. Apoptosis in neuronal cells: role of caspases. *NeuroReport*, 9: R49-R55.
- Gupta R, Singh M, Sharma A. 2003. Neuroprotective effect of antioxidants on ischaemia and reperfusion-induced cerebral injury. *Pharmacol Res*, 48: 209-15.
- Halliwell B, Gutteridge JM. 1986. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys*, 246: 501-14.
- Halliwell B. 1989. Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br J Exp Pathol*, 70: 737-57.
- Halliwell, B. 1992. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem*, 59: 1609-23.
- Halliwell B. 2002. Vitamin E and the treatment and prevention of diabetes: a case for a controlled clinical trial. *Singapore Med J*, 43: 479-84.
- Harrison DG, Cai H, Landmesser U, Griendling KK. 2003. Interactions of angiotensin II with NAD(P)H oxidase, oxidant stress and cardiovascular disease. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 4: 51-61.
- Hashimoto Y, Niikura T, Ito Y, Kita Y, Terashita K, Nishimoto I. 2002. Neurotoxic mechanisms by Alzheimer's disease-linked N141I mutant presenilin 2. *J Pharmacol Exp Ther*, 300: 736-45.
- Hengartner, M. O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407: 770-776.
- Higuchi Y. 2004. Glutathione depletion-induced chromosomal DNA fragmentation associated with apoptosis and necrosis. *J Cell Mol Med*, 8: 455-64.
- Hoyal CR, Gutierrez A, Young BM, Catz SD, Lin JH, Tsihchlis PN, Babior BM. 2003. Modulation of p47PHOX activity by site-specific phosphorylation: Akt-dependent activation of the NADPH oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 5130-35.
- Hu Y, Benedict M, Wu D, Inohara N, Núñez G. 1998. Bcl-x_L interacts with Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 4386-91.
- Irani K, Goldschmidt-Clermont J. 1998. Ras, superoxide and signal transduction. *Biochem Pharmacol*, 55: 1339-46.
- Itoh S, Yanagishita T, Aoki S, Koba S, Iwata T, Ishioka H, Arata H, Mukae S, Geshi E, Konno N, Katagiri T, Utsumi H. 1999. Generation of free radicals and the damage done to

the sarcoplasmic reticulum during reperfusion injury following brief ischemia in the canine heart. *Jpn Circ J*, 5: 373-8.

- Kamata H, Hirata H. 1999. Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal*, 11: 1-14.
- Kingsbury A, Balazs R. 1987. Effect of calcium agonists and antagonists on cerebellar granule cells. *Eur J Pharmacol*, 140: 275-83.
- Kim MJ, Shin KS, Chung YB, Jung KW, Cha CI, Shin DH. 2005. Immunohistochemical study of p47Phox and gp91Phox distributions in rat brain. *Brain Res*, 1040: 178-86.
- Knapp LT, Klann E. 2002. Role of reactive oxygen species in hippocampal long-term potentiation: contributory or inhibitory? *J Neurosci Res*, 70: 1-7.
- Kojo S. 2004. Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. *Curr Med Chem*, 11: 1041-64.
- Kowaltowski A, Vercesi A. 1999. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 26: 463-71.
- Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon. 1998. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol*, 60: 619-642.
- Kruman II, Mattson M. 1999. Pivotal role of mitochondrial calcium uptake in neuronal cell apoptosis and necrosis. *J Neurochem*, 72: 529-540.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-5.
- Lambeth JD, Cheng G, Arnold RS, Edens WE. 2000. Novel homologs of gp91phox. *Trends Biochem Sci*, 29: 459-416.
- Lambeth JD. 2004. Nox enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature*, 4: 181-189.
- Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. 2000. *Principles of Biochemistry*. Worth Publish. Sec. Edit. NY, USA. Chapter11, pag. 306.
- Li PF, Dietz R, von Harsdorf R. 1999. p53 regulates mitochondrial membrane potential through reactive oxygen species and induces cytochrome c-independent- apoptosis by Bcl-2. *EMBO J*, 18: 6027-36.
- Li JM, Shah AM. 2003. ROS generation by nonphagocytic NADPH oxidase: potential relevance in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 14:S221-6.
- Lockshin RA, Osborne B, Zakeri Z. 2000. Cell death in the third millennium. *Cell Death Differ*, 7: 2-7.
- Mahadev K, Motoshima H, Wu X, Ruddy JM, Arnold RS, Cheng G, Lambeth JD, Goldstein BJ. 2004. The NAD(P)H oxidase homolog Nox 4 modulates insulin-stimulated

generation of H₂O₂ and plays an integral role in insulin signal transduction. *Mol Cell Biol*, 24: 1844-54.

- Maly FE. 1990. The B lymphocyte: a newly recognized source of reactive oxygen species with immunoregulatory potential. *Free Radic Res Commun*, 8: 143-8.

- Manev H, Cagnoli C, Atabay C, Kharlamov E, Iconomovic M. 1995. Neuronal apoptosis in an in vitro model of photochemically induced oxidative stress. *Exp Neurol*, 133: 198-206.

- Mannick JB, Hausladen A, Liu L, Hess DT, Zeng M, Miao QX, Kane LS, Gow AJ, Stamler JS. 1999. Fas-induced caspase denitrosylation. *Science*, 284: 651-4.

- Martín-Romero FJ, García-Martín E, Gutiérrez-Merino C. 2002. Inhibition of oxidative stress produced by plasma membrane NADH oxidase delays low-potassium-induced apoptosis of cerebellar granule cells. *J Neurochem*, 82: 705-715.

- Martin SJ, Green DR. 1995. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell*, 82: 349-352.

- Martinez GR, Loureiro AP, Marques SA, Miyamoto S, Yamaguchi LF, Onuki J, Almeida EA, Garcia CC, Barbosa LF, Medeiros MH, Di Mascio P. 2003. Oxidative and alkylating damage in DNA. *Mutat Res*, 544: 115-27.

- Meier B, Radeke HH, Selle S, Habermehl GG, Resch K, Sies H. 1990. Human fibroblasts release low amounts of reactive oxygen species in response to the potent phagocyte stimulants, serum-treated zymosan, N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine, leukotriene B₄ or 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 371: 1021-5.

- Mizuki K, Kadomatsu K, Hata K, Ito T, Fan QW, Kage Y, Fukumaki Y, Sakaki Y, Takeshige K, Sumimoto H. 1998. Functional modules and expression of mouse p40(phox) and p67(phox), SH3-domain-containing proteins involved in the phagocyte NADPH oxidase complex. *Eur J Biochem*, 251: 573-82.

- Morán J, Patel AJ. 1989a. Effect of potassium depolarization on phosphate-activated glutaminase activity in primary cultures of cerebellar and granule neurons and astroglial cells during development. *Dev Brain Res*, 46: 97-105.

- Morán J, Itoh T, Reddy U, Chen M, Alnemri E y Pleasure D. 1999a. Caspase-3 expression by cerebellar granule neurons is regulated by calcium and cyclic AMP. *J Neurochem*, 73: 568-577.

- Moreno JC, Bikker H, Kempers MJ, van Trotsenburg AS, Baas F, de Vijlder JJ, Vulsma T, Ris-Stalpers C. 2002. Inactivating mutations in the gene for thyroid oxidase 2 (THOX2) and congenital hypothyroidism. *N Engl J Med*, 347: 95-102.

- Moreno G, Poussini K, Ricchelli F, Salet C. 2001. The effect of singlet oxygen produced by photodynamic action on the mitochondrial permeability transition differ in accordance with the localization of the sensitizer. *Arch Biochem Biophys*, 386: 243-50.
- Murrell GA, Francis MJ, Bromley L. 1990. Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals. *Biochem J*, 265: 659-65.
- Nachmias B, Ashhab Y, Ben-Yehuda D. 2004. The inhibitor of apoptosis protein family (IAPs): an emerging therapeutic target in cancer. *Semin Cancer Biol*, 14: 231-43.
- Nardi N, Avidan G, Daily D, Zilkha-Falb R, Brazilai A. 1997. Biochemical and temporal analysis of events associates with apoptosis induced by lowering the extracellular potassium concentration in mouse cerebellar granule neurons. *J Neurochem*, 68: 750-759.
- Nicholls DG, Budd SL. 2000. Mitochondria and neuronal survival. *Physiol Rev*, 80: 315-360.
- Noh KM, Koh JY. 2000. Induction and activation by zinc of NADPH oxidase in cultured cortical neurons and astrocytes. *J Neurosci*, 20: RC111, 1-5.
- Nuydens R, Dispersyn G, van Den Kieboom G, Jong M, Connors R, Ramaekers F, Borgers M, Geerts H. 2000. Bcl-2 protects against apoptosis-related microtubule alterations in neuronal cells. *Apoptosis*, 5: 43-51.
- Oppenheim R, Prevette D, Tytell M, Homma S. 1990. Naturally occurring and induced neuronal death in the chick embryo in vivo requires protein and RNA synthesis: evidences for the role of cell death genes. *Dev Biol*, 138: 104.
- Overbeeke R, Yildirim M, Reutelingsperger CPM, Haanen C, Vermes I. 1999. Sequential occurrence of mitochondrial and plasma membrane alterations, fluctuations in cellular Ca^{2+} and pH during initial and later phase of cell death. *Apoptosis*, 4: 455-460.
- Paffenholz R, Bergstrom RA, Pasutto F, Wabnitz P, Munroe RJ, Jagla W, Heinzmann U, Marquardt A, Bareiss A, Laufs J. 2004. Vestibular defects in head-tilt mice result from mutations in Nox3, encoding a NADPH oxidase. *Genes Dev*, 18: 486-491.
- Paravicini TM, Chrissobolis S, Drummond GR, Sobey CG. 2004. Increased NADPH-oxidase activity and Nox4 expression during chronic hypertension is associated with enhanced cerebral vasodilatation to NADPH in vivo. *Stroke*, 35: 584-9.
- Pearson H, Graham ME, Burgoyne RD. 1992. Relationship between intracellular free calcium concentration and NMDA-induced cerebellar granule cell survival in vitro. *Eur J Neurosci*. 4: 1369-75.

- Petersén Á, Castilho RF, Hansson O, Wieloch T, Brundin P. 2000. Oxidative stress, mitochondrial permeability transition and activation of caspases in calcium ionophore A23187-induced death of cultured striatal neurons. *Brain Res*, 857: 20-29.
- Rappolee DA, Mark D, Banda MJ, Werb Z. 1988. Wound macrophages express TGF-alpha and other growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping. *Science*, 241: 708-12.
- Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Lopez-Burillo S, Sainz RM, Mayo JC. 2003. Melatonin: detoxification of oxygen and nitrogen-based toxic reactants. *Adv Exp Med Biol*, 527: 539-48.
- Ricciarelli R, Zingg JM, Azzi A. 2001. Vitamin E 80th anniversary: a double life, not only fighting radicals. *IUBMB Life*, 52: 71-6.
- Sakaguchi N, Inoue M, Ogihara Y. 1998. Reactive oxygen species and intracellular Ca²⁺, common signals for apoptosis induced by gallic acid. *Biochem Pharmacol*, 55: 1973-81.
- Salet C, Moreno G, Ricchelli F, Bernardi P. 1997. Singlet oxygen production by photodynamic action causes inactivation of the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem*, 272: 21938-43.
- Salvesen, G. S., Dixit, V. M. 1999. Caspase activation: The induced-proximity model. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 96: 10964–67.
- Salvesen, G. S., Duckett, C. S. 2002. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3: 401-10.
- Samali A, Nordgren H, Zhivotovzky B, Peterson E, Orrenius S. 1999. A comparative study of apoptosis and necrosis in HepG2 cells: oxidant-induced caspase inactivation leads to necrosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 255: 6-11.
- Satoh T, Numakawa T, Abiru Y, Yamagata T, Ishikawa Y, Enokido Y and Hatanaka H. 1998. Production of reactive oxygen species and release of L-glutamate during superoxide anion-induced cell death of cerebellar granule neurons. *J Neurochem*, 70: 316-324
- Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J. 2001. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem*, 11: 173-86.
- Schulz JB, Weller M, Klockgether T. 1996. Potassium deprivation-induced apoptosis in cerebellar granule neurons: a sequential requirement for new mRNA and protein synthesis, ICE-like protease activity, and reactive oxygen species. *J Neurosci*, 16: 4696-06.
- Serrano F, Kolluri NS, Wientjes FB, Card JP, Klann E. 2003. NADPH oxidase immunoreactivity in the mouse brain. *Brain Res*, 988: 193-8.

- Shi, Y. 2002. Mechanisms of caspase inhibition and activation during apoptosis. *Mol. Cell*, 9: 459–70.
- Shi, Y. 2004. Caspase activation, inhibition, and reactivation: A mechanistic view. *Protein Science*, 13: 1979-87.
- Shimohama S, Tanino H, Nawakami T, Okamura N, Kodama H, Yamaguchi T, Hayakawa T, Nonumura A, Chiba S, Perry G, Smith M, Fujimoto S. 2000. Activation of NADPH oxidase in Alzheimer's disease brains. *Biochem Biophys Res Comm*, 273: 5-9.
- Shpungin S, Dotan I, Abo A, Pick E. 1989. Activation of the superoxide forming NADPH oxidase in a cell-free system by sodium dodecyl sulfate. Absolute lipid dependence of the solubilized enzyme. *J Biol Chem*, 264: 9195-203.
- Stadtman ER, Berlett BS. 1998. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Drug Metab Rev*, 30: 225-43.
- Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D, Chung AB, Griending KK, Lambeth JD. 1999. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox 1. *Nature*, 401: 79-82.
- Takeya R, Ueno N, Kami K, Taura M, Kohjima M, Izaki T, Nuno H, Sumimoto H. 2003. Novel human homologues of p47phox and p67phox participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *J Biol Chem*, 278: 25234-46.
- Tammariello S, Quinn M, Estus S. 2000. NADPH oxidase contributes directly to oxidative stress and apoptosis in nerve growth factor-deprived sympathetic neurons. *J Neurosci*, 20: 1-5.
- Tejada-Simon MV, Serrano F, Villasana LE, Kanterewicz BI, Wu GY, Quinn MT, Klann E. 2005. Synaptic localization of a functional NADPH oxidase in the mouse hippocampus. *Mol Cell Neurosci*, 29: 97-106.
- Thiels E, Urban NN, Gonzalez-Burgos GR, Kanterewicz BI, Barrionuevo G, Chu CT, Oury TD, Klann E. 2000. Impairment of long-term potentiation and associative memory in mice that overexpress extracellular superoxide dismutase. *J Neurosci*, 20: 7631-9.
- Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molineaux SM, Weidner JR, Aunins J, *et al.* 1992. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature*, 356: 768-74.
- Thornberry NA. 1994. Interleukin-1 beta converting enzyme. *Methods Enzymol*, 244: 615-31.
- Thornberry, N., Lazebnik, Y. 1998. Caspases: Enemies within. *Science*, 281: 1312-6

- Ueda S, Masutani H, Nakamura H, Tanaka T, Ueno M, Yodoi J. 2002. Redox control of cell death. *Antiox Red Sig*, 4: 405-14.
- Valencia A, Morán J. 2001. Role of oxidative stress in the apoptotic cell death of cultured cerebellar granule neurons. *J Neurosci Res*, 64: 284-97.
- Valencia A, Moran J. 2004. Reactive oxygen species induce different cell death mechanisms in cultured neurons. *Free Radic Biol Med*, 36: 1112-25.
- Vallet P, Charnay Y, Steger K, Ogier-Denis E, Kovari E, Herrmann F, Michel JP, Szanto I. 2005. Neuronal expression of the NADPH oxidase NOX4, and its regulation in mouse experimental brain ischemia. *Neuroscience*, 132: 233-8.
- Verhagen, A. M., Ekert, P. G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L. M., Reid, G. E., Moritz, R. L., Simpson, R. J., Vaux, D. L. 2000. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*, 102: 43–53.
- Walker NP, Talanian RV, Brady KD, Dang LC, Bump NJ, Ferez CR, Franklin S, Ghayur T, Hackett MC, Hammill LD, *et al.* 1994. Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer. *Cell*, 78: 343-52.
- Walder CE, .1997. Ischemic stroke injury is reduced in mice lacking a functional NADPH oxidase. *Am Heart Ass*, 28: 2252.
- Yang S, Madyastha P, Bingel S, Ries W, Key L. 2001. A new superoxide-generating oxidase in murine osteoclasts. *J Biol. Chem*, 276: 5452-58.
- Zekry D, Epperson TK, Krause KH. 2003. A role for NOX NADPH oxidases in Alzheimer`s disease and other types of dementia?. *IUBMB Life*, 55: 307-13.
- Zhang Y, Marcillat O, Giulivi C, Ernster L, Davies KJ. 1990. The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase. *J Biol Chem*, 265: 16330-6.
- Zhou H, Duncan RF, Robinson TW, Gao L, Forman HJ. 1997. Ca²⁺-dependent p47phox translocation in hydroperoxide modulation of the alveolar macrophages respiratory burst. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol*, 273: L1042-L1047.
- Zhuang S, Lynch M, Kochevar IE. 1998. Activation of protein kinase C is required for protection of cells against apoptosis induced by singlet oxygen. *FEBS Letters*, 437: 158-162.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxiribonucleico
AEBSF	Fluoruro de 4-(2-aminoetil) benceno sulfonil
AP-1	Proteína activadora 1
Apaf-1	Factor apoptótico activador de proteasas
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Trifosfato de adenina
BMK1-MAP	Cinasa Big 1
BPV1E2	Papiloma virus E2 bovino tipo1
Ca ²⁺	Ion calcio
CGC	Células granulares de cerebelo
CO ₃ ⁻	Carbonato
Cit c	Citocromo c
DAG	Diacilglicerol
DMSO	Dimetil sulfóxido
DISC	Complejo de señalización inductor de la muerte
DIV	Días <i>in vitro</i>
DPI	Difenilenoiodonio
EGF	Factor de crecimiento epidermal
EOR	Especies de oxígeno reactivas
FAD	Dinucleótido de flavinadenina
FMLP	N-formil-metionina-leucina-fenilalamina
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa
GR	Receptor glucocorticoide
GSH	Glutación
GTP	Guanosina trifosfato
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogeno
HO ₂ [·]	Radical hidroxiperil ácido
IAP	Proteínas inhibidoras de apoptosis
Ins(1,4,5)P3	Inositol 1,4,5-trifosfato
JNK	Cinasa N-terminal c-jun
K25	25 mM de KCl
K5	5 mM de KCl
LPS	Lipopolisacaridos
LTB4	Leucotrieno B4
LTP	Potenciación de largo plazo
MAP	Proteína cinasa activada por mitógenos
NF	Factor nuclear
MTT	3-(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio
MQ	Macrófagos de médula ósea
NF κB	Factor nuclear κB
NGC	Neuronas granulares de cerebelo
NGF	Factor de crecimiento neural
NOX	NADPH-oxidasa
O ₂ ⁻	Anión superóxido
¹ O ₂	Oxígeno singulete
OH [·]	Radical hidroxilo
PAF	Factor activador de plaquetas
PARP	Poli-ADP ribosa polimerasa

PBS	Amortiguador de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
Pi	Fósforo iorgánico
PI	Fosfatidilinositol
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PLA2	Fosfolipasa A2
PLC	Fosfolipasa C
PLD	Fosfolipasa D
PMA	Acetato miristato forbol
PP	Fosfatasa de proteínas
PS	Fosfatidilserina
PTKs	Proteínas cinasas de tirosina
RI	Riñón
RO [·]	Radical acoxilo
RO ₂ [·]	Radical peroxilo
RSH	Grupos sulfidrilos
RT	Transcripción reversa
SNC	Sistema nervioso central
SOD	Superóxido dismutasa
ST	Estaurosporina
TRX	Tiorredoxina
U1-70 KDa	Ribonucleoproteína nuclear pequeña
UT	Útero
UV	Luz ultravioleta
VDAC	Canal aniónico dependiente de voltaje
PVDF	Difluoruro de polivinilideno
ZAP	Polipéptido asociado de 70 KDa