



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UN/M
POSGRADO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

**PAPEL DEL METABOLISMO ENERGÉTICO
Y EL ESTRÉS OXIDATIVO SOBRE EL TIPO
DE MUERTE DE NEURONAS GRANULARES
DE CEREBELO EN CULTIVO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO
DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS
(BIOQUÍMICAS)**

P R E S E N T A:

PAOLA MAYCOTTE GONZÁLEZ

TUTOR: DR. JULIO MORÁN ANDRADE



MÉXICO, D. F.

Junio, 2009.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PAPEL DEL METABOLISMO ENERGÉTICO Y EL ESTRÉS OXIDATIVO SOBRE EL TIPO DE MUERTE DE NEURONAS GRANULARES DE CEREBELO EN CULTIVO

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis doctoral se realizó bajo la dirección del Dr. Julio Morán Andrade en el laboratorio BL-302 de la División 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. Julio Morán Andrade	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dra. Lourdes Massieu Trigo	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dra. Susana Castro Obregón	Instituto de Biotecnología, UNAM

Se reconoce el apoyo técnico de la Biol. Guadalupe Domínguez Macouzet en la elaboración de los cultivos utilizados en este trabajo.

El proyecto fue apoyado parcialmente por CONACYT (79788) y DGAPA-UNAM (IN223107). Durante los estudios de doctorado gocé de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis.

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Clorinda Arias Alvarez	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Vocal	Dra. Rocío Salceda Sacanelles	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dra. Susana Castro Obregón	Instituto de Biotecnología, UNAM
Suplente	Dra. Ma. Elena Ibarra Rubio	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dra. Rosa E. Navarro González	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Agradecimientos

Este trabajo se realizó en el laboratorio BL-302 en la División de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, bajo asesoría del Dr. Julio Morán Andrade, a quien agradezco de manera especial por su apoyo e interés en este trabajo.

Agradezco a mis sinodales: Dra. Clorinda Arias Alvarez, Dra. Rocío Salceda Sacanelles, Dra. Susana Castro Obregón, Dra. Ma. Elena Ibarra Rubio y Dra. Rosa E. Navarro González por sus valiosos comentarios en la revisión de esta tesis.

Agradezco también a los miembros de mi comité tutorial, el Dr. Julio Morán Andrade, la Dra. Lourdes Massieu Trigo y la Dra. Susana Castro Obregón por sus comentarios, consejos y recomendaciones para la elaboración de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, por todos los buenos momentos.

A las niñas, su amistad es lo mejor que me llevo de estos 6 años. Ya las estoy extrañando.

Al departamento de Microscopía del IFC, por ser tan buena compañía durante todo este tiempo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A mi mamá, mi mejor ejemplo.

A mi Tita y a mi Abue, que están siempre conmigo.

A mi familia,

A mis amigos, porque es un verdadero placer compartir la vida con ustedes,

A Javier, la mejor parte de mis días.

ÍNDICE

Resumen	1
Abstract	2
Abreviaturas	2
Introducción	3
Antecedentes	
Tipos de Muerte Celular	5
a. Apoptosis	5
b. Autofagia	8
c. Necrosis	12
d. Otras Formas de Muerte Celular	14
Muerte Neuronal Programada	15
Cultivo de Neuronas Granulares (NGC) de Cerebelo de Rata	19
Definición del Tipo de Muerte Neuronal Programada	21
a. El Metabolismo Energético y la Forma de Muerte Neuronal	21
b. La Importancia del Metabolismo Oxidativo en la Forma de Muerte Neuronal	27
Planteamiento del Problema	31
Hipótesis	31
Objetivo General	32
Objetivos Específicos	32
Materiales y Métodos	33
Resultados	
I. Determinación del Tipo de Muerte de NGC Sometidas a Distintos Tratamientos Inductores de Muerte	37
a. Viabilidad	37
b. Condensación Nuclear y Fragmentación Internucleosomal	39
c. Permeabilización de la Membrana Plasmática	41
d. Tinción con Monodansilcaverina (MDC)	42
e. Microscopía Electrónica de NGC Sometidas a Distintos Tratamientos Inductores de Muerte	44
f. Concentración de ATP en NGC Sometidas a Distintos Tratamientos Inductores de Muerte	46
g. Producción de ERO en NGC Sometidas a Distintos Tratamientos	47
II. Papel de la Apoptosis y la Autofagia en Cada uno de los Tratamientos de Muerte	49

a. Viabilidad de NGC Utilizando K5 y STS como Inductores de Muerte así como Inhibidores de Muerte Apoptótica y Autofágica	49
b. Efecto de los Inhibidores de la Apoptosis y de la Autofagia Sobre las Características Apoptóticas	51
c. Efecto de los Inhibidores de la Apoptosis y de la Autofagia Sobre las Características Autofágicas	53
III. Participación del Estrés Oxidativo en el Tipo de Muerte de NGC	56
IV. Papel del Metabolismo Energético en el Tipo de Muerte de NGC Tratadas con K5 o STS	59
Discusión	63
Resumen de Resultados	67
Conclusiones	70
Perspectivas ..	71
Referencias ..	72

Anexos: Trabajos publicados

- I. Apoptosis and Autophagy in Cerebellar Granule Neuron Death: Role of Reactive Oxygen Species.
El trabajo se encuentra en prensa en el Journal of Neuroscience Research, por lo cual anexamos la versión final del artículo.

RESUMEN

La muerte celular programada (MCP) se define como un proceso activo y controlado en el que las células participan en su propio deceso. La apoptosis, o el tipo I de MCP, ha sido ampliamente caracterizada, tanto morfológica como bioquímicamente. Más recientemente, la autofagia, el mecanismo de auto-digestión involucrado en la remoción de proteínas de larga vida en el citoplasma, se ha involucrado en la muerte celular y el tipo II de MCP se define como muerte celular que ocurre con características autofágicas. Las neuronas pueden sufrir más de un tipo de MCP, ya sea como mecanismo de respaldo cuando la vía tradicional se inhibe, o en respuesta a un estímulo particular de muerte. Las especies reactivas de oxígeno (ERO) han demostrado ser moléculas de señalización importantes en la ejecución de la apoptosis y más recientemente, en la vía autofágica. Por otro lado, los niveles intracelulares de ATP parecen tener un papel importante en la definición de la apoptosis y necrosis, además de que la autofagia es un proceso que depende y que puede producir ATP.

En este trabajo, caracterizamos la muerte celular apoptótica y autofágica en neuronas granulares de cerebelo (NGC) en cultivo, un modelo muy utilizado para el estudio de la muerte neuronal. Para inducir muerte se utilizaron la privación de potasio (K5) y el tratamiento con estaurosporina (STS). Encontramos características de apoptosis y de autofagia en ambas condiciones. La inhibición de las caspasas así como el inhibidor de la autofagia 3-metil adenina (3MA) disminuyeron la muerte celular. Además, las NGC pueden sufrir un tipo de muerte alterno cuando el otro se ve inhibido. Un antioxidante o inhibidores de la NADPH oxidasa, retrasaron la apoptosis y no tuvieron ningún efecto sobre las características autofágicas. Por lo tanto, encontramos que la autofagia juega un papel en la muerte de las NGC y que cuando las células se tratan con K5 o STS, tanto la autofagia como las ERO parecen promover la apoptosis por mecanismos independientes. Finalmente, encontramos que el mantener los niveles de ATP en las NGC parece no ser necesario para la aparición de las características apoptóticas, mientras que una depleción sostenida de ATP si promueve necrosis, particularmente cuando se inhibe la glicólisis. Falta por estudiar el papel del nivel intracelular de ATP en las características autofágicas.

ABSTRACT

Programmed cell death (PCD) has been defined as an active, controlled process in which cells participate in their own demise. Apoptosis, or type I PCD, has been widely characterized, both morphologically and biochemically. More recently, autophagy, the self-digesting mechanism involved in the removal of cytoplasmic long-lived proteins, has been involved in cell death and type II PCD is defined as cell death occurring with autophagic features. Neurons can undergo more than one type of PCD as a backup mechanism when the traditional death pathway is inhibited, or in response to a particular death inducing stimulus. Reactive oxygen species (ROS) have shown to be important signaling molecules in the execution of apoptosis and more recently, in the autophagic pathway. On the other hand, intracellular ATP levels have an important role in the definition of apoptosis and necrosis. Moreover, autophagy is a process that depends on ATP and that produces it.

In this work, we characterized apoptotic and autophagic cell death in rat cerebellar granule neuron (CGN) culture, a widespread model for the study of neuronal death. Potassium deprivation (K5) and staurosporine (STS) were used for death induction. We found apoptotic and autophagic features under both conditions. Caspase inhibition as well as autophagy inhibition by 3-methyl adenine (3MA) decreased cell death. Moreover, CGN can undergo the alternative type of cell death when the other one is inhibited. An antioxidant or NADPH oxidase inhibitors, delayed apoptosis and had no effect in autophagic features. Thus, we found that autophagy plays a role in cell death of CGN and that when cells are treated with K5 or STS, both autophagy and ROS seem to promote apoptosis by independent mechanisms. Finally, we found that maintenance of ATP levels in CGN is not necessary for apoptotic feature appearance, while a continuous depletion of ATP does promote necrosis, particularly after glycolytic inhibition. If intracellular ATP levels have a role on autophagic feature appearance remains to be established.

ABREVIATURAS

MCP, muerte celular programada; ERO, especies reactivas de oxígeno; NGC, neuronas granulares de cerebelo; PCD, programmed cell death; ROS, reactive oxygen species; CGN, cerebellar granule neuron; DISC, death inducing signaling complex; PARP, poli (ADP-ribosa) polimerasa; ICAD, caspase activated DNase inhibitor; Apaf-1, apoptosis protease activating factor-1, PAS, estructura pre-autofagosomal; ERN,

especies reactivas de nitrógeno; SNC, sistema nervioso central; DIV, días *in Vitro*; difenilen iodonio, DPI; 4-(2-aminoetil) bencen sulfonil fluoruro (AEBSF), AE; MnTMPyP, MN.

INTRODUCCIÓN

La muerte celular programada (MCP) ha sido ampliamente estudiada y se sabe que ocurre en procesos fisiológicos y patológicos. Se observó inicialmente durante la metamorfosis y después se describió su importancia durante el desarrollo y en la remodelación de tejidos [1]. La MCP se definió inicialmente como apoptosis, que en griego significa “la caída de los pétalos de las flores o de las hojas de los árboles”, y se definió morfológicamente como un proceso en el que tanto el núcleo como el citoplasma se condensan y en el que la célula es removida por fagocitosis. Otras células, que se hinchan y se rompen, muriendo como resultado de un daño intenso como un trauma o isquemia, se denominaron necróticas [2]. La genética y bioquímica de la apoptosis se han estudiado intensamente, y ahora sabemos que la mayoría de las células tienen la capacidad de pasar por este proceso de MCP cuando se requiere.

Se han descrito también células que mueren de manera programada con características no apoptóticas, lo que llevó a la definición de más de un tipo de MCP. Algunas veces se observa más de una forma de MCP en el mismo tejido, como las células del epitelio del paladar del embrión de la rata durante su cierre, donde algunas mueren apoptóticamente mientras que otras mueren de otra forma de MCP denominada autofagia [3]. En otras situaciones, una forma de MCP reemplaza a la otra, como en un modelo murino en el que las caspasas, las ejecutoras centrales de la apoptosis se han eliminado. Estos ratones mueren con malformaciones severas en el cerebro frontal debido a la falta de apoptosis neuronal, pero muestran un número normal de células en otras áreas del sistema nervioso, donde las neuronas aparentemente mueren por un tipo de MCP no apoptótico [4].

Aunque inicialmente se pensaba que la severidad del daño determinaba si una célula muere apoptótica o necróticamente, esto no explicaba los otros tipos de MCP. Hasta ahora, algunos factores se han implicado en lo que podría ser lo que determina que una célula muera de una forma o de otra. Los niveles intracelulares de ATP pueden ser uno de estos factores. La disminución de ATP después de la exposición a un agente inductor de apoptosis puede evitar la activación de las caspasas y producir una morfología necrótica [5, 6]. Además, durante la apoptosis ocurren procesos dependientes de ATP como la formación del apoptosoma [7], durante el proceso autofágico se han involucrado proteínas sensoras de ATP [8], y una pérdida dramática en el ATP intracelular parece resultar en una morfología necrótica [9, 10].

Por otro lado, las especies reactivas de oxígeno (ERO) también se han implicado en algunos modelos de muerte celular [11-13]. El tipo de ERO [14], su concentración [15], así como el estado de los sistemas antioxidantes celulares [9] pueden inducir apoptosis o necrosis. Además, también se ha propuesto un papel importante de las ERO, especialmente las producidas por la mitocondria, en la regulación de la autofagia [16].

En este trabajo se evaluó la contribución de la concentración intracelular de ATP así como del estado oxidante de la célula sobre el tipo de muerte que se presenta en un modelo muy estudiado de MCP como son las neuronas granulares de cerebelo (NGC) de rata en cultivo.

ANTECEDENTES

Tipos de Muerte Celular

a. Apoptosis

El tipo I de MCP [3], o apoptosis es la más estudiada. Se definió en 1972 por Kerr, Wyllie y Currie como un tipo de muerte en el que las células se encogen, el núcleo se condensa y la cromatina se fragmenta (pyknosis), la membrana celular adquiere una forma parecida a una estrella y la célula finalmente se desintegra en fragmentos más pequeños llamados cuerpos apoptóticos que finalmente son removidos por heterofagocitosis. Esta remoción de los remanentes celulares evita las complicaciones que se provocarían por la liberación del contenido intracelular al medio extracelular. Ahora se conoce que ocurren una serie de eventos bioquímicos durante la apoptosis, como la exposición de la fosfatidilserina al exterior de la membrana plasmática como señal de fagocitosis; la segmentación del DNA en fragmentos internucleosomales; y la activación de una familia de proteasas de cisteína conocidas como caspasas (de proteasas de cisteína específicas para aspártico), que junto con sus reguladores se identificaron inicialmente en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* [1, 3, 17, 18].

Desde el descubrimiento de CED-3 en *C. elegans* y su homólogo de mamífero la caspasa-1, se han descrito 12 caspasas en el genoma humano y 10 en el ratón [17]. Las caspasas 1, 2, 8, 9, 10 y 12 tienen un prodominio largo que facilita su unión a proteínas adaptadoras y se conocen como iniciadoras. Las caspasas-8 y 10 se activan en respuesta a la unión de un ligando a su receptor de muerte (TNFR, Fas o DR 3, 4, 5 y 6) en una vía conocida como la vía extrínseca de la apoptosis (Figura 1). La oligomerización a través de proteínas adaptadoras en un complejo conocido como DISC (Death Inducing Signaling Complex) activa a las caspasas iniciadoras que a su vez proteolizan y activan a las caspasas efectoras (caspasas-3, 6 y 7). Del mismo modo, la caspasa-9 se oligomeriza con Apaf-1, dATP y el citocromo-c en el apoptosoma después de que el citocromo-c se ha liberado de la mitocondria, comenzando la vía intrínseca de la apoptosis (Figura 1). Esta vía puede activarse por varias señales de estrés, como p53, c-Myc, daño al DNA, agentes quimioterapéuticos, privación de suero y radiación UV [19]. El papel de la caspasa-2 como caspasa iniciadora no está claro, forma un complejo conocido como el PIDDosoma en respuesta a estrés genotóxico, pero su papel en la muerte es todavía controversial [20]. La caspasa-12 se encuentra en la membrana del retículo endoplásmico (RE) y se cree que se activa en respuesta a estrés del RE por

calpaína [21]. Finalmente, la caspasa-1 no parece estar involucrada en la apoptosis, regula el procesamiento y secreción de citocinas inflamatorias y también forma un complejo oligomérico conocido como el inflamosoma [22], aunque también se ha reportado un posible papel de la caspasa-1 como caspasa iniciadora en células hematopoyéticas de ratones deficientes de Apaf-1 o en macrófagos infectados con *Shigella* o *Salmonella* [23].

Las caspasas iniciadoras a su vez pueden activar a las caspasas efectoras. La activación comprende un procesamiento proteolítico entre dominios, seguido por la asociación de las subunidades grande y pequeña para formar un hetero tetrámero con dos sitios catalíticos. Las caspasas activas contribuyen a la apoptosis proteolizando otras caspasas y estructuras celulares. Los sustratos de las caspasas efectoras incluyen proteínas estructurales como la lamina nuclear, proteínas del citoesqueleto, proteínas antiapoptóticas como Bcl-2, proteínas cinasas y proteínas implicadas en la transducción de señales, enzimas que modifican la cromatina y proteínas reparadoras del DNA como PARP y subunidades inhibitorias de ciertas endonucleasas responsables de la digestión del genoma durante la apoptosis como ICAD y CIDE [17, 24].

La apoptosis está regulada por las familias de Bcl-2 y de proteínas inhibitoras de apoptosis (IAPs). Los miembros de la familia de Bcl-2, llamados así porque se descubrieron en un linfoma de células B, comparten una estructura reminiscente de la toxina diftérica, y regulan los eventos de la apoptosis dependientes de la mitocondria [17]. Las proteínas de la familia de Bcl-2 como Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, A1, Mcl-1 y varios homólogos virales tienen funciones anti-apoptóticas. Bcl-2 puede evitar el hinchamiento de la matriz mitocondrial, el daño por ERO, la liberación del citocromo-c y la pérdida de potencial de membrana mitocondrial asociada con la apoptosis. Por otro lado, los miembros pro-apoptóticos de la familia de Bcl-2 como Bax y Bak se oligomerizan en la membrana mitocondrial después de un estímulo apoptótico y contribuyen a la disfunción que lleva a la liberación del citocromo-c y proteínas apoptogénicas [23, 25]. Bax, Bak y Bok comparten tres dominios estructurales con Bcl-2 y tienen una estructura muy semejante a éste. Por otro lado, las proteínas BH-3 como Bim, Bad y Bid, sólo comparten con Bcl-2 el dominio de interacción BH-3 necesario y suficiente para su actividad apoptótica. Los miembros de esta familia, además de su actividad en la apoptosis iniciada por la mitocondria, tienen también un papel importante en la apoptosis iniciada por diversos estímulos. Bcl-2 se encuentra normalmente en la cara citoplásmica de la membrana mitocondrial externa, el retículo endoplásmico y la membrana nuclear, y los demás miembros de la familia se encuentran en una o más de estas membranas o se congregan ahí durante la apoptosis. Las proteínas BH-3 pueden sensar daño celular y antagonizar a las proteínas anti-

apoptóticas de la familia, mientras que Bax o Bak actúan posteriormente, probablemente en la perturbación a nivel de organelos [23].

Las proteínas de la familia de las IAPs se descubrieron inicialmente en el baculovirus como una defensa contra la apoptosis de la célula huésped. Hasta ahora, se han identificado 8 IAPs humanas. XIAP, c-IAP1, c-IAP2 y NAIP inhiben a las caspasas 3, 7 y 9 interactuando directamente con ellas. Estas proteínas se regulan por ubiquitinación, por regulación transcripcional y por proteínas mitocondriales inhibitoras como Smac/DIABLO y Omi/HtrA2 [26]. Otra proteína mitocondrial que contribuye a la morfología apoptótica es AIF (Apoptosis Inducing Factor), ésta se libera del espacio intermembranal de la mitocondria después de un estímulo apoptótico al citosol donde se transloca al núcleo e induce condensación de la cromatina. AIF puede inducir apoptosis en células Apaf-1 ^{-/-} y en células caspasa-3 ^{-/-}, lo que muestra su importancia en la MCP independiente de caspasas [18].

El proceso apoptótico ha demostrado ser importante en tejidos adultos para el mantenimiento homeostático. Durante el desarrollo, se forman numerosas estructuras que son posteriormente eliminadas por apoptosis y las células producidas en exceso también se eliminan apoptóticamente para llegar al número de células que proporciona una función normal a los órganos, como ocurre en el sistema nervioso [1]. También una deficiencia en la apoptosis puede producir patologías como el cáncer, enfermedades auto-inmunes o neurodegenerativas. Muchas células cancerígenas se caracterizan por tener mutaciones inactivantes en proteínas pro-apoptóticas y/o una regulación a la alta de proteínas anti-apoptóticas, lo que permite la evasión de la apoptosis y les confiere resistencia a los agentes quimioterapéuticos [27]. Por lo tanto, las investigaciones sobre el proceso apoptótico y su regulación han llevado a un mejor entendimiento de muchos procesos fisiológicos y patológicos, así como enfoques terapéuticos a muchas enfermedades.

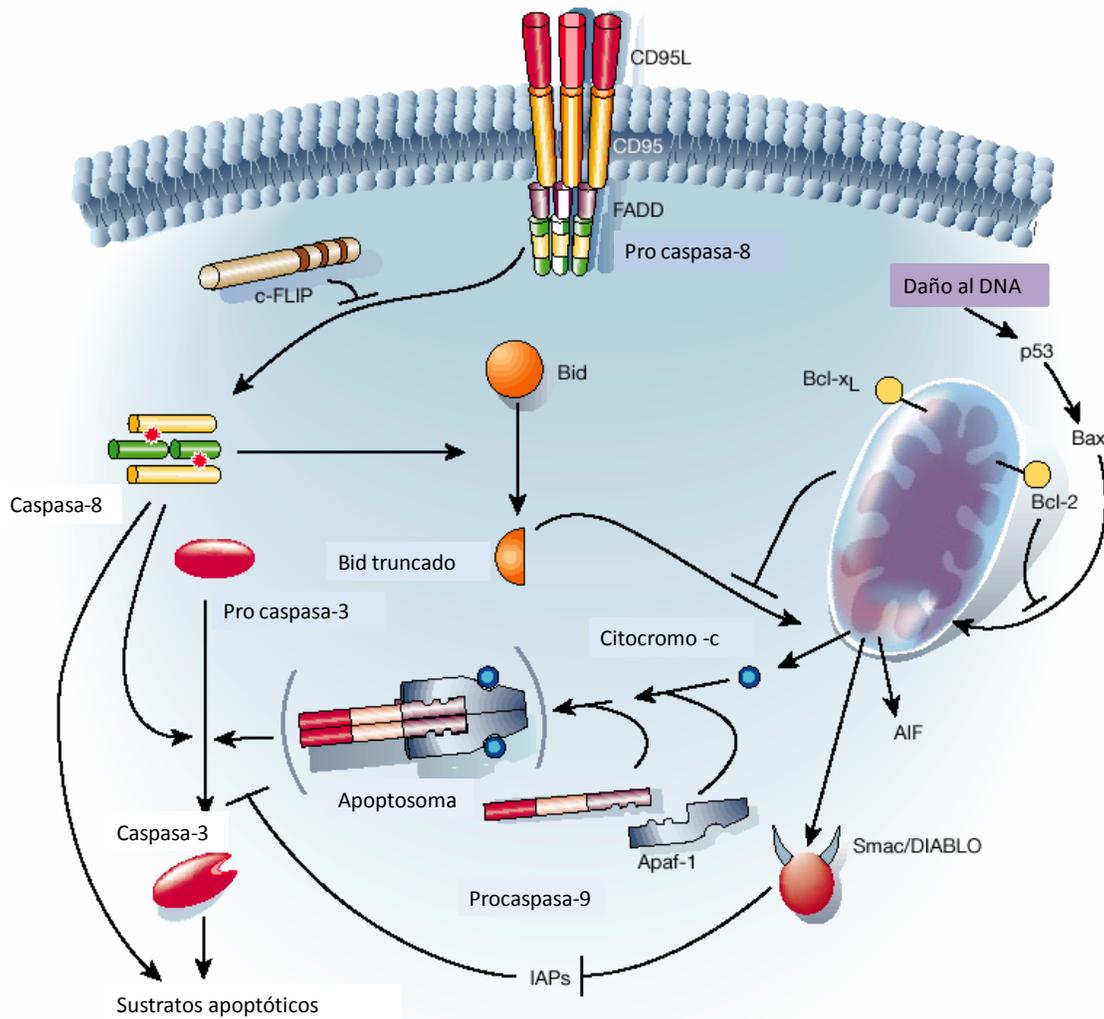


Figura 1. Vías extrínseca e intrínseca de la apoptosis. Las caspasas-8 y 10 se activan en respuesta a la unión de un ligando a su receptor de muerte (TNFR, Fas (CD95) o DR 3, 4, 5 y 6) en una vía conocida como la vía extrínseca de la apoptosis. La oligomerización a través de proteínas adaptadoras en un complejo conocido como DISC (Death Inducing Signaling Complex) activa a las caspasas iniciadoras que a su vez proteolizan y activan a las caspasas efectoras (caspasas-3, 6 y 7). Del mismo modo, la caspasa-9 se oligomeriza con Apaf-1, dATP y el citocromo-c en el apoptosoma después de que el citocromo-c se ha liberado de la mitocondria, comenzando la vía intrínseca de la apoptosis. Esta vía puede activarse por varias señales de estrés, como p53, c-Myc, daño al DNA, agentes quimioterapéuticos, privación de suero y radiación UV (tomado de [28]).

b. Autofagia

La autofagia (que en griego significa comerse a sí mismo) se refiere al proceso evolutivamente conservado que resulta en la degradación de los componentes citoplásmicos dentro de los lisosomas [29]. Es el principal mecanismo intracelular para la degradación y el reciclaje de proteínas de vida media larga así como de organelos. Se observa como respuesta a condiciones de estrés extracelular, como inanición, hipoxia, altas densidades celulares o altas temperaturas; así como a estrés intracelular, como la acumulación de organelos o componentes citoplásmicos. Así, la autofagia se identificó primero como una vía de sobrevivencia que permite a los organismos eucariontes sobrevivir a la privación de nutrientes. En los mamíferos, se cree que está involucrada en procesos fisiológicos, incluyendo inanición, crecimiento celular, mecanismos anti-envejecimiento e inmunidad innata [30].

En células de mamífero se han descrito tres formas de autofagia: microautofagia, macroautofagia y autofagia mediada por chaperonas. La micro y macroautofagia se encuentran conservadas desde las levaduras hasta los mamíferos mientras que la autofagia mediada por chaperonas es exclusiva de mamíferos [31]. En la macroautofagia, los elementos citosólicos que van a degradarse son secuestrados por una membrana de aislamiento de origen no lisosomal formando una vacuola autofágica o autofagosoma. La fusión de los lisosomas con los autofagosomas provoca la degradación de los componentes. Durante la microautofagia ocurre un proceso semejante, pero la membrana lisosomal por sí misma se deforma para engullir a los componentes del citoplasma. En la autofagia mediada por chaperonas, las proteínas citosólicas unidas a una proteína chaperona se unen selectivamente a un receptor en la membrana lisosomal que ayuda a su translocación al lumen lisosomal [29]. De los tres procesos, la macroautofagia (llamada simplemente autofagia) es la vía catabólica de generación de energía, de degradación de macromoléculas y organelos más importante en periodos de estrés o de privación de nutrientes.

El proceso autofágico se asoció con la MCP cuando se observaron células con características autofágicas en tejidos en remodelación fisiológica o en células que han sido expuestas a algún tipo de daño. Sigue siendo incierto si las características autofágicas son resultado de un proceso de sobrevivencia más que de un proceso de muerte, pero existe evidencia de que los genes involucrados en la autofagia son necesarios para la muerte celular en algunos modelos [32, 33].

El tipo 2 de MCP o muerte autofágica se caracteriza por la formación de vacuolas autofágicas, mucho más extensa que la asociada con el recambio citoplásmico en las células sanas. Puede haber deformaciones en la membrana plasmática pero las células principalmente muestran una endocitosis intensa. El núcleo es picnótico algunas veces, pero la picnosis no es tan marcada como en la apoptosis [3]. Los componentes moleculares de la autofagia (genes Atg o Apg) se identificaron inicialmente en levadura y son los responsables de la formación de vacuolas autofágicas de doble membrana, conocidos como autofagosomas que transportan contenido citoplásmico a los lisosomas para su degradación [34].

Dos sistemas parecidos al de ubiquitinación están involucrados en la formación de los autofagosomas (Figura 2): los sistemas de conjugación Atg12-Atg5 y el sistema Atg8 (Atg8/Aut7/LC-3). Atg12 se conjuga primero con Atg7 de una manera dependiente de ATP. Después, Atg12 se transfiere a Atg10 y finalmente a Atg5. Atg16 interactúa después con el conjugado Atg12-Atg5. El complejo Atg16-Atg12-Atg5 es parte de la estructura pre-autofagosomal (PAS). Atg1, Atg2, Atg8, Atg9 y Atg14 también se han encontrado en esta estructura, de la cual parecen generarse los autofagosomas. Alternativamente, la arginina C-terminal de Atg8 es removida por Atg4, una proteasa de cisteína. Después, Atg8 es activada por Atg7 y transferida a Atg3. Atg8 se une covalentemente a fosfatidiletanolamina en la glicina expuesta en un proceso parecido al de la ubiquitinación, se transfiere a la membrana de la PAS [34-36] y permanece ahí hasta la fusión con los lisosomas, donde se degrada por proteasas lisosomales [37, 38]. Atg4 puede actuar como enzima conjugante y como desconjugante; así, después del corte de Atg8, Atg4 debe inactivarse para permitir la conjugación de Atg8 al autofagosoma. Después, cuando el autofagosoma se fusiona con el lisosoma, Atg4 debe desprender el lípido y reciclar a Atg8 y este proceso parece estar regulado por ERO [39].

La fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) tipo I es un regulador negativo de la autofagia y se activa por factores de crecimiento vía el receptor de insulina (Figura 2). La activación de la PI3K tipo I promueve la fosforilación de lípidos de la membrana plasmática que reclutan y activan a Akt/PKB reprimiendo a los reguladores positivos de la autofagia, TSC1 y TSC2. TSC1 y TSC2 reprimen a la proteína G pequeña Rheb que regula a la cinasa blanco de la rapamicina (Tor, target of rapamycin). La inactivación de Tor por rapamicina o por inanición, causa la desfosforilación de Atg 13. Atg 13 y Atg 17 se asocian con la proteína cinasa Atg 1 para formar el complejo de proteína cinasa Atg 1, un complejo esencial para la autofagia. Atg 13 desfosforilada aumenta la actividad de cinasa de Atg 1 [8, 34, 35]. Por el contrario, la PI3K tipo III estimula la autofagia. Los precursores de

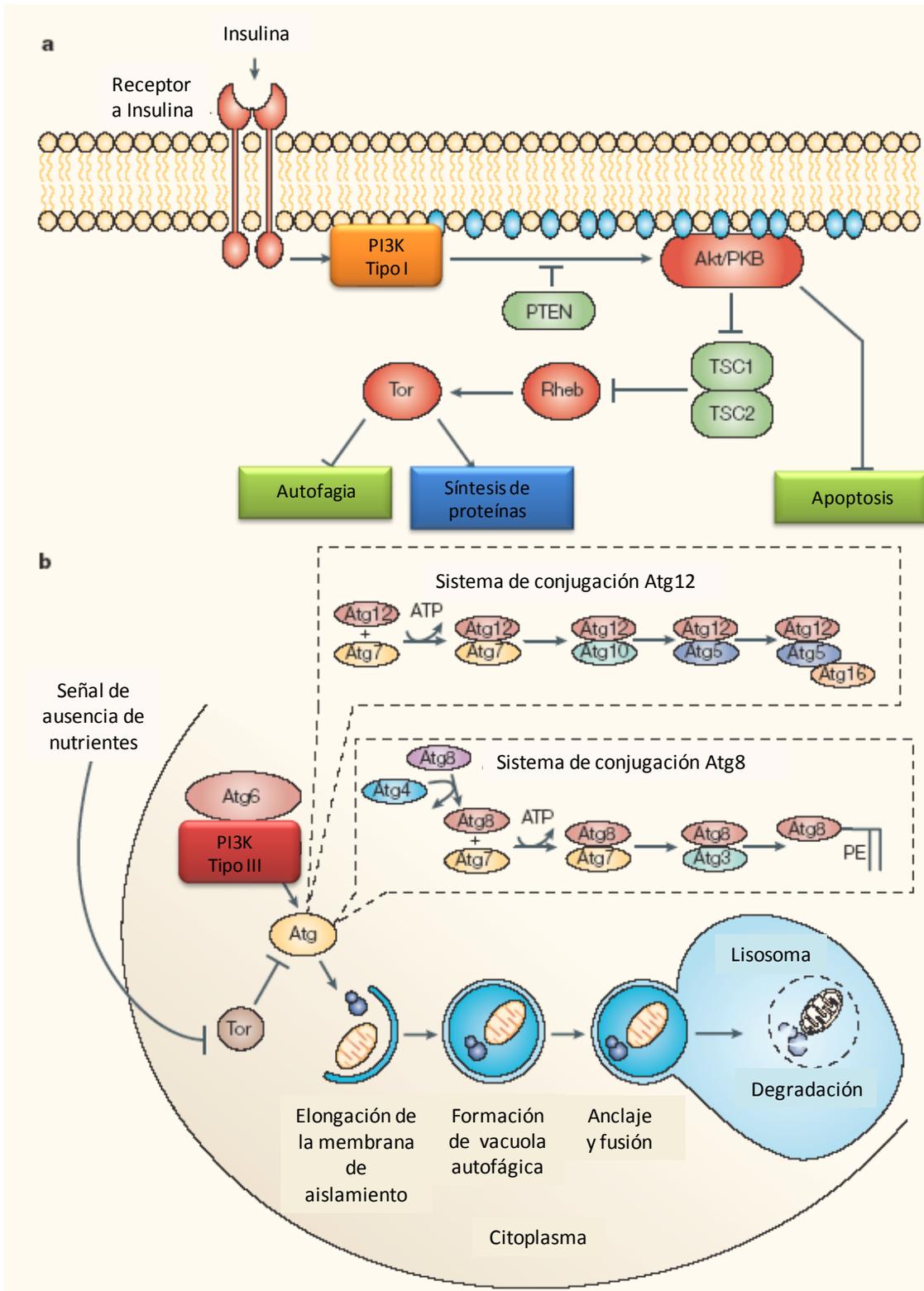


Figura 2. Regulación genética de la autofagia. a. La fosfatidil inositol 3-cinasa (PI3K) tipo I tiene un papel importante en el control del crecimiento celular por la regulación de la apoptosis, la síntesis de proteínas y la autofagia. En los organismos multicelulares, la privación de nutrientes reduce los niveles de factores de

crecimiento como la insulina. La insulina regula el crecimiento por unión al receptor de insulina, la activación de la PI3K y la fosforilación de lípidos de membrana (azul). Los reguladores positivos de la autofagia (verde) comprenden al homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN), TSC1 y TSC2 y los reguladores negativos (rojo) incluyen al receptor de la insulina, PI3K, AKT/PKB, Rheb y Tor. **b.** La autofagia se utiliza para degradar componentes del citoplasma por la inducción de una membrana que rodea los componentes citoplásmicos, formando una vacuola autofágica que se une y fusiona con el lisosoma, y eventualmente las hidrolasas lisosomales degradan el contenido de la vesícula. La falta de nutrientes desencadena la autofagia por la vía de señalización de Tor. Tor reprime la autofagia, mientras que los genes Atg se requieren para la formación de la vacuola autofágica. Atg 6/Beclin y la PI3K tipo III son reguladores positivos de la formación de la vacuola. La formación de la vacuola autofágica también comprende dos vías de conjugación parecidas a la ubiquitinación, Atg 8 y Atg 12. Atg 4 codifica para una proteasa de cisteína que proteoliza a Atg 8. Atg 7 es similar a una proteína E1. Atg 10 y Atg 3 codifican para proteínas parecidas a E2. Atg 5, Atg 12 y Atg 16 están físicamente asociadas con la membrana, mientras que Atg 8 se conjuga a fosfatidiletanolamina y se inserta en la membrana. (Tomado de [34]).

autofagosomas no se generan en células tratadas con los inhibidores de la PI3K wortmanina y 3-metil adenina (3MA). Atg6/Vps30p (Beclin) se conjuga con Atg 13, Vps 34 y Vps 15 formando el complejo de PI3K tipo III requerido para el proceso autofágico [35, 40].

Aunque la cinasa Tor (Target of rapamycin) parece ser el regulador más importante de la autofagia, se han descrito también vías de inducción de autofagia independientes de Tor que involucran la reducción de los niveles intracelulares de inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) [41].

Fisiológicamente, la muerte celular autofágica parecería ocurrir durante el desarrollo en regiones que degeneran *in toto*, como las placas epiteliales después de su cierre o la remoción de los conductos Müllleriano y Wolfiano, donde el sistema heterofágico estaría completamente ocupado [3]. Sin embargo, en algunos tejidos se han observado células autofágicas y apoptóticas, como en la erupción de los dientes o en la regresión de las membranas interdigitales en ratas y ratones. También se han observado características tanto apoptóticas como autofágicas en las mismas células, como en las glándulas mamarias de la rata después del destete [42]. No está claro si las características autofágicas preceden a la aparición de la apoptosis o viceversa o si son dos procesos completamente independientes. La vía de señalización de la autofagia se ha implicado en la activación de la apoptosis, ya que las enzimas lisosomales pueden cortar a Bid, un miembro pro apoptótico de la familia de Bcl-2, y éste puede inducir la liberación del citocromo-c [43]. Bcl-X_L puede unir a Beclin e inducir autofagia en células deficientes en Bax y Bak [33] y se ha propuesto

que la fosforilación de Bcl-2 por JNK1 regule la transición entre autofagia y apoptosis en un modelo de autofagia inducida por privación de nutrientes [44].

Se ha observado también autofagia en neuronas en modelos de enfermedades neurodegenerativas, aunque parece ser que la autofagia funciona para remover agregados de proteínas intracelulares más que en un programa activo de muerte celular [29].

c. Necrosis

El término necrosis se ha usado para la muerte celular no programada que ocurre como resultado de la exposición a estímulos extracelulares. Se caracteriza por hinchamiento celular y rompimiento de la membrana plasmática, provocando la liberación de componentes intracelulares y una respuesta inflamatoria. Además, el DNA se degrada arbitrariamente por DNAsas extracelulares o lisosomales provocando un patrón de barrido en geles de electroforesis [18, 45, 46]. La muerte celular necrótica parece ser importante para el organismo cuando se necesita una respuesta inmune intensa o para los patógenos intracelulares como forma de asegurar su propagación [45]. Alternativamente, la isquemia es el ejemplo patológico clásico de una condición necrótica donde ocurre una depleción drástica de oxígeno, glucosa y otros factores tróficos induciendo la necrosis de células endoteliales, neuronas, cardiomiocitos, células renales, etc.

Aunque la necrosis es normalmente considerada una muerte accidental, se puede inducir específicamente por condiciones fisiológicas y patológicas. Las toxinas bacterianas, los componentes de la respuesta inmune y las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ERN) pueden inducir muerte necrótica [45]. Además, estímulos extracelulares como citocinas, la estimulación de receptores como el TNF, TRAIL, receptores purinérgicos y receptores a glutamato pueden inducir muerte con características necróticas, lo que se propone puede ser un mecanismo de muerte de respaldo aparte de la apoptótica o que los dos tipos de muerte puedan coexistir en la misma célula [47]. Por lo tanto, algunos autores han propuesto el término oncosis (de “onkos”, que significa hinchamiento) como una vía pre letal caracterizada por hinchamiento de organelos y por aumento en la permeabilidad membranal, dejando necrosis como un término usado para describir a las células o tejidos muertos independientemente del proceso pre letal [48]. Del mismo modo, el término necrosis programada se usa para describir a la muerte con características necróticas que puede ser desencadenada por una variedad de estímulos específicos, y con señales intracelulares asociadas [45, 46].

Las cinasas, como la vía de las MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases), se han implicado también en la muerte celular necrótica programada, ya que la inhibición de JNK disminuye la muerte independiente de caspasas en células miogénicas que mueren con características necróticas después de someterse a una privación energética [49]. Por otro lado, la poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP)-1 es una proteína nuclear que poli ADP-ribosila otras proteínas y a sí misma después de una ruptura en las hebras de DNA y que parece modular los eventos que llevan a la reparación del DNA [50]. Esta enzima disminuye el ATP intracelular para la síntesis de su sustrato, el NAD⁺ y parece producir una morfología de necrosis como resultado de una ruptura intensa de las hebras de DNA [45]. Además, la necrosis neuronal parece ocurrir como resultado de un aumento en Ca²⁺ intracelular. Conjuntamente, las proteasas de cisteína dependientes de calcio, las calpaínas, que pueden proteolizar una variedad de proteínas del citoesqueleto, enzimas y factores de transcripción, se han visto activadas durante la necrosis y la apoptosis [51, 52]. Así, aunque el papel preciso de cada molécula sigue siendo incierto, estas señales intracelulares, entre otras, como las ERO o el calcio, parecen estar involucradas en un proceso de muerte celular programada con características de necrosis.

d. Otras Formas de Muerte Celular

Clarke (1990) clasificó a la muerte celular que ocurre durante el desarrollo en tres tipos dependiendo del papel de los lisosomas. La apoptosis se clasificó como la muerte celular tipo I en que la célula se degrada por los lisosomas de otra célula (heterofagocitosis). En la muerte celular tipo II, la célula se degrada por sus mismos lisosomas (autofagocitosis) y el tipo III se denominó degradación no lisosomal. El tipo III de MCP se dividió en dos tipos. La desintegración no-lisosomal se caracteriza por el hinchamiento de organelos seguido de la formación de espacios vacíos en el citoplasma. La célula después se desintegra en pedazos más pequeños, la membrana se fragmenta y no se detecta fagocitosis. El tipo 3B se denominó degeneración citoplásmica porque los cambios iniciales parecen ocurrir en el citoplasma. En este tipo de muerte celular, los organelos se dilatan, aparecen vacuolas en el citoplasma, el núcleo se rompe y la membrana celular se retracta y se redondea [3].

Leist y Jäättelä (2001) introducen una clasificación diferente basada en la morfología nuclear. La apoptosis comprende a las células con una condensación nuclear pronunciada. La MCP parecida a la apoptosis se usa para describir tipos de muerte celular con una condensación de cromatina menos compacta que en la apoptosis. La MCP parecida a la necrosis se usa para definir la ausencia de

condensación de la cromatina y la necrosis accidental se utiliza para la contraparte conceptual de la MCP, que se evita solamente por la remoción del estímulo [53].

El término paraptosis (para, relacionado a la apoptosis) se introdujo en el 2000 por Sperandio *et al*, para describir una muerte celular independiente de caspasas con menos condensación de la cromatina que la apoptosis, vacuolas en el citoplasma e hinchamiento mitocondrial. Esta muerte celular es inducida por el receptor del factor de crecimiento parecido a insulina tipo I (IGF1R) y mediada por las MAP cinasas JNK1 y MEK2 [54].

La catástrofe mitótica es un tipo de apoptosis que ocurre durante la mitosis o como resultado de una falla en la mitosis, evitando divisiones celulares asimétricas. Se puede inducir por alteraciones en proteínas celulares o después del tratamiento con agentes químicos, calor o radiaciones y puede ser mediada por p53 o CDK1. Comparte con la apoptosis la condensación de la cromatina, la liberación de proteínas pro-apoptóticas mitocondriales, activación de caspasas y fragmentación del DNA. En el caso de la muerte celular dependiente de p53, ésta puede inducir la transcripción de Bax y Puma, dos miembros pro-apoptóticos de la familia de Bcl-2; en el caso de la muerte independiente de p53, la caspasa-2 parece ser la caspasa iniciadora [55, 56].

Finalmente, Fink y Cookson, 2005 proponen el término piroptosis (del griego pyro, relacionado al fuego o fiebre y ptosis de caída) como una nueva forma de muerte celular inducida por la infección por especies de *Salmonella* y *Shigella* que es proinflamatoria y dependiente de la caspasa-1. Este tipo de muerte celular puede ser importante por el papel determinante de la caspasa-1 en algunos modelos de muerte como la hipoxia o la isquemia [48].

Las células parecen ser capaces de mostrar características de distintos tipos de MCP y la activación o el estado de diferenciación de cada célula parecen determinar su destino. Más aún, los programas de MCP pueden actuar como mecanismos de respaldo para asegurar la muerte [4, 5, 33, 53, 57]. Aún es incierto si los tipos de MCP mencionados se incluyen en otros o si representan un proceso continuo con diferentes características dependiendo del tiempo en el que se observa. Además, algunos sistemas biológicos presentan simultáneamente más de un tipo de muerte celular y una célula individual puede presentar características mezcladas, haciendo aún más difícil la clasificación.

Muerte Neuronal Programada

En la mayoría de los tejidos, las células que ya no son útiles mueren por MCP y son reemplazadas por otras. Sin embargo, el sistema nervioso no está sujeto a este mecanismo homeostático y con unas pocas excepciones, las neuronas con las que nacemos son esencialmente las mismas con las que morimos. Por lo tanto, la muerte celular en el sistema nervioso ocurre principalmente bajo tres circunstancias. Durante el desarrollo embrionario y postnatal aproximadamente el 50-70% de las neuronas mueren por MCP y esta muerte es requerida para la formación adecuada de los tejidos. Además, existe evidencia que sugiere que las neuronas maduras en el cerebro adulto pueden presentar procesos de MCP y que esta muerte, aunque menos estudiada, puede tener propósitos similares a los del desarrollo, como la eliminación de células generadas en exceso para mantener los circuitos neuronales que permitan un procesamiento eficiente de la información [58]. Las neuronas también mueren en las enfermedades neurodegenerativas, cuyas causas son esencialmente desconocidas. Sin embargo, en este sentido se han hecho avances con respecto a los mecanismos intracelulares y el tipo de MCP involucrada. La muerte neuronal accidental es otra circunstancia. Ocurre después de un daño severo como un infarto o trauma y esencialmente no se consideraba como programada, aunque se ha encontrado evidencia de MCP.

Parece que la muerte neuronal durante el desarrollo ocurre virtualmente en todos los grupos taxonómicos e incluye diversos tipos de neuronas, tanto en el sistema nervioso central (SNC) como el periférico [4]. Puede tener distintas funciones dependiendo de la etapa del desarrollo, el subtipo neuronal y la especie. Durante la embriogénesis temprana, los precursores neurales que proliferan en la zona ventricular del tubo neural y que posteriormente pueden producir neuronas y células gliales pasan por el proceso de MCP. Los neuroblastos post-mitóticos jóvenes que comienzan a diferenciarse y a migrar a las capas externas del tubo neural también pasan por el proceso de MCP. Esta muerte parece requerirse para regular el número de precursores que puede afectar el tamaño y la morfología de las estructuras resultantes. Para las neuronas post-mitóticas de los vertebrados, parece ser que el propósito principal de la MCP es hacerlas coincidir con el número de células blanco que inervan. Esto se propuso inicialmente en la hipótesis neurotrófica, que establece que las neuronas en desarrollo compiten por una cantidad limitada de señales de sobrevivencia (factores neurotróficos, soporte trófico de las aferentes o de la glia) provenientes de las células blanco. Sólo las células que tuvieran las señales suficientes sobrevivirían mientras que las otras morirían por MCP [1, 58, 59].

La apoptosis es el tipo principal de MCP involucrada en el desarrollo del sistema nervioso central y quizás las evidencias más contundentes vienen del estudio de ratones deficientes en componentes de las vías de señalización apoptótica. La caspasa-3, la caspasa efectora más importante, tiene un papel crítico durante la muerte celular morfogenética en el cerebro de mamíferos. Los ratones deficientes en caspasa-3 mueren de 1 a 3 semanas después de su nacimiento con anomalías severas en el SNC; muestran una hiperplasia masiva y masas celulares ectópicas localizadas entre la corteza cerebral, el hipocampo y el estriado [60]. Este fenotipo particular puede deberse a un número desproporcionado de precursores neurales que no mueren y por lo tanto se diferencian produciendo células supernumerarias [61]. Además, la vía apoptótica mitocondrial está involucrada en el procesamiento de la caspasa-3 durante el desarrollo del sistema nervioso ya que los ratones deficientes en la caspasa-9 y Apaf-1 mueren perinatalmente y embriónicamente respectivamente, mostrando una activación deficiente de la caspasa-3 y también muestran malformaciones cerebrales con un exceso de células en el sistema nervioso, siendo estas anomalías más severas que en los ratones deficientes en caspasa-3 [60, 62, 63].

Los miembros de la familia de Bcl-2 también son importantes en la MCP neuronal durante el desarrollo. Los ratones deficientes en Bcl-2 muestran ligeros defectos en el desarrollo del sistema nervioso que principalmente afectan el mantenimiento de algunas sub poblaciones neuronales en la vida post-natal. Sin embargo, la deficiencia de Bcl-X_L, un miembro anti-apoptótico de la familia de Bcl-2, es letal durante el desarrollo embrionario. Aunque la muerte en estos ratones se debe a defectos en el sistema hematopoyético, se observa una muerte neuronal aumentada en las zonas intermedia y marginal del cerebro que contiene neuronas inmaduras post-mitóticas. Además, la deficiencia de Bax, un miembro pro-apoptótico de la familia de Bcl-2, resulta en un aumento en el número de neuronas inmaduras post-mitóticas. La muerte celular se elimina casi por completo entre el día embrionario 11.5 y el primer día postnatal en la mayoría de los ganglios periféricos, en las pozas motoras de la médula espinal y en el complejo nuclear trigeminal del tallo cerebral. Se observa también una reducción en la muerte de células del cerebelo, retina e hipocampo y los adultos deficientes en Bax tienen más neuronas motoras que los ratones silvestres [61, 64].

De acuerdo con estos hechos, la apoptosis es el tipo de muerte celular que se ha encontrado con mayor frecuencia en los modelos *in Vitro* de muerte neuronal durante el desarrollo, aunque también se han observado características de otros tipos de muerte neuronal. Las neuronas granulares de cerebelo (NGC) en cultivo privadas de potasio mueren con características apoptóticas como condensación nuclear, fragmentación internucleosomal del DNA, exposición de fosfatidilserina y

activación de caspasas [12, 65-67]. También se han observado características autofágicas en este modelo, como activación de catepsinas y redistribución de LC-3 [68, 69]. La formación de autofagosomas también se ha observado en otros modelos neuronales de apoptosis como las neuronas simpáticas del ganglio superior cervical privadas de NGF. Además, las características apoptóticas pueden inhibirse por el inhibidor de la autofagia 3-metil adenina, un inhibidor de la PI3K [70].

A pesar de los defectos tan severos en la MCP del cerebro anterior de los ratones deficientes en caspasa-3 y 9, la muerte celular en otros tejidos se preserva, sugiriendo que las caspasas puedan actuar de manera dependiente del tejido o del estímulo [61]. Además, en otras regiones del sistema nervioso cuyo periodo crítico de MCP ocurre antes de la muerte del animal como en el tallo cerebral, la médula espinal y los ganglios periféricos, ocurre un desarrollo normal. Las neuronas en estas regiones parecen sufrir un tipo de MCP retrasada no-apoptótica mostrando condensación celular, poca fragmentación celular en cuerpos apoptóticos y poca condensación de la cromatina, presencia de vacuolas citoplásmicas e hinchamiento de mitocondrias y retículo endoplásmico [4]. Así, aunque la apoptosis es determinante para formar el SNC en desarrollo, las neuronas parecen ser capaces de sufrir procesos de MCP alternos en caso de que la apoptosis sea inhibida. Además, aún en los casos de la completa inhibición de las caspasas, las neuronas post-mitóticas *in Vitro*, como las NGC expuestas a privación de potasio y las neuronas simpáticas privadas de soporte trófico, pueden presentar una MCP retrasada no apoptótica con características de autofagia [71].

En contraste con el papel de la apoptosis en el control de la muerte neuronal para una formación adecuada del sistema nervioso, existe evidencia de que la autofagia controla la sobrevivencia neuronal durante el desarrollo. Los ratones deficientes en catepsinas B y L, dos proteasas lisosomales, muestran atrofia cerebral debida a apoptosis masiva de neuronas en la corteza cerebral y las capas de Purkinje y granular cerebelares [72]. Del mismo modo, la deficiencia en Atg 5 y Atg 7 en el SNC provoca deficiencias en las funciones motoras, con pérdidas neuronales en las cortezas cerebrales y cerebelares junto con cuerpos de inclusión citoplásmicos con proteínas poli-ubiquitinadas en las neuronas [73, 74]. Así, la autofagia parece ser esencial para la sobrevivencia neuronal durante el desarrollo y su deficiencia puede provocar neurodegeneración con la presencia de cuerpos de inclusión con proteínas poli-ubiquitinadas. Aún es incierto si la muerte neuronal no-apoptótica durante el desarrollo ocurre sólo en los casos de inhibición de la apoptosis.

Las neuronas también pueden morir como respuesta a un estímulo adverso intenso. Durante un infarto, las neuronas mueren de hipoxia después de la oclusión de los vasos sanguíneos o como consecuencia de una hemorragia, un proceso esencialmente irreversible. Dada la severidad del daño, la isquemia, hipoxia o infarto se consideraban como ejemplos clásicos de una condición necrótica [45]. Sin embargo, ahora se sabe la muerte neuronal después de un infarto ocurre esencialmente en un periodo de días después del daño inicial y refleja la excitotoxicidad provocada por el glutamato, un neurotransmisor excitador en el cerebro. De hecho, los antagonistas a los receptores a glutamato reducen el daño después de un infarto administrados antes o después del ligamiento de una arteria cerebral [75]. También se ha observado tanto *in Vivo* como *in Vitro* que las neuronas en el centro de una región isquémica mueren rápidamente mientras que las neuronas más distantes en la penumbra permanecen viables por varias horas [10].

Una característica de la isquemia es la incapacidad de las células de mantener niveles normales de ATP, lo que resulta en la mayoría de las características patológicas. Los sistemas de transporte activo transmembranal se ven afectados, llevando a una mayor permeabilidad membranal con alteraciones en la distribución iónica. El aumento en los niveles de Ca^{2+} intracelular parece contribuir a la muerte por la activación de proteasas como las calpaínas y a la alteración en la función respiratoria mitocondrial que lleva a producción de ERO. Las ERO pueden inducir daño al DNA activando a PARP-1 lo que lleva a una mayor disminución de ATP y a la muerte celular, ya sea apoptótica o necrótica [76].

Se han observado varias morfologías de muerte en modelos de isquemia. La disminución de ATP puede llevar a una pérdida del potencial de membrana mitocondrial, provocando la liberación de proteínas mitocondriales pro-apoptóticas como el citocromo c, Smac/DIABLO u Omi/HtrA2 y provocando un proceso apoptótico o liberando a AIF que puede llevar a una MCP independiente de caspasas [76]. Así, las caspasas se han involucrado en daño isquémico cerebral. Se ha observado aumento en la expresión de las caspasas-1, 3, 8 y 9 en la penumbra en un modelo de isquemia focal [77]. Además, los ratones deficientes en PARP-1 son resistentes a isquemia cerebral, evidenciando la importancia del proceso necrótico [78] y en modelos de hipoxia-isquemia se ha observado un aumento de catepsina B, de vacuolas autofágicas y redistribución de LC-3 [79, 80] implicando un proceso autofágico. Los inhibidores de caspasas y de PARP-1 se han usado en modelos animales de isquemia en miocardio y se ha observado una reducción en el tamaño del infarto. De nuevo, se necesita un mejor entendimiento de los mecanismos que llevan a la muerte celular para el diseño de terapias adecuadas.

Cultivo de Neuronas Granulares de Cerebelo (NGC) de Rata

Un modelo muy utilizado para el estudio de la muerte neuronal es el cultivo de NGC de rata. Las NGC son generadas postnatalmente por células en división de la capa germinal externa, las cuales migran a la capa granular donde son inervadas por los axones de las fibras musgosas excitadoras del tallo cerebral. Durante este proceso ocurre una eliminación masiva de NGC por un proceso apoptótico. Se calcula que al final de la tercera semana de desarrollo se han eliminado cerca del 50% de las neuronas granulares generadas durante la etapa proliferativa [81].

Cuando las NGC de ratas de 8 días postnatales se cultivan, se requieren condiciones despolarizantes crónicas como alto potasio extracelular (20 mM) para asegurar su supervivencia, lo cual se observa hasta los 5-7 días *in Vitro* (DIV) y que correspondería con el tiempo en que las NGC establecen sus conexiones presinápticas glutamatérgicas con las fibras musgosas en el desarrollo *in Vivo* [82]. Las altas concentraciones de potasio extracelular (K25) evitan la muerte de las NGC aumentando las concentraciones intracelulares de calcio y evitando el aumento en expresión de la caspasa-3 [65]. Tanto el IGF-1 como el alto potasio promueven la fosforilación de Akt, una cinasa necesaria para la sobrevivencia, y el LY294002, un inhibidor de la PI3K, la cual fosforila a Akt, inhibe el efecto protector de ambos [83].

Por otro lado, cuando estas neuronas se mantienen por 6-8 DIV con KCl 25 mM (K25) y se transfieren a un medio con KCl 5 mM (K5), alrededor del 40%-80% de las células mueren en 24-48 horas respectivamente, con características apoptóticas, mostrando una activación de las caspasas-9 y 3, liberación de citocromo-c, translocación de fosfatidilserina, condensación nuclear y fragmentación internucleosomal del DNA [12, 65, 66, 84]; no muestran estrés del RE y sí muestran desfosforilación de la GSK-3 β [85]. También se ha encontrado que la privación de suero y potasio provoca que Nf κ B se localice únicamente en el citoplasma, evitando su efecto de transcripción en el núcleo [86]. Esta muerte es dependiente de Bax, ya que las NGC de los ratones deficientes en Bax no mueren por privación de potasio [87] y se reduce marcadamente en presencia de inhibidores de caspasas, antioxidantes [12, 65, 88], cicloheximida, actinomicina D, sustancias como la forskolina que aumentan la concentración de cAMP, IGF-1 [65, 84] y agonistas de receptores de glutamato como el NMDA [89]. La 3-metil adenina (3-MA), inhibidor de la PI3K, disminuye también la muerte inducida por privación de suero y potasio [68, 69], y esta misma muerte puede ser evitada con el tratamiento de oligonucleótidos antisentido contra GAPDH.

La susceptibilidad a la muerte por bajo potasio en NGC correlaciona con la expresión de los canales de potasio de dos poros TASK que son responsables de la corriente de salida de K⁺ en células en reposo y cuando se expresan, la transición de alto a bajo potasio hiperpolariza la membrana de -36 a -75 mV aproximadamente [90]. Sin embargo, aún no es claro el mecanismo exacto por el que la hiperpolarización inicia la apoptosis.

La privación de potasio en NGC normalmente se acompaña de privación de suero, ya que la adición de suero a cultivos maduros mata a la mayoría de las células en un lapso de 1 hora. Esta toxicidad puede evitarse por antagonistas de los receptores NMDA y por la utilización de suero dializado, sugiriendo una muerte de tipo excitotóxico provocada por componentes del suero [91]. Cuando se cultivan, las neuronas se encuentran indiferenciadas. El glutamato presente en el suero no tiene un efecto excitotóxico porque las células probablemente tienen pocos receptores a glutamato. Por otro lado, cuando las células se diferencian y tienen una cantidad crítica de receptores a glutamato, el glutamato ya no es tan abundante en el medio y la adición de suero fresco provocaría la muerte de tipo excitotóxico.

Por otro lado, si las NGC se cultivan por 6-8 DIV con K25 y se cambian a un medio sin suero con la misma concentración de potasio, alrededor del 35% de las células mueren a las 48 horas, sin mostrar fragmentación internucleosomal ni condensación nuclear del DNA, por lo que la muerte parece ser no apoptótica [67]. Se ha encontrado también aumento en la concentración de ERO y protección de la muerte por antioxidantes y antagonistas de receptores a glutamato [92]. Así, en este modelo, la privación de potasio y suero parece inducir muerte tanto apoptótica como no apoptótica.

Canu *et al* (2005) proponen que la apoptosis observada por la privación de potasio y suero sea precedida de un proceso autofágico, y que se necesita la actividad de la catepsina B para la activación de la caspasa-3. Sin embargo, Kaasik *et al* (2005), no observan protección de la privación de potasio y suero por un inhibidor de la catepsina B y sí por uno de la L y proponen una muerte dependiente de catepsina L parcialmente independiente de la caspasa 3, ya que cuando estas enzimas se inhiben por separado se rescata sólo el 20-40% de las células a diferencia de un 80% cuando se inhiben ambas. Por lo tanto, el papel de la autofagia en la muerte por privación de suero y potasio es aún controversial [68, 69].

Las NGC mueren también por otros estímulos. Cuando se tratan con estaurosporina (STS), un inhibidor de proteínas cinasas, mueren con características apoptóticas. Alrededor del 50% de las NGC mueren en 24 horas cuando se tratan con STS 0.5 μM , esta muerte está acompañada de la activación de las caspasas-2, 9 y 3, de la liberación del citocromo-c y el DNA se fragmenta [66, 93]. Por otro lado, cuando se tratan con glutamato 100 μM , en presencia de glicina y en ausencia de magnesio para activar por completo al receptor tipo NMDA, mueren de manera excitotóxica, con una entrada masiva de calcio y con pérdida de la integridad de la membrana plasmática [94].

Definición del Tipo de Muerte Neuronal Programada

Las neuronas pueden presentar características de más de un tipo de muerte celular, ya sea como un mecanismo de respaldo cuando la vía tradicional de muerte es inhibida [4, 57], en respuesta a un inductor de muerte particular [10, 68, 69, 95] o presentar distintos tipos de muerte dependiendo del tratamiento utilizado [14]. Aunque es difícil clasificar a las células que mueren por la mezcla de eventos morfológicos y bioquímicos que podrían clasificarse en más de un tipo, se han propuesto que algunos factores puedan influenciar la forma de MCP que se presenta.

El aumentar la intensidad del estímulo en tiempo o concentración puede cambiar el tipo de muerte de apoptosis a necrosis. Sin embargo, esta morfología necrótica podría resultar de la lisis celular previa a la activación o finalización de un programa de MCP, y la apoptosis y la necrosis podrían representar los extremos de un continuo de posibles formas de muerte celular [5]. Algunos trabajos han mostrado que la manipulación de condiciones intracelulares pueden cambiar el tipo de MCP en neuronas y en células no-neurales [5, 9, 96, 97], y aunque se desconoce prácticamente lo que específicamente determina que una célula muera de una forma u otra, a continuación se describen algunos mecanismos que se han propuesto pueden influir en la forma en que las células que mueren.

a. El Metabolismo Energético y la Forma de Muerte Neuronal

Las demandas celulares de ATP pueden satisfacerse por la glicólisis anaerobia citoplásmica o por la fosforilación oxidativa mitocondrial. Además del papel central de la mitocondria como proveedor de ATP durante el metabolismo aerobio, el organelo se ha implicado en la ejecución de la muerte, especialmente apoptótica. Las mitocondrias contienen proteínas pro-apoptóticas como el citocromo-c, Smac/DIABLO u Omi/HtrA2 que cuando se liberan al citosol, pueden activar a las caspasas, o AIF, que puede producir una MCP parecida a la apoptótica sin activación de caspasas. Además, se

ha sugerido que las mitocondrias puedan influir en el tipo de muerte celular ya sea apoptótica o necrótica dependiendo de su estado funcional.

La apoptosis es un proceso activo bien organizado con algunos pasos dependientes de ATP (Figura 3). Además, se propone que la apoptosis necesita mitocondrias relativamente intactas [10] y ciertos niveles de ATP para ocurrir [98].

La activación de la caspasa-9 en la vía mitocondrial de la apoptosis requiere de la formación del apoptosoma, un proceso dependiente de ATP. En este proceso, el citocromo-c citoplásmico interacciona con Apaf-1 y la procaspasa-9 de manera dependiente de dATP o ATP [99]. La formación del apoptosoma parece estar bien regulada por nucleótidos, como moléculas susceptibles de hidrólisis y como moléculas que regulan la unión de proteínas involucradas en el ensamble de este complejo. Se sabe que dATP existe como cofactor de Apaf-1 monomérico, se hidroliza a dADP después de la activación por citocromo-c y posteriormente se intercambia por dATP para generar el apoptosoma activo. Si la concentración de dATP es insuficiente para el intercambio del nucleótido después de la hidrólisis, Apaf-1 se oligomeriza en un apoptosoma inactivo que contiene una molécula de ADP estrechamente unida [100]. Por otro lado, se ha propuesto que los nucleótidos intracelulares puedan bloquear la formación del apoptosoma y la activación de caspasas ya que en varios modelos de apoptosis se da una disminución en la concentración intracelular total de nucleótidos, además de que la inyección de nucleótidos a la célula inhibe la apoptosis inducida por citocromo-c y por estímulos intrínsecos de muerte [101].

Los cambios nucleares apoptóticos pueden comprender un mecanismo de transporte activo nuclear que requiere hidrólisis de ATP, y se ha demostrado que se necesita ATP para la condensación de la cromatina, para su localización en la periferia nuclear y para la formación de cuerpos apoptóticos pero no para la fragmentación internucleosomal del DNA *in Vitro* [102]. Además, los pasos de la apoptosis mediados por proteínas cinasas dependen por definición de ATP, que se usa como donador de grupos fosfato para la fosforilación de proteínas. También se ha demostrado que Bcl-2 puede ser inactivada por fosforilación mediada por JNK, la cual también fosforila y activa proteínas pro-apoptóticas como Bad, Bim y Bmf. JNK también estimula la formación de Bid truncada lo que puede llevar a la activación de la caspasa-8. A su vez, JNK se activa por estímulos apoptóticos vía una cascada de otras proteínas cinasas y además de JNK, otras proteínas cinasas (PKC, DAP, Akt, p38, etc.) están también involucradas en mecanismos pro- o anti-apoptóticos [103].

No sólo se necesita el mantenimiento de un cierto nivel de ATP intracelular para el proceso apoptótico; además, las NGC privadas de potasio que pasan por un proceso apoptótico muestran un aumento en los niveles intracelulares de ATP así como en su carga energética. Este ATP proviene tanto de la fosforilación oxidativa como de la glicólisis ya que la oligomicina, un inhibidor de la ATP sintasa mitocondrial puede inhibir el aumento del ATP y el citrato, un inhibidor de la fosfofructocinasa-1, puede inhibir el aumento en producción de lactato observado en estas células durante la apoptosis. Cuando los agentes que disminuyen el ATP se utilizan separadamente, las neuronas aún muestran características apoptóticas, aunque el ATP disminuye. Sin embargo, cuando se utilizan al mismo tiempo, las NGC no muestran fragmentación internucleosomal del DNA y sí un aumento en la liberación de la lactato deshidrogenasa (LDH), ambas características de necrosis aún en la ausencia de un estímulo apoptótico [9].

La excitotoxicidad por glutamato se considera generalmente un proceso necrótico. Sin embargo, las NGC expuestas a glutamato muestran dos poblaciones de neuronas en proceso de muerte. La primera población muere inmediatamente después de la exposición a glutamato, pierde el potencial de membrana mitocondrial y muestra una permeabilización de la membrana plasmática así como un aumento en el tamaño nuclear. La segunda población sufre una muerte retrasada. Estas células mantienen una población de mitocondrias con bajos niveles energéticos, pero pueden recobrar su potencial de membrana mitocondrial y su carga energética celular y finalmente mueren por apoptosis. Así, esas neuronas que pueden recobrar su integridad mitocondrial son las que finalmente mueren apoptóticamente [10]. Además, se pensaba que se necesitaba una disminución en el potencial de membrana mitocondrial para la liberación de proteínas mitocondriales pro apoptóticas. Sin embargo, las neuronas hipocámpales en cultivo expuestas a estaurosporina (STS), otro agente inductor de apoptosis mantienen su potencial de membrana mitocondrial aún cuando se ha activado la caspasa-3, el citocromo-c ha sido liberado y las señales de apoptosis nuclear ya son evidentes [104]. Así, el proceso apoptótico parece necesitar la preservación de los organelos, especialmente las mitocondrias y ciertos niveles de ATP para respaldar los procesos dependientes de energía.

La inhibición de la respiración por sí misma puede causar muerte celular apoptótica o necrótica en una línea celular no neuronal dependiendo del tiempo de exposición. Si las células se tratan con inhibidores mitocondriales por 3 horas y después se les permite recuperarse en un medio con alta glucosa, muestran características apoptóticas. Sin embargo, si se tratan de 24-48 horas, mueren de manera necrótica. En este modelo, el contenido de ATP disminuyó a 30-40% de los niveles iniciales durante la privación energética de 3 horas y regresaron a sus niveles normales durante la

recuperación. Sin embargo, siempre se mantuvo en un rango mucho más alto que los valores de las constantes de Michaelis de la mayoría de las enzimas que consumen ATP. Además, si la depleción energética se prolongaba a 5 horas, la recuperación aún restauraba los niveles de ATP pero producía una muerte necrótica [6]. Así, sensores intracelulares de ATP pueden haber detectado una ligera y temporal disminución en ATP y activado la maquinaria apoptótica o pueden haber detectado una disminución grave en ATP que pueda comprometer la homeostasis celular y transformado la señal en una señal de necrosis. Algunos sensores de ATP que se han descrito son la cinasa Tor y la cinasa activada por AMP (AMPK) que se han visto involucrados principalmente en la señalización autofágica [105].

La cinasa Tor pertenece a la familia de cinasas relacionada a la cinasa de fosfatidil inositol (PIKK). Contiene un dominio de cinasa de serina/treonina carboxi terminal y hacia el extremo amino del mismo, contiene un dominio de unión a FKBP12-rapamicina. Funciona río abajo de la PI3K tipo I y Akt en la señalización de factores de crecimiento regulando la síntesis de proteínas, la biogénesis de ribosomas y la importación de nutrientes. La privación de aminoácidos, particularmente la ausencia de leucina, resulta en una rápida desfosforilación de S6K1 y 4E-BP2, los efectores de Tor, mientras que el restablecimiento de aminoácidos provoca su refosforilación. Los aminoácidos parecen activar a Tor vía la inhibición de TSC1-TSC2 o por estimulación de Rheb. Tor también puede sentir el estado energético de una célula a través de AMPK. AMPK se activa en respuesta a una alta relación AMP/ATP y la AMPK activada regula a la baja los procesos energéticamente demandantes como la síntesis de proteínas y estimula los procesos generadores de ATP como la oxidación de ácidos grasos. Cuando se encuentra activa, AMPK fosforila directamente a TSC y aumenta su actividad de proteína activadora de GTPasa llevando a la inhibición de la señalización de Tor. Existen muy pocos trabajos sobre el papel de Tor o de AMPK en el sistema nervioso. En *Drosophila melanogaster*, Tor afecta el tiempo de la diferenciación neuronal. La activación de su vía de señalización lleva a una diferenciación acelerada, mientras que su inhibición la retrasa [8, 105].

Además del papel de la autofagia como un proceso productor de ATP durante la falta de nutrientes, se han descrito procesos dependientes de ATP que se llevan a cabo durante la formación de los autofagosomas (Figura 4). Atg7 activa a la glicina carboxi-terminal de Atg12 en un proceso dependiente de ATP formando con él un enlace tioéster para que pueda ser transferido a Atg10 y finalmente a Atg5, formando el conjugado Atg12-Atg5 esencial para el proceso autofágico [36]. No se sabe aún si la cinasa Tor o AMPK están relacionadas con la definición del tipo de MCP o si el estado energético de la célula también determina que la célula muera autofágicamente. Sin

embargo, los niveles de ATP también se han visto involucrados en la regulación de MCP autofágica. Las neuronas corticales embrionarias de rata en cultivo mueren apoptóticamente cuando se tratan con camptotecina. Sin embargo, si también se tratan con un inhibidor general de caspasas, muestran una muerte retrasada con características morfológicas de autofagia. Mientras que el ATP se mantiene en la muerte apoptótica inducida por camptotecina, la muerte independiente de caspasas muestra una disminución en los niveles de ATP después de 12 horas de tratamiento junto con un aumento en ERO. La suplementación de glucosa y un agente antioxidante aumentan la sobrevivencia de neuronas que mueren de manera independiente de caspasas, mientras que no tiene efecto en la muerte apoptótica inducida por camptotecina [57].

La gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH), una enzima glicolítica, también se ha visto implicada en la muerte celular independiente de caspasas. Esta enzima parece contribuir a la recuperación del potencial de membrana mitocondrial en líneas celulares tratadas con un agente inductor de apoptosis junto con un inhibidor general de caspasas, probablemente a través de un aumento en la glicólisis, un aumento en el ATP y promoviendo un proceso autofágico. La GAPDH se transloca al núcleo, induce expresión de Atg12 y el proceso autofágico ayuda a eliminar las mitocondrias dañadas contribuyendo a un aumento en la sobrevivencia celular [106].

Por otro lado, varias proteínas involucradas en la señalización apoptótica funcionan como importantes reguladores del metabolismo celular. La remoción de factores tróficos lleva a una disminución en el metabolismo y a la remoción de transportadores de nutrientes de la superficie celular, a una disminución en la velocidad glicolítica, disminución de sustratos para la fosforilación oxidativa, despolarización de la membrana mitocondrial y cambios en la morfología mitocondrial. Bax puede funcionar como sensor energético o actuar en respuesta a un sensor energético ya que se activa, oligomeriza y se trasloca a la mitocondria en respuesta a privación de glucosa, y su activación puede inhibirse aumentando los niveles de transportadores de glucosa o la actividad de enzimas glicolíticas. Bad se fosforila después de la activación de cinasas como Akt, Pim-2 y Ras, las cuales funcionan en el control metabólico. Además, Bad se ha encontrado en complejos con la glucocinasa en hepatocitos y se ha propuesto que la fosforilación de Bad regule la actividad de esta enzima. Bad también se desfosforila por privación de glucosa o de factores tróficos. Por último, las cinasas Akt y Pim-2 regulan la sobrevivencia en respuesta a factores tróficos. Akt puede regular directamente a la glicólisis aumentando la velocidad de transporte de glucosa y aumentando las actividades de la hexocinasa y la fosfofructocinasa (PFK)-1, así como la fosforilación de PFK2.

También puede fosforilar a la ATP citrato liasa, una enzima importante para la síntesis de ácidos grasos y la importación de acetil coenzima A al citoplasma [107].

A diferencia de los procesos apoptóticos y autofágicos dependientes de ATP, en la necrosis ocurren procesos que disminuyen el ATP. Algunas situaciones como la isquemia, la inflamación, el daño inducido por ERO y la excitotoxicidad por glutamato se acompañan con una disminución en ATP por sobreactivación de PARP-1 [46]. Como se menciona anteriormente, PARP-1 une oligómeros de ADP-ribosa a sí misma y a otras proteínas en respuesta a rupturas en el DNA que pueden ser inducidos por ERO como el peroxinitrito y radical hidroxilo [76]. Como el NAD⁺ es sustrato de esta enzima, la activación de PARP-1 induce disminución de ATP para la síntesis de su sustrato [45]. Esta profunda disminución de ATP puede disminuir los sistemas de transporte activo membranar llevando a una mayor permeabilización membranar, una distribución alterada de iones y una disminución del potencial de membrana mitocondrial. Estos eventos pueden llevar finalmente a la ruptura de organelos y a la lisis celular [46]. Durante la apoptosis, PARP-1 es proteolizada por la caspasa-3 en sitios específicos en el dominio de unión a DNA de la enzima. Estos fragmentos mantienen su actividad enzimática pero no pueden ser estimulados por rupturas en el DNA. La función de la proteólisis de PARP-1 mediada por caspasa-3 parece ser el proteger a los sustratos energéticos de su uso por PARP-1, dejando suficiente energía para la ejecución del proceso apoptótico [76].

PARP-1 también se ha implicado en la MCP independiente de caspasas, ya que su activación induce la translocación de AIF y apoptosis. El NMDA induce muerte celular en cultivos primarios de neuronas corticales a través de la activación de AIF en una manera dependiente de PARP-1, ya que los cultivos deficientes de PARP-1 no muestran translocación de AIF, condensación nuclear o muerte celular [76]. Además, en el mismo modelo, el peroxinitrito (ONOO⁻) puede inducir la activación mitocondrial de PARP-1 y la misma secuencia de eventos. Si los niveles de NAD⁺ son restablecidos en estos cultivos a través de liposomas que contienen NAD⁺, el potencial de membrana mitocondrial se preserva y se reduce la muerte celular [108]. Se sugiere que el restablecimiento de los niveles de NAD⁺ puede fomentar la glicólisis que podría estar bloqueada durante la activación de PARP-1. Los sustratos energéticos como el piruvato pueden rescatar a estas células de la muerte restableciendo los niveles de ATP [76].

Las implicaciones de la disminución de energía para el destino final de las células que mueren pueden ser particularmente relevantes en el sistema nervioso, donde las enfermedades

neurodegenerativas así como los daños como la hipoxia-isquemia se asocian generalmente con defectos en el metabolismo celular y con daño oxidativo.

b. La Importancia del Metabolismo Oxidativo en la Forma de Muerte Neuronal

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) y de nitrógeno (ERN) son productos del metabolismo celular normal. Ambos tienen efectos benéficos y dañinos sobre los sistemas vivientes. Los efectos dañinos se denominan estrés oxidativo y nitrosativo respectivamente y ocurren cuando existe una sobreproducción de ERO y ERN junto con una deficiencia en los sistemas antioxidantes. Así, a concentraciones altas, las ERO pueden dañar estructuras celulares, ácidos nucleicos, lípidos y proteínas. En el sistema nervioso, se observa daño por ERO en condiciones patológicas como el daño por isquemia/ reperfusión y también se observa daño oxidativo en desórdenes neurológicos como las enfermedades de Alzheimer y Parkinson [109]. Los efectos benéficos ocurren en concentraciones bajas o moderadas y comprenden papeles fisiológicos en respuestas celulares como defensa contra agentes infecciosos, funciones en sistemas de señalización celular y en la inducción de una respuesta mitogénica. Las vías de señalización que se sabe se activan por un aumento en la producción de ERO comprenden a las cinasas JNK y p38, la proteína cinasa D (PKD), que puede actuar como un sensor de ERO en la célula junto con NfκB y como inductor de la expresión de enzimas antioxidantes [13, 110].

El estrés oxidativo se ha implicado en la MCP neuronal, ya sea como un efector de muerte celular causando daño oxidativo al DNA, lípidos y proteínas, o como moléculas señalizadoras vía factores celulares sensibles al estado de óxido-reducción. En particular, las ERO se han implicado en la muerte neuronal apoptótica (Figura 3) [12, 13, 88], necrótica [45, 46], autofágica (Figura 4) e independiente de caspasas [16, 57].

La muerte apoptótica de NGC inducida por privación de potasio, así como de neuronas simpáticas apoptóticas privadas de factores tróficos, muestra un aumento en la producción de ERO que se puede inhibir por antioxidantes y evitar la muerte neuronal [12, 88, 111]. La exposición a glutamato muestra un aumento en ERO dependiente de Ca^{2+} y la reducción de estas ERO por antioxidantes protege a las neuronas hipocampales, así como a las corticales [112]. El influjo de Ca^{2+} durante la excitotoxicidad también puede estimular a la sintasa de óxido nítrico (NOS) para producir NO y así aumentar aún más la producción de ERO a través de la respiración mitocondrial [46]. Finalmente, las neuronas corticales tratadas con camptotecina y un inhibidor general de caspasas que mueren

con características autofágicas muestran un aumento en la producción de ERO que no ocurre en las neuronas apoptóticas que se tratan únicamente con camptotecina [57].

Además, al igual que el estado energético, existe evidencia que sugiere que el estrés oxidativo así como el nitrosativo pueden regular la forma de MCP. Como con otros tratamientos, la intensidad de la exposición a ERO parece definir si las células mueren apoptótica o necróticamente, y los cultivos de neuronas corticales tratadas con ONOO⁻ mueren apoptóticamente con tratamientos leves pero necróticamente cuando se aumenta la intensidad de la exposición [113]. Asimismo, la exposición de NGC a ERO específicas pueden producir distintas formas de muerte. Se produce una morfología apoptótica después de la exposición a anión superóxido o a oxígeno singulete y se produce una morfología necrótica después de la exposición a peróxido de hidrógeno [14].

Algunas señales intracelulares también se han asociado con la definición del tipo de muerte. Las NOS neuronal y endotelial requieren Ca^{2+} para su actividad. El influjo de Ca^{2+} que ocurre durante la muerte excitotóxica puede activar a la NOS y producir una cantidad excesiva de NO que puede inhibir al complejo I mitocondrial y promover la generación de ERO por este complejo, aumentando la intensidad del daño y posiblemente determinando un final necrótico. El NO también puede inhibir a la apoptosis afectando al complejo I mitocondrial y disminuyendo los niveles de ATP [96]. Además, el NO puede evitar la actividad de la caspasa-3 por nitrosilación, inhibir directamente a la apoptosis y promover necrosis [46]. Por otro lado, el citocromo-c se puede nitrosilar dentro de la mitocondria en su grupo hemo, y la inhibición de la nitrosilación de citocromo-c puede disminuir su capacidad de activar caspasas [100]. El NO puede también activar a PARP-1 en neuronas en proceso de excitotoxicidad, las ERO pueden inducir rupturas en las hebras de DNA que llevan a su activación y los inhibidores de PARP-1 son neuroprotectores en este modelo [114]. Las ERO pueden también causar translocación de AIF a través de una disfunción mitocondrial por mecanismos dependientes e independientes de PARP-1 [76].

Las defensas antioxidantes en la célula también pueden influir en la transición apoptosis/necrosis. El daño a los sistemas antioxidantes celulares (superóxido dismutasa y catalasa) evita la fragmentación internucleosomal del DNA, la activación de caspasas y produce liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) en NGC privadas de potasio [97].

Aunque no se ha establecido un papel preciso de las ERO en el proceso autofágico, se ha propuesto que la autofagia pueda funcionar para eliminar organelos viejos o dañados oxidativamente junto con

agregados de proteínas asociados con enfermedades neurodegenerativas [105], dando un papel antioxidante a la autofagia. Sin embargo, existen evidencias de que el proceso autofágico puede necesitar la producción de ERO. En diferentes modelos de autofagia, la muerte puede ser evitada por antioxidantes [39, 57, 115]. En la línea celular L929 tratada con un inhibidor general de caspasas, un modelo no-neuronal de muerte autofágica, la vía de señalización involucrada en la formación de características autofágicas involucra la degradación selectiva de la catalasa, uno de los principales antioxidantes celulares, cuya eliminación causa un desbalance oxidativo, peroxidación lipídica y finalmente una muerte celular no apoptótica [115]. Adicionalmente, los cultivos de neuronas corticales de rata tratados con camptotecina y un inhibidor general de caspasas mueren con características autofágicas presentando disminución energética, formación de radicales libres y un antioxidante confiere protección contra la muerte neuronal [57]. El blanco de las ERO parece ser la cisteína 81 de Atg4. Scherz-Shouval R, *et al* (2007) encontraron producción de ERO en líneas celulares autofágicas sometidas a privación de nutrientes, las características autofágicas pueden ser evitadas por la adición de antioxidantes y las células transfectadas con Atg4A^{C81S} muestran menos características autofágicas que las silvestres. Así, proponen que la elevación en concentración de ERO (H₂O₂) inactivaría a Atg4, promoviendo la lipidación de Atg8. Posteriormente, en el autofagolisosoma, la concentración de ERO debe ser menor permitiendo la activación de Atg4 y reciclando Atg8 [39]. Así, las ERO podrían también estar involucradas en vías de señalización de autofagia.

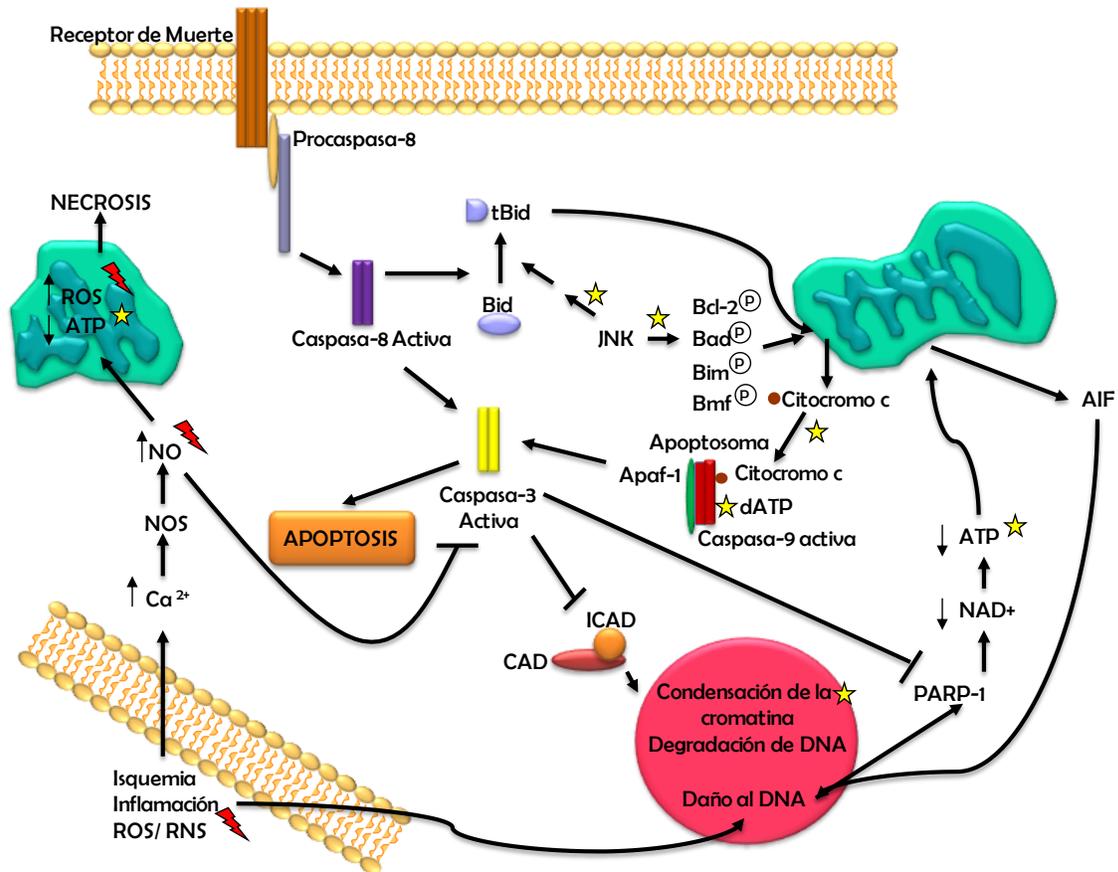


Figura 3. Pasos relacionados con ATP y ERO en la apoptosis y la necrosis. En la apoptosis se han descrito varios pasos dependientes de ATP como la formación del apoptosoma, la condensación de la cromatina y la formación de cuerpos apoptóticos. Además, las cinasas involucradas en la apoptosis, como JNK, utilizan ATP como donador de grupos fosfato y pueden fosforilar a miembros de la familia Bcl-2 e inactivar a sus miembros anti-apoptóticos y activar a Bad, Bim y Bmf, los miembros pro-apoptóticos. JNK también puede inducir la proteólisis de Bid a su forma truncada. Por otro lado, la isquemia-reperfusión, la inflamación, el daño inducido por ERO y la excitotoxicidad por glutamato puede inducir un decremento en ATP debido a una sobreactivación de PARP-1. PARP-1 también se ha visto involucrada en la MCP independiente de caspasas debido a que su activación induce translocación de AIF al núcleo y apoptosis. Durante la apoptosis, la caspasa-3 proteoliza a PARP-1 evitando la disminución en ATP. En influjo de Ca²⁺ durante la excitotoxicidad puede estimular a la sintasa de NO para producir NO y aumentar la producción de ERO por la respiración mitocondrial. El NO también puede disminuir a la apoptosis afectando al complejo I mitocondrial y disminuyendo los niveles de ATP. Además, el NO puede inactivar a la caspasa-3 por nitrosilación e inhibir directamente a la apoptosis promoviendo necrosis. (☆ = pasos dependientes de ATP; ⚡ = pasos dependientes de ERO, ERN).

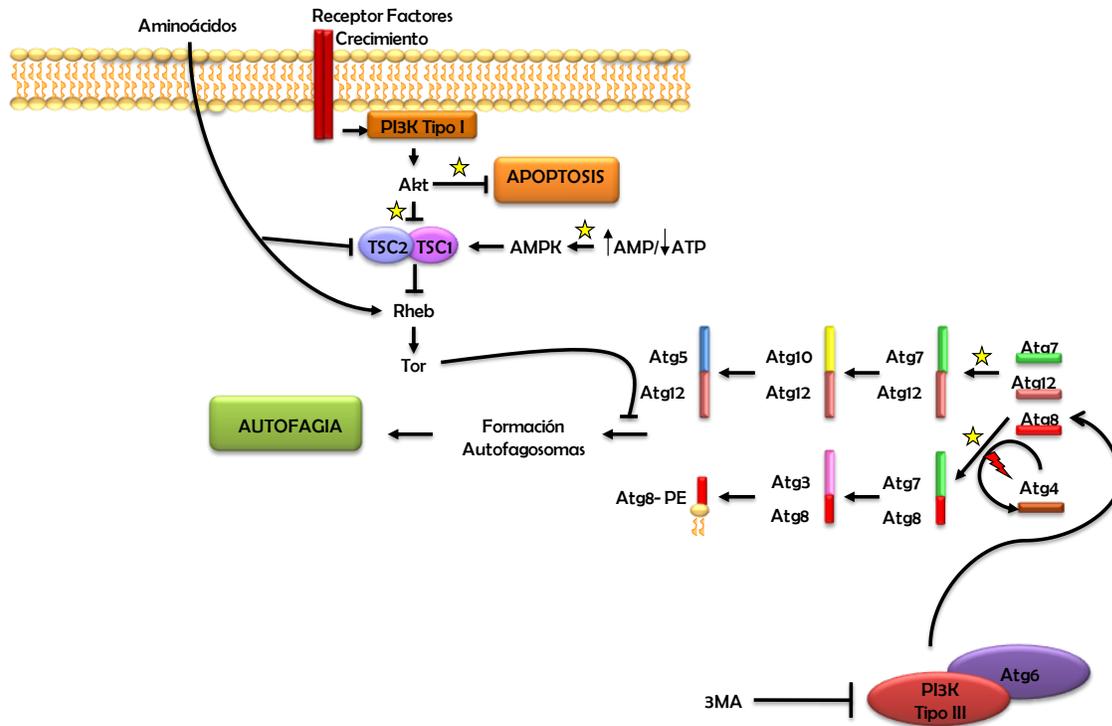


Figura 4. Pasos relacionados con ATP y ERO en la autofagia. La cinasa Tor y la AMPK son dos proteínas que pueden considerarse sensores energéticos. Los aminoácidos pueden activar a Tor por la inhibición de TSC1-TSC2 o por la estimulación de Rheb. La AMPK se activa en respuesta a un aumento en la relación AMP/ATP y una vez activa regula a la baja procesos con alta demanda energética como la síntesis de proteínas y estimula procesos generadores de ATP como la oxidación de ácidos grasos. Además, durante la formación de autofagosomas, Atg7 activa una glicina carboxi-terminal de Atg12 en un proceso dependiente de ATP de manera que pueda transferirse a Atg10 y finalmente a Atg5. El ATP también se necesita para la conjugación de Atg8 y Atg7, que están también involucrados en la formación de los autofagosomas. Finalmente, Atg4 puede estar regulada por ERO de manera que pueda unir y posteriormente desprender una fosfatidiletanolamina (PE) de Atg8 durante la formación del autofagosoma. (☆ = pasos dependientes de ATP; ⚡ = pasos dependientes de ERO).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha encontrado que en diversos modelos la muerte neuronal se puede dar por más de uno de los procesos anteriormente descritos. Así, un estímulo de muerte puede producir características apoptóticas, autofágicas e incluso necróticas. Por otro lado, las células parecen contar con mecanismos de muerte alternos. Éstos pueden funcionar cuando se inhibe la vía que normalmente tomarían o cuando se alteran ciertos procesos celulares necesarios para llevarla a cabo, como alteraciones en el estado energético u oxidante.

Así, la condición particular de la célula como su estado energético y el estado oxidante, parecen ser responsables, cada una por su lado o en combinación con la otra, de contribuir a la aparición de características de cierto tipo de muerte celular; ya sea programada (autofágica o apoptótica) o no programada (necrótica). En este trabajo se pretende conocer la contribución del estado energético celular y del contenido de especies reactivas de oxígeno como inductores de cierto tipo de muerte, particularmente muerte necrótica, apoptótica o autofágica. Con este propósito, se utilizó un modelo de muerte neuronal como es el cultivo de neuronas granulares de cerebelo (NGC) de rata sometidas a distintos tratamientos inductores de muerte.

HIPÓTESIS

La concentración intracelular de ERO así como la de ATP, éste último como medida del estado energético de la célula, determinarán las características morfológicas y bioquímicas de NGC en proceso de muerte inducida por diversos estímulos.

OBJETIVO GENERAL

Conocer la contribución del estado energético neuronal, así como de las especies reactivas de oxígeno para definir el tipo de muerte de NGC en cultivo ante distintos tratamientos inductores de muerte.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar el tipo de muerte (apoptótica, autofágica, necrótica) que presentan las NGC con distintos estímulos de muerte (privación de potasio, privación de suero, privación de potasio y suero, estaurosporina, glutamato).

Evaluar el papel del estrés oxidativo de las NGC en la progresión de la muerte apoptótica y su posible cambio a otro tipo de muerte en células tratadas con antioxidantes.

Evaluar el papel de la concentración intracelular de ATP en relación a la activación del tipo de muerte observado y su posible cambio a otro tipo de muerte en células tratadas con inhibidores energéticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos celulares: Los cultivos primarios de NGC se hicieron de ratas Wistar de 8 días postnatales de acuerdo a la técnica descrita por Morán y Patel (1989) [82] y se crecieron en condiciones despolarizantes de KCl 25mM. Después de 7-8 días *in Vitro* (DIV), estas células se utilizaron como controles en todos los experimentos (C) o recibieron un tratamiento inductor de muerte. Los tratamientos utilizados fueron: cambio a KCl 5 mM sin suero (K5), cambio a KCl 25 mM sin suero (K25), cambio a medio condicionado con suero y con potasio (K5+S), o estaurosporina 0.5 μ M(STS). Las células se incubaron durante distintos tiempos y se prepararon para su análisis inmediato (tinción de H \ddot{o} chst, viabilidad, etc.). Se utilizaron también células del mismo cultivo crecidas desde un inicio en potasio 5 mM (K5i) para utilizar este medio en el tratamiento de las células con suero privadas de potasio (K5+S). Para inducir excitotoxicidad por glutamato, las células de 7 DIV se trataron con glutamato 100 μ M (Glu) en medio Locke (NaCl 154 mM, KCl 5.6 mM, NaHCO₃ 3.6 mM, CaCl₂ 2.3 mM, Hepes 10 mM pH 7.4) a 37°C junto con glicina 1 μ M para activar completamente los canales tipo NMDA por 30 min. Posteriormente, se les regresó el medio condicionado con K25 por el tiempo indicado en los tratamientos. Las células control de glutamato se trataron con medio Locke por 30 min a 37°C y después se les regresó el medio condicionado por el tiempo indicado (Locke). En algunos experimentos se utilizaron NGC que se siembran con medio que contiene KCl 5 mM desde los 0 DIV.

Viabilidad celular: Se utilizó la técnica de reducción de MTT, basada en la transformación del mismo en azul de formazán por las células viables. Las células se incubaron con MTT (0.25 mg/mL) durante 15 min y el colorante se extrajo con DMSO por 30 min para su lectura a 570 nM. También se utilizó la tinción con diacetato de fluoresceína (FDA), un fluoróforo permeable a la célula que se proteoliza por las esterasas celulares haciéndolo impermeable y tiñendo a las células con esterasas activas y con una membrana plasmática íntegra. Al mismo tiempo, se incubaron con yoduro de propido (IP), un fluoróforo impermeable a la célula que únicamente puede intercalarse en el DNA de las células que tienen la membrana plasmática dañada. Las células se incubaron con FDA 5 μ M y con IP 7 μ M durante 5 min a 37°C. Posteriormente, se lavaron con PBS a temperatura ambiente (TA) y se observaron en un microscopio de epifluorescencia Nikon, utilizando los filtros G2A y B2A. Se contó el total de células en campo claro y las teñidas con cada uno de los fluoróforos. Los resultados se expresan como % de células teñidas.

Condensación nuclear: Las células se crecieron en cubreobjetos y después del tratamiento se fijaron con formaldehído al 4% en PBS durante 30 minutos a TA, se incubaron con Hoechst (Molecular Probes) al 0.01% por 5 min, se lavaron con PBS y se montaron utilizando glicerol/PBS para ser observadas al microscopio de epifluorescencia utilizando un filtro UV BA-2. Los resultados se expresan como porcentaje de núcleos condensados.

Fragmentación internucleosomal: Las células se recolectaron en buffer de lisis (Tris 10 mM, EDTA 10 mM, NaCl 10 mM, SDS 2%, pH=7.4), se incubaron 30 min a 4°C, y se digirieron con proteinasa K (400 µg/ml) a 56°C por 2 hrs. El DNA se extrajo con fenol-cloroformo, se precipitó con etanol, y las muestras se digirieron con RNasa A (Roche, 8 µg/ml) y se visualizaron con tinción de bromuro de etidio después de correrse en un gel de agarosa al 1.5% en TBE 0.5x (Trizma 1M, ácido bórico 40 mM, EDTA 1mM).

Tinción con monodansilcadaverina (MDC): Las células se crecieron en cubreobjetos y después del tratamiento se incubaron con MDC 0.5 µM en PBS por 10 min, se lavaron con PBS, se montaron en una cámara de perfusión y se observaron en un microscopio de fluorescencia utilizando un filtro de DAPI. Para la tinción con Anexina, las células se incubaron con 20 µl/ml de reactivo Annexin-FLUOS Staining Kit y con yoduro de propidio 3 µM por 10 min a 37°C, se lavaron con PBS y posteriormente se incubaron con MDC.

Microscopía electrónica: Las células se lavaron, se fijaron con glutaraldehído al 3% en PBS, se recolectaron y el botón se fijó con OsO₄ 1%. Después de lavarse, las células se deshidrataron en concentraciones ascendentes de etanol y se embebieron en resina Epon. Las secciones de 70 nm se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo y se observaron en un microscopio electrónico JEOL JEM-1200 EXII (JEOL, Japón).

Determinación de ATP: Las células se trataron con los distintos estímulos de muerte, se lavaron con PBS y se lisaron con solución liberadora de ATP (Sigma) durante 10 min. Posteriormente se recolectaron, centrifugaron y se separó el sobrenadante para su análisis por HPLC. La proteína se cuantificó tanto en el pellet como en el sobrenadante. Las condiciones utilizadas en el cromatógrafo fueron las descritas por Crescentini, G. y Stocchi, V., 1984 [116]. Fase A: KH₂PO₄ 0.1M pH=6.0; Fase B: KH₂PO₄ 0.1M pH=6.0/Metanol 90/10. Flujo 1.2 ml/min, A 100% 4 min, gradiente a 100% de B en 9 min, gradiente a 100% de A en 1 min. Tiempo de corrida, 20 min detección a 260nm. Columna: Phenomenex Prodigy ODS3 250 x 4.6mm, 5µm.

Liberación de LDH: La actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) liberada al medio de cultivo se determinó espectrofotométricamente. Después del tratamiento se tomó una alícuota de medio y se colocó en una celda de cuarzo con KH_2PO_4 1M pH 7.5, NADH 0.2 μM y piruvato 0.3 μM y se midió la disminución de NADH a 340 nm. Las proteínas se cuantificaron por el método de Bradford [117] y el resultado se expresa como μmol de lactato por mg de proteína por hora.

Inmunoblot: Las células se lavaron con PBS y se homogenizaron usando buffer de lisis (Tris 25 mM, NaCl 50 mM, Igepal 2%, SDS 0.2% e inhibidores de proteasas (Complete, Roche), pH=7.4). La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford [117]. Se tomaron 30 μg de los homogenados, se separaron en un gel de acrilamida Tris-Tricina al 20% y se transfirieron a una membrana de PVDF (polyvinylidene fluoride; Immobilon-P, Millipore). Se bloquearon con TBS (Trizma 100 mM, NaCl 150 mM, pH=7.5) y se incubaron durante toda la noche con un anticuerpo primario de conejo anti-LC3 (PD014, MBL Int.) o con un anticuerpo monoclonal anti GAPDH (Chemicon) a 4°C, ambos anticuerpos se utilizaron a una dilución 1:1,000. Después de lavarse, las membranas se incubaron con un anticuerpo secundario anti-conejo (Zymed) a una dilución 1:15,000 o anti-ratón (Sigma) a una dilución 1:30,000 acoplados a fosfatasa alcalina por 1h a temperatura ambiente. Las membranas se revelaron con un sistema de quimioluminiscencia (CDP-Star) y expuestas a placas Kodak. El análisis densitométrico utilizado se realizó con el programa Image-J del NIH versión 1.38x. Como control positivo, se utilizó rapamicina 200 nM junto con pepstatina A 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ por 24h.

Inmunocitoquímica: Las NGC se crecieron en portaobjetos previamente recubiertos con 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de poli-L-lisina. Después del tratamiento, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS por 10 min, se lavaron y se permeabilizaron con citrato de sodio al 0.1% y Tritón al 0.1%. Las células se bloquearon con suero de cabra al 10% en Tritón al 0.3% en PBS por 1h, se lavaron y se trataron con reactivo de TUNEL (Roche) acoplado a fluoresceína por 60 min a 37°C. Posteriormente se incubaron con anticuerpo primario anti-LC3 (PM036, MBL Int.) a 1:100 en solución de bloqueo toda la noche a 4 °C. Las células se lavaron y se incubaron con anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a rojo Texas (Vector) a 1:500 en solución de bloqueo a 37 °C, se lavaron y se montaron utilizando medio de montaje Vectashield (Vector Labs) con DAPI. Las células se observaron en un microscopio Olympus IX7a a 100X.

Detección de ERO: Las NGC se trataron con un medio con KCl 25 mM sin suero (K25), con un medio con KCl 5 mM sin suero (K5) por 4 h o se trataron con estaurosporina (STS) 0.5 mM por 5 h y se incubaron por 30 min con dihidroetidí 3.2 mM (Molecular Probes) en medio de

cultivo a 37°C. Las células se lavaron con PBS, se fijaron con formaldehído al 3% en PBS a 4°C por 7 min, se lavaron y se observaron en un microscopio Nikon de epifluorescencia utilizando un filtro G2A (excitación 546 nm, emisión 590 nm). Como controles positivos se utilizaron H₂O₂ 25 µM y xantina/ xantina oxidasa (XaXO). Las NGC se trataron por 4 h con H₂O₂ y para el tratamiento con XaXO, se incubaron con xantina 100 µM por 2 h y después se trataron con xantina oxidasa 45 mM/ml por otras 2 h. El MnTMPyP (MN, Calbiochem) se utilizó a una concentración de 50 µM por el tiempo indicado.

Análisis estadístico. Los datos en las gráficas expresan media \pm error estándar (ES) de más de tres experimentos independientes, se utilizaron ANOVAs de una vía seguidas de una prueba post-hoc de Tukey-Kramer para comparación de medias ($P \leq 0.05$) utilizando el software Systat 11 (Systat Software, Inc.)

RESULTADOS

I. Determinación del Tipo de Muerte de NGC Sometidas a Distintos Tratamientos Inductores de Muerte

a. Viabilidad

Con el fin de determinar el curso temporal de la pérdida de viabilidad en NGC sometidas a los distintos tratamientos, evaluamos viabilidad celular por ensayo de MTT a diferentes tiempos. Los tratamientos utilizados fueron los siguientes: privación de suero y potasio (K5), privación de suero (K25), privación de potasio (K5+S), estaurosporina 0.5 μ M (STS), glutamato 100 μ M (Glu) (Glu).

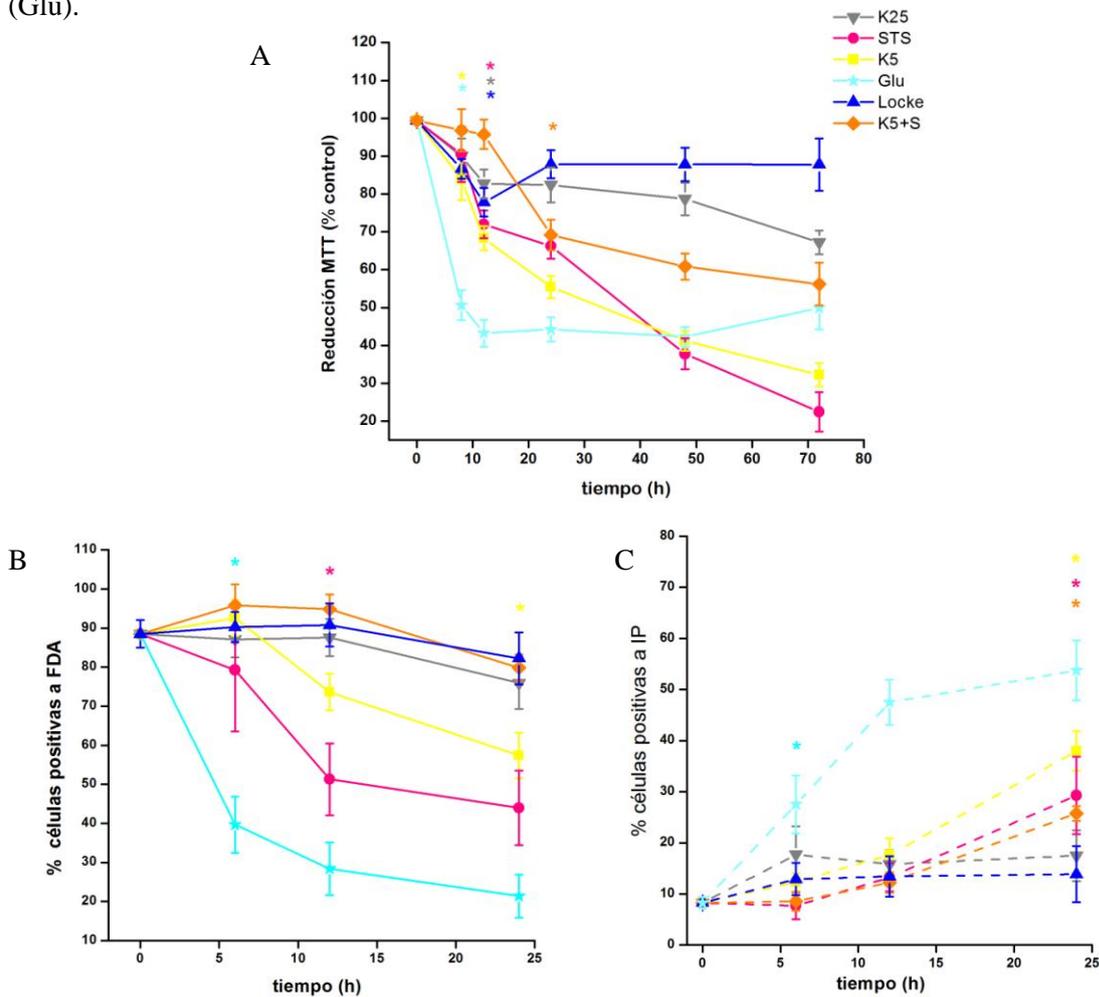


Figura 5. Viabilidad de NGC sometidas a distintos tratamientos inductores de muerte: Los tratamientos utilizados fueron privación de suero (K25), privación de suero y potasio (K5), privación de potasio (K5+S), estaurosporina 0.5 μ M (STS), glutamato 100 μ M (Glu), control de glutamato (Locke). La viabilidad se determinó por MTT (A) y por tinción con FDA (B) y de IP (C). Las gráficas muestra datos de 5 experimentos independientes y se representa la media \pm error estándar. * = diferencia significativa a partir del tiempo indicado con respecto al tiempo = 0h, $p \leq 0.01$.

Cuando la viabilidad se mide por medio de la reducción del MTT, las células tratadas con privación de suero (K25) muestran una disminución significativa a partir de las 12 horas y a las 72 horas muere alrededor del 33% de las células (Figura 5A). Las células tratadas con STS y con K5, muestran una pérdida en la viabilidad muy parecida entre ellas y van disminuyendo gradualmente hasta llegar al 22-32% de viabilidad respectivamente a las 72 horas (Figura 5A). Esta disminución gradual coincide con la muerte con características apoptóticas que se sabe pueden inducir estos estímulos [65, 66]. La muerte por privación de potasio (K5+S) comienza a ser significativa hasta las 24 horas y la viabilidad llega aproximadamente a 56% a las 72 horas, sugiriendo que la muerte observada en las células tratadas con K5 se deba a una combinación de la privación de suero y potasio y no sólo a la privación de potasio, aunque la contribución a la muerte de la privación de potasio es mayor (Figura 5A).

El tratamiento con glutamato (Glu) indujo la máxima pérdida en la viabilidad a las 8 h llegando a un 50% y la viabilidad se mantuvo hasta las 72h (Figura 5A). Esta pérdida en viabilidad tan rápida coincide con la muerte necrótica que se ha reportado en estas células bajo este estímulo [10]. Los controles de glutamato (Locke) mantienen su viabilidad constante, con un 88% de sobrevivencia hasta las 72h (Figura 5A). En este tratamiento, la aparente pérdida en viabilidad que se observa a las 12 horas podría deberse a un evento de estrés oxidativo ya que la inhibición en la reducción del MTT se puede utilizar también para medir ERO.

Como se sabe que las NGC muestran un aumento en la producción de ERO durante la muerte apoptótica (Valencia y Morán, 2001), y que éstas pueden interferir en la reducción del MTT, se corroboró la viabilidad por FDA. El FDA (diacetato de fluoresceína) es un fluoróforo permeable a las membranas celulares. Al entrar a la célula es procesado por las esterasas haciéndolo impermeable. Por lo tanto, las células que muestran tinción con FDA tienen esterasas funcionales y una membrana plasmática íntegra. También como parámetro de daño a la membrana plasmática, se evaluó la tinción con yoduro de propidio (IP). El IP es un fluoróforo impermeable a la célula, por lo que al existir una membrana plasmática íntegra, éste no puede penetrar a la célula. Por otro lado, cuando hay un daño en la membrana plasmática, el IP puede penetrar e intercalarse en el DNA, dando al núcleo una coloración roja al ser visto en un microscopio de fluorescencia.

En la tinción con FDA, la única condición que muestra reducción significativa con respecto al control a las 6 horas son las células tratadas con glutamato (Glu, Figura 5B). También ésta es la única condición que muestra un aumento significativo con respecto al control a este tiempo (Figura 5C). Las células K5 no muestran diferencia con respecto al control ni a las 6 ni a las 12 horas, apoyando la idea de que el estrés oxidativo interfiere con la reducción del MTT o que la

disfunción en las deshidrogenasas celulares precede a la pérdida de integridad de la membrana plasmática en este tratamiento (Figura 5B). A las 12 horas, la única diferencia en viabilidad se ve en el tratamiento con STS (Figura 5B), con un 51%, comparado con un 72% observado a este mismo tiempo en el MTT (Figura 5A). Probablemente la STS cause mayor daño a la membrana plasmática en este tiempo que los otros tratamientos inductores de apoptosis.

Los tratamientos de K25, K5+S y el control de glutamato (Locke) no muestran diferencia con respecto al control hasta las 24 horas cuando la viabilidad se mide por FDA (Figura 5B), a diferencia de lo observado en el MTT, donde sí se observan diferencias a estos tiempos (Figura 5A). La diferencia en ambos métodos podría deberse a posibles procesos de estrés oxidativo en estos tratamientos que interfieran con la reducción del MTT. Lo anterior pone en evidencia la importancia de medir la viabilidad por más de un método.

Del mismo modo, las células tratadas con Glu comienzan a mostrar incremento en la tinción de IP desde las 6 h, consistente con la pérdida drástica de la viabilidad que se da a este tiempo y nos da otra señal más de muerte necrótica en este tratamiento. A las 24 horas, los demás tratamientos muestran aumento en la tinción con IP (K25, K5, K5+S, STS), indicando cierto daño en la membrana plasmática consistente con la liberación de LDH observada en estos tratamientos a este mismo tiempo (Figura 8).

b. Condensación Nuclear y Fragmentación Internucleosomal

Para evaluar el tipo de muerte que se presenta en estos tratamientos, se estudiaron primero algunas características apoptóticas. Se evaluaron la condensación nuclear y la fragmentación internucleosomal del DNA. La condensación nuclear se evaluó por tinción de H \ddot{o} chst de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos.

Se observó condensación nuclear en las células tratadas con K5, K5+S, STS y Glu (Figura 6). Se observa un aumento gradual en la condensación nuclear en las células tratadas con K5 y STS. La STS induce la mayor condensación nuclear, llegando hasta un 88% a las 72h. Las células tratadas con Glu mostraron un aumento en la condensación nuclear a las 8 horas, que se mantiene hasta las 72h.

Los controles del glutamato (Locke), así como las células K25 no mostraron condensación nuclear hasta las 72 horas (Figura 6), sugiriendo que la condensación observada en las células K5 se debe a la privación de potasio y no a la privación de suero.

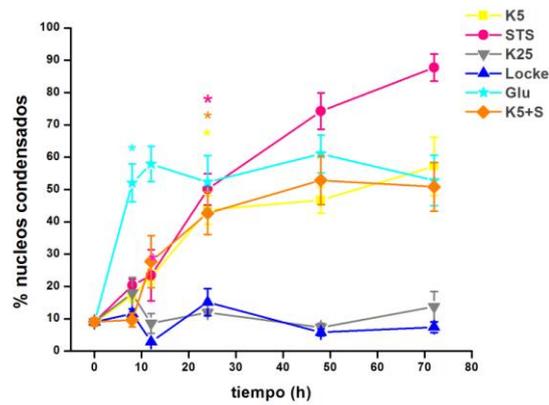


Figura 6. Curso temporal de la condensación nuclear evaluada por tinción de H₂O en NGC sometidas a distintos tratamientos: privación de suero (K25), privación de suero y potasio (K5), privación de potasio (K5+S), estaurosporina (STS), glutamato (Glu), control de glutamato (Locke). La gráfica muestra datos de 3 experimentos independientes y se representa la media \pm error estándar. * = diferencia significativa con respecto a t = 0h; $p \leq 0.01$.

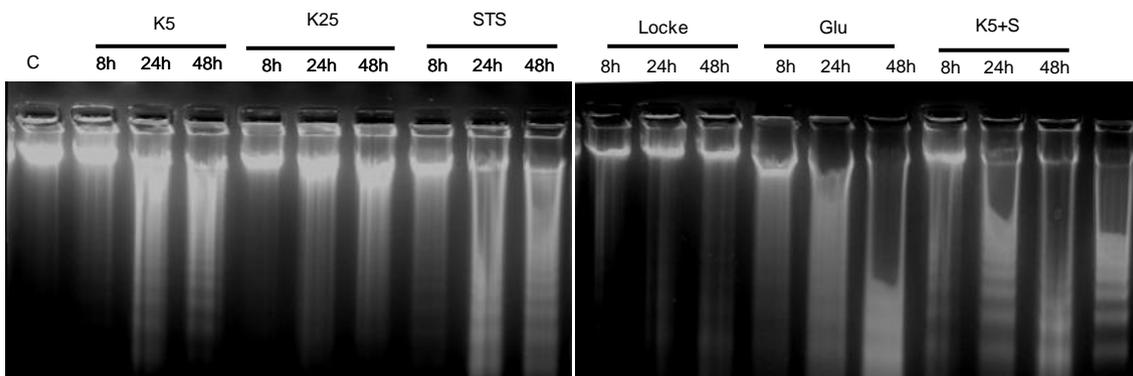


Figura 7. Fragmentación internucleosomal del DNA en NGC sometidas a diferentes tratamientos inductores de muerte. Las NGC se crecieron por 7 DIV en K25 (C), o se trataron con privación de suero (K25), privación de suero y potasio (K5), privación de potasio (K5+S), estaurosporina (STS), glutamato (Glu), control de glutamato (Locke). El DNA se extrajo a distintos tiempos de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos y se evaluó la fragmentación internucleosomal del mismo.

Se evaluó también la fragmentación internucleosomal del DNA en los tratamientos ya mencionados. En las NGC tratadas con K5, K5+S y STS se observa fragmentación internucleosomal desde las 8 horas de tratamiento (Figura 7), lo que coincide con el aumento en condensación nuclear observado en estos tratamientos (Figura 6) y con la morfología apoptótica que se esperaba observar en estas células. Las células tratadas con privación de suero (K25) no muestran fragmentación internucleosomal ni condensación nuclear hasta las 48 h (Figura 6), por lo que la pérdida en viabilidad observada a este tiempo por MTT (Figura 5A) no puede deberse

a un evento apoptótico. Hasta aquí podemos concluir que las características apoptóticas que se observan en las células K5 se deben a la privación de potasio y no a la de suero.

En las células tratadas con Glu se observa degradación del DNA desde las 8 h (Figura 7). A las 24 h, el DNA se encuentra completamente degradado, se observa un barrido característico de necrosis con una ligera fragmentación internucleosomal (Figura 7). Por lo tanto, de acuerdo a lo reportado anteriormente [10], la pérdida en viabilidad a tiempos cortos puede deberse a un evento necrótico y posteriormente las células que sobreviven pueden morir por un proceso apoptótico más lento. Las células control de glutamato (Locke), así como las células control, no mostraron degradación del DNA en todos los tiempos estudiados (Figura 7).

c. Permeabilización de Membrana Plasmática

Para evaluar características necróticas, se evaluó la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) al medio de cultivo como medida de daño en la membrana plasmática. La LDH es una enzima citosólica y normalmente no se libera al medio, por lo que el encontrar actividad de la enzima en el medio de cultivo es indicativo de que ha ocurrido un daño en la membrana plasmática y ésta se ha liberado.

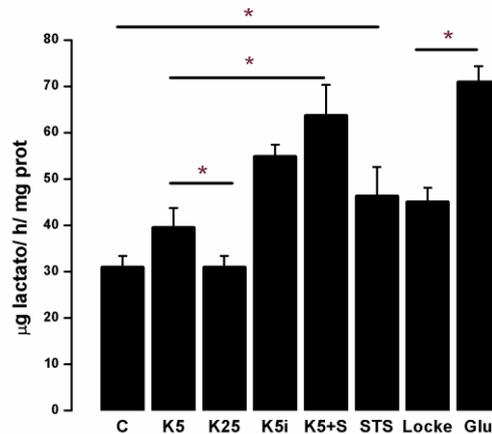


Figura 8. Liberación de LDH evaluada en NGC sometidas a distintos tratamientos por 24 horas.

Las células se crecieron crónicamente en alto potasio (C), crónicamente en bajo potasio (K5i) o se trataron con: privación de suero y potasio (K5), privación de suero (K25), privación de potasio (K5+S), estaurosporina (STS), glutamato (Glu), control de glutamato (Locke). La actividad de LDH se evaluó de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos. La gráfica muestra datos de 7 experimentos independientes. * = diferencia significativa, $p \leq 0.01$.

Para tratar las células K5+S, se utiliza el medio condicionado de NGC crecidas crónicamente en KCl 5 mM (K5i) con suero. Como estas células se encuentran en proceso de muerte [118], se midió también la actividad de LDH en células crecidas crónicamente en bajo potasio a los 7 días

para descartar que la actividad observada en las células K5+S se debiera a las células que habían muerto previamente por el bajo potasio crónico (Figura 8).

Las células K5 no mostraron diferencia con el control (C) y sí con las células privadas de suero (K25), sugiriendo que la privación de potasio pueda inducir liberación de LDH a las 24 h (Figura 8). Sin embargo, las células privadas de potasio (K5+S) no mostraron diferencias en liberación al compararlas con las células de las que se toma el medio para tratarlas (K5i), por lo que si la privación de potasio puede inducir liberación de LDH a las 24 h, ésta no debe ser muy importante (Figura 8). Las células privadas de potasio (K5+S) muestran mayor liberación de LDH que las privadas de suero y potasio (K5, Figura 8). Esta diferencia se atribuye a que el medio utilizado para tratar las células K5+S viene de células en proceso de muerte (K5i). Las NGC cultivadas en medio con KCl 5 mM mueren alrededor de los 4-5 días [82], por lo que si el medio se toma a los 7 días, la mayoría de estas células deben estar muertas y debe de existir LDH en el medio.

Las células tratadas con STS muestran mayor liberación de LDH que el control (K25), sugiriendo un posible daño a la membrana plasmática en este tiempo. En 24 horas, las células tratadas con STS y con K5 muestran una viabilidad medida por tinción con FDA del 44 y del 57% respectivamente, y del 66 y 55% medida por MTT (figura 5). Posiblemente algunas de las células que murieron apoptóticamente (mostrando condensación nuclear y fragmentación internucleosomal) hayan sufrido una necrosis secundaria debida a la ausencia de fagocitos en el cultivo mostrando un aumento en la liberación de LDH a este tiempo.

A las 24 h, la máxima liberación de LDH se observó en las células tratadas con glutamato, que coincide con la aparición de un barrido (Figura 7) por la degradación del DNA causada por DNAsas extracelulares, por lo tanto el daño a la membrana plasmática es evidente en este tiempo bajo este tratamiento. También las células tratadas con Glu muestran mayor liberación de LDH que sus controles de acuerdo a lo esperado, lo que sugiere que a este tiempo, las células han muerto necróticamente.

d. Tinción con Monodansilcadaverina (MDC)

El otro tipo de MCP que se estudió fue la muerte autofágica. Para estudiar las características autofágicas realizamos una tinción con monodansilcadaverina y evaluamos la aparición de autofosomas por microscopía electrónica en los distintos tratamientos.

Se utilizó un MDC como un índice preliminar de la cantidad de autofagosomas en las células. Se sabe que este colorante autofluorescente tiñe compartimentos esféricos ácidos con alta densidad membranal y con contenido de catepsina D y fosfatasa ácida [119]. También se sugiere que tiene alta afinidad por el contenido lipídico de las vacuolas autofágicas [120] por lo que aunque se espera una tinción basal de lisosomas en la célula, un aumento en la fluorescencia podría indicar la formación de autofagosomas o autofagolisosomas que son compartimentos con contenido ácido de doble membrana.

Bampton *et al* (2005) [121], al comparar diferentes marcadores para autofagia, encontraron que la MDC marcó compartimentos acídicos positivos para CD63, un marcador de endosomas/lisosomas tardíos. También observaron aumento en la tinción de MDC aún en fibroblastos deficientes en Atg5 tratados con rapamicina. Sin embargo, se sabe que ocurre un aumento en la fluorescencia de células teñidas con MDC a las cuales se les induce autofagia. Además, se ha reportado que en NGC ocurre un aumento en la fluorescencia de MDC que correlaciona con un patrón punteado de LC3 [68].

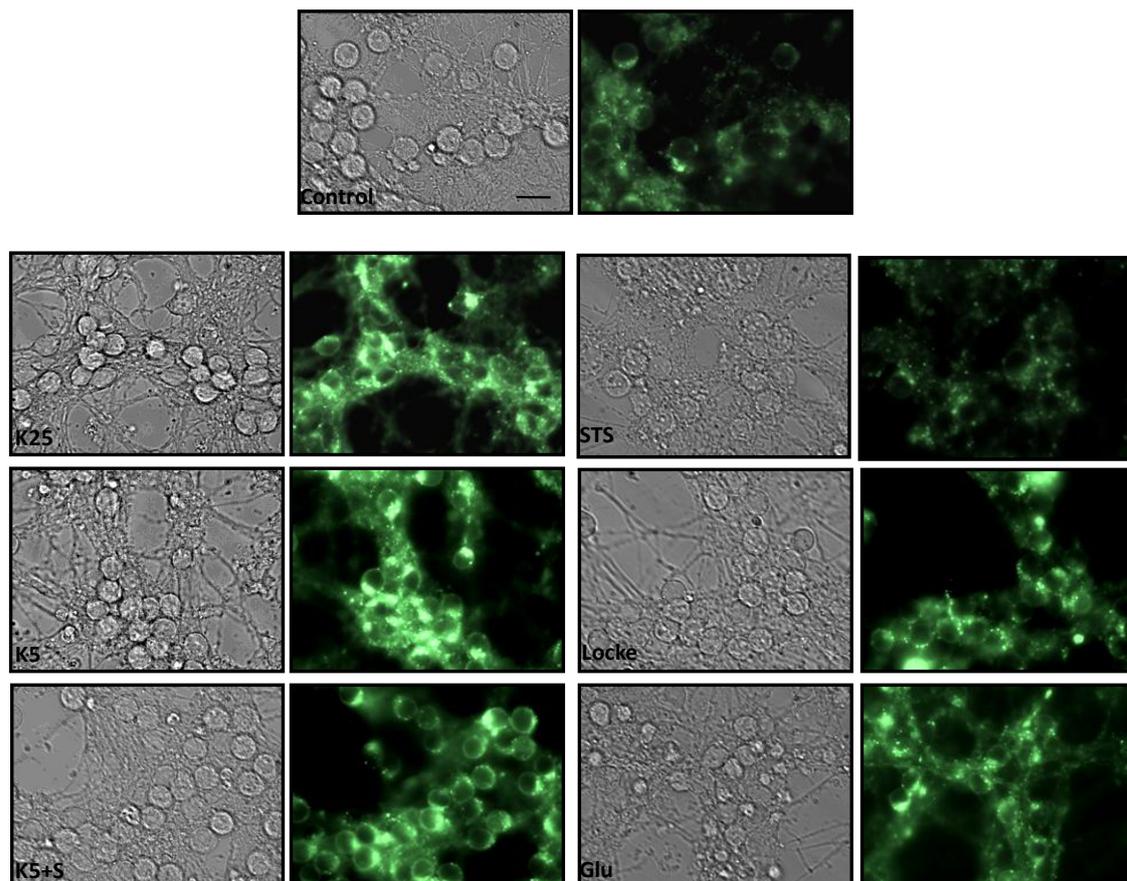


Figura 9. Tinción con monodansilcadvaverina (MDC) en NGC tratadas con distintos inductores de muerte por 8h. Las células control se crecieron desde el inicio en KCl 25 mM y a los 7 DIV se sometieron a distintos tratamientos inductores de muerte: privación de suero (K25), privación de suero y potasio (K5), privación de potasio (K5+S), estaurosporina (STS), glutamato (Glu), control de glutamato

(Locke). Se muestran fotografías en Nomarski y utilizando un filtro de fluorescencia UV BA-2, el aumento utilizado es de 63x, la barra representa 10 μ M.

Las células tratadas con MDC mostraron un aumento en tinción en la condición de K5 a partir de las 2 horas y hasta las 8h de tratamiento (Figura 9). Esta tinción se concentra en un polo de la célula y las células se ven más alargadas que los controles. Las células K25 y K5+S mostraron también un aumento en la fluorescencia comparadas con el control, aunque no tan marcada como la observada en las células K5 (Figura 9). Probablemente la privación de suero pueda inducir una respuesta autofágica como resultado a una privación de nutrientes.

Las células tratadas con STS no mostraron acumulación en la tinción parecida a la observada en K5 a ninguno de los tiempos evaluados (Figura 9). Sin embargo, la fluorescencia es distinta a la observada con los otros tratamientos ya que parece que los puntos teñidos son más grandes que los que se observan en el control. Probablemente la acumulación de la tinción en un polo de la célula sea una característica exclusiva de las privaciones de suero y de potasio, y la diferencia en tinción de las células tratadas con STS comparadas con el control (K25), sea la que indique que se lleva a cabo un proceso autofágico, si es que éste está ocurriendo.

Algunas de las células tratadas con Glu y del control de glutamato (Locke) mostraron una tinción parecida a las células K5, por lo que probablemente el permanecer en medio Locke pueda inducir la formación de autofagosomas como respuesta a la privación de nutrientes. Sin embargo, la formación de autofagosomas parece no estar involucrada en la muerte bajo estos tratamientos ya que el tratamiento con 3MA no evita la muerte inducida por Glu (resultados no mostrados).

e. Microscopía Electrónica de NGC Sometidas a Distintos Tratamientos Inductores de Muerte

A pesar de existir diversas técnicas para evaluar características apoptóticas y autofágicas, la apoptosis se describió inicialmente por la morfología de las células que mueren, caracterizándose por una disminución en el volumen celular y una condensación nuclear y de la cromatina. Por otro lado, existe controversia sobre las técnicas utilizadas actualmente para detectar autofagia [37], por lo que la técnica más contundente sigue siendo la observación de vacuolas autofágicas por microscopía electrónica. Por lo anterior, las células sometidas a los distintos tratamientos se observaron en el microscopio electrónico. Las células C, K25, K5, K5+S y STS se trataron por 12 h y las células de Glu y Locke por 8 h.

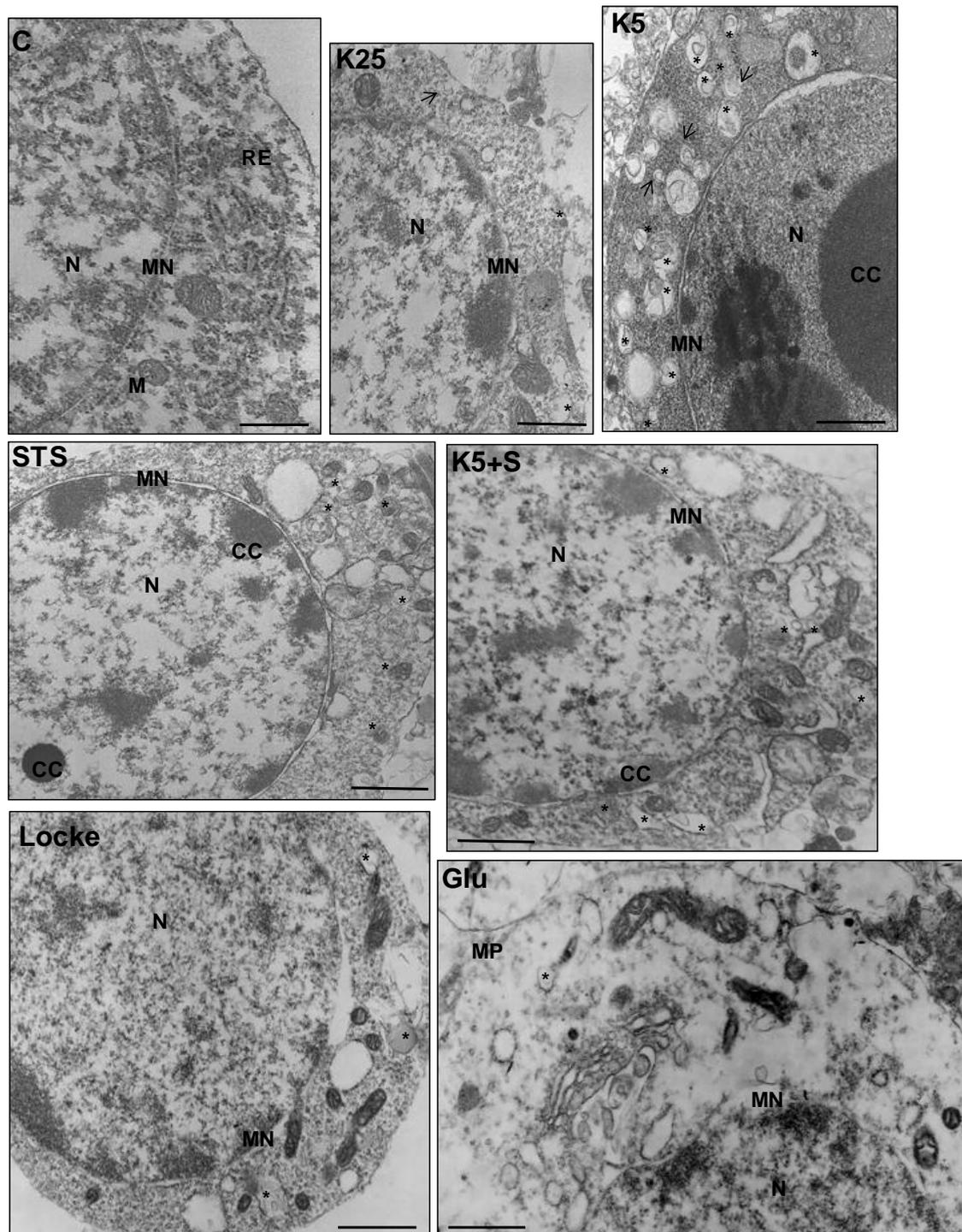


Figura 10. Microscopía electrónica de NGC sometidas a distintos tratamientos inductores de muerte. Las células control (C) se crecieron desde el inicio en KCl 25 mM y a los 7 DIV se sometieron a distintos tratamientos inductores de muerte: privación de suero (K25), privación de suero y potasio (K5), privación de potasio (K5+S), estaurosporina (STS), glutamato (Glu), control de glutamato (Locke). Los asteriscos señalan las estructuras consideradas como autofagosomas y las flechas señalan estructuras preautofagosomales. N, núcleo; MN, membrana nuclear; RE, retículo endoplásmico; CC, cromatina condensada; MP, membrana plasmática. La barra representa 1 μ M.

En las células control (C), se observa un núcleo con la cromatina no condensada y se aprecian mitocondrias sanas (Figura 10). En las células K25, no se observa gran diferencia con respecto al control (Figura 10). Sin embargo, se observa una ligera condensación de la cromatina, se observan algunas vacuolas de doble membrana con contenido autofágico que se consideran como autofagosomas (asteriscos) y membranas que parecen estructuras pre-autofagosomales (flechas). Las células K5+S muestran una ligera condensación de la cromatina y se observan algunos autofagosomas (Figura 10).

En las células K5, se observa una intensa vacuolización y gran número de autofagosomas, la cromatina se condensa tanto en la periferia del núcleo como en cúmulos dentro del mismo (Figura 10). Por lo tanto, bajo este tratamiento, las células muestran tanto características apoptóticas como autofágicas. Las células tratadas con STS también muestran condensación de la cromatina en la periferia nuclear principalmente y se observan vacuolas con contenido autofágico, comprobando la aparición de características autofágicas durante la muerte inducida por STS (Figura 10).

En las células tratadas con Glu, no se observa condensación de la cromatina, incluso las células se ven hinchadas, de acuerdo con el proceso necrótico que se sabe está ocurriendo en la muerte por este estímulo (Figura 10). En los controles del glutamato, se observan vesículas autofágicas, de acuerdo a lo observado en la tinción con MDC, aunque este proceso podría deberse a una señal de supervivencia por la privación de nutrientes a la que se someten estas células (Figura 10).

f. Concentración de ATP en NGC Sometidas a Distintos Tratamientos Inductores de Muerte

Con el fin de evaluar si el estado energético celular influye en el tipo de muerte presentada, se determinaron los niveles de ATP en las NGC sometidas a los distintos tratamientos por HPLC.

En las células K5+S, K25 y CG, las concentraciones intracelulares de ATP se mantienen hasta las 24 h (Figura 11). Por el contrario, en las células tratadas con K5, STS o con Glu, se observa una disminución gradual de ATP (Figura 11). En el caso de las células K5, se observa un aumento en la concentración de ATP a las 4 h, y una disminución gradual en la misma que muestra diferencias con el control hasta las 24 h (Figura 11).

Las células tratadas con STS muestran diferencias en el contenido de ATP a las 12 y a las 24 h. En el caso de Glu, la disminución en ATP se observa desde las 2 h (Figura 11). Una

disminución drástica en los niveles de ATP se ha asociado con muerte de tipo necrótico [122]. Por lo tanto, la caída en ATP de las células tratadas con Glu corresponde con las características necróticas que se observan en este tratamiento.

Las células tratadas con STS se comportan de acuerdo a lo esperado en un proceso apoptótico, donde la disminución en el ATP se da de manera gradual [101]. Sin embargo, aunque en las células K5 y K5+S los niveles de ATP aumentan y muestran características apoptóticas, no sucede lo mismo en las células tratadas con STS, por lo que ni el mantener los niveles energéticos ni la disminución gradual de los mismos parecen ser necesarios para observar características apoptóticas.

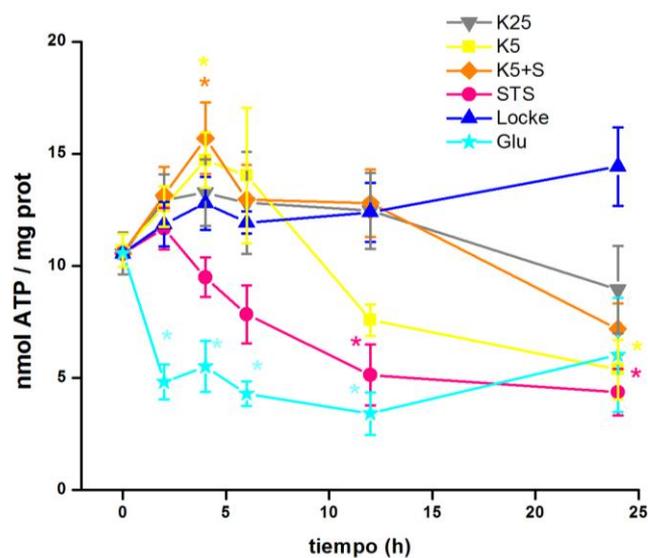


Figura 11. Concentración de ATP de NGC sometidas a distintos tratamientos inductores de muerte.

Las NGC se sometieron a los siguientes tratamientos: privación de suero (K25), privación de suero y potasio (K5), privación de potasio (K5+S), estaurosporina (STS), glutamato (Glu), control de glutamato (Locke) por el tiempo indicado y se evaluaron sus niveles de ATP por HPLC. La gráfica muestra media \pm error estándar de un mínimo de 3 experimentos independientes, * representa diferencias significativas con respecto a $t = 0$; $p \leq 0.05$.

Con el fin de determinar si la concentración de ERO influye en la aparición de características de cierto tipo de MCP, determinamos las ERO producidas durante los diferentes tratamientos.

g. Producción de ERO en NGC Sometidas a Distintos Tratamientos

Se sabe que durante el proceso de muerte apoptótica por privación de suero y potasio de las NGC hay una producción de ERO [12] y que las ERO pueden promover muerte apoptótica y necrótica en NGC [14]. Por otro lado, las ERO parecen también tener un papel importante en la muerte autofágica [16]. Por lo tanto, evaluamos la concentración de ERO en NGC sometidas a

los tratamientos estudiados por medio de tinción de dihidroetidio (DHE). El DHE es un compuesto reducido que puede ser oxidado por ERO, especialmente anión superóxido (O_2^-), posteriormente se intercala en el DNA y puede evaluarse por núcleos teñidos de rojo en un microscopio de fluorescencia.

Se observa un aumento en la cantidad de núcleos teñidos con DHE desde las 2 h en las NGC tratadas con Glu (Figura 12), lo cual podría deberse a una cantidad masiva de calcio que entra a la célula y que podría activar procesos productores de ERO. Esta concentración se mantiene hasta las 8 h, lo que podría provocar cambios oxidativos en la célula como una peroxidación lipídica que llevaría a la pérdida de integridad de la membrana plasmática.

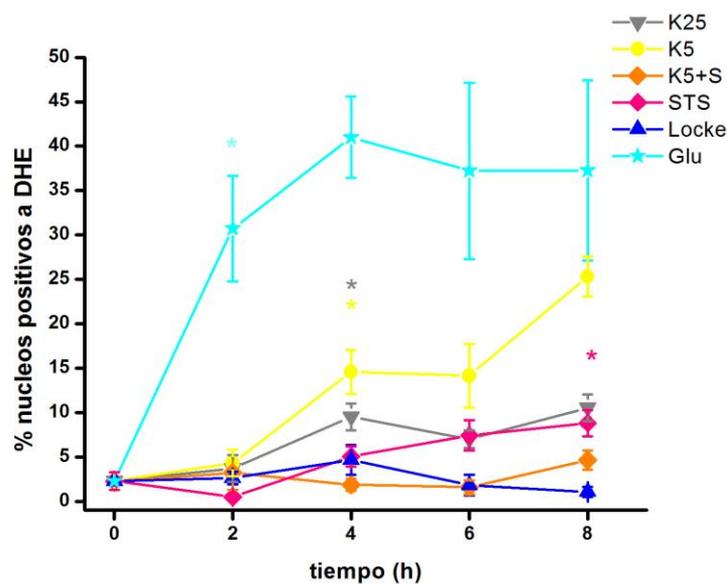


Figura 12. Producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) evaluada por tinción de dihidroetidio (DHE) en NGC sometidas a los distintos tratamientos. Las NGC se sometieron a los siguientes tratamientos: privación de suero (K25), privación de suero y potasio (K5), privación de potasio (K5+S), estaurosporina (STS), glutamato (Glu), control de glutamato (Locke) y se evaluó la producción de ERO a diferentes tiempos. La gráfica muestra datos de un mínimo de 3 experimentos independientes y se representa la media \pm error estándar, * representa diferencias de t = 0 con $p \leq 0.01$.

De acuerdo con lo reportado anteriormente [12], también se observa un aumento en la concentración de ERO en las NGC tratadas con K5 a las 4 horas, la cual coincide con la observada en las células K25 (Figura 12). Ambos tratamientos no muestran diferencias al compararlos entre ellos a este tiempo ($p = 0.01$), por lo que la privación de suero podría estar produciendo el aumento en ERO en las células K5. Además, este aumento no se observa en las células K5+S (Figura 12) en donde la tinción a DHE no aumenta hasta las 8 h, sugiriendo que la privación de suero provoca la producción de ERO de las células con K5. Por otro lado, las

células con K5 mueren con características apoptóticas, mientras que las K25 no, por lo que la producción de ERO en general no se puede asociar con las características apoptóticas. Aunque se sabe que el uso de antioxidantes puede evitar la aparición de características apoptóticas en las NGC tratadas con K5 [12], probablemente los niveles o la fuente de las ERO determine si éstas participan o no en la morfología apoptótica. Finalmente, Las células tratadas con STS muestran un aumento en tinción de DHE a las 8 h, al igual que las células K5 (Figura 12). Este aumento en ERO coincide con la fragmentación internucleosomal del DNA en ambos casos, por lo que faltaría evaluar si este aumento en ERO está involucrado en la morfología apoptótica.

II. **Papel de la Apoptosis y la Autofagia en cada uno de los Tratamientos de Muerte**

a. **Viabilidad de NGC Utilizando K5 y STS como Inductores de Muerte así como Inhibidores de Muerte Apoptótica y Autofágica**

El tratamiento de NGC con privación de suero y potasio (K5) así como la estaurosporina (STS) indujeron muerte con características apoptóticas y autofágicas. Por lo tanto, en esta parte del trabajo se utilizarán solamente la privación de suero y potasio (K5) y estaurosporina (STS) con sus respectivos controles: privación de suero (K25) y células crecidas en alto potasio (C).

Para evaluar la participación de la apoptosis y de la autofagia en la muerte observada, se evaluó el papel de inhibidores de muerte autofágica y apoptótica sobre la viabilidad de las NGC. Para bloquear la autofagia, se utilizó 3 metil adenina, (3MA, 10 mM), un inhibidor de la PI3K. Este inhibidor puede disminuir la muerte de NGC sometidas a privación de potasio y suero [68]. También se sabe que los inhibidores de caspasas pueden reducir la muerte de NGC sometidas a privación de potasio y suero y a STS [66]. Se utilizó QVD-OPH (QVD, 20 μ M), un inhibidor general de caspasas, para evaluar su efecto sobre la viabilidad en los tratamientos utilizados. Como se observó anteriormente que existe estrés oxidativo en la mayoría de los tratamientos utilizados y éste puede interferir en la medición de viabilidad por MTT, la viabilidad se evaluó en lo sucesivo por tinción de FDA y de IP.

Ninguno de los inhibidores utilizados tuvo efecto sobre la viabilidad de las células control hasta las 48 h (Figura 13 A y B). En cuanto a las células tratadas con K5, tal como ya se había descrito anteriormente [66, 68], se observa una disminución en la muerte tanto con inhibidores de apoptosis como con inhibidores de autofagia (Figura 13 C y E). A las 24h, el QVD-OPH sólo protege parcialmente de la muerte, mientras que la 3MA evita por completo la muerte inducida por privación de suero y potasio. Por otro lado, a las 48h, mientras que la 3MA sigue disminuyendo la muerte de manera significativa, el QVD-OPH deja de proteger. Se observa un efecto sinérgico de los dos inhibidores, sugiriendo que bajo este estímulo, la apoptosis y la

autofagia se activan de manera independiente, siendo esta última la más importante para la progresión de la muerte en este tratamiento.

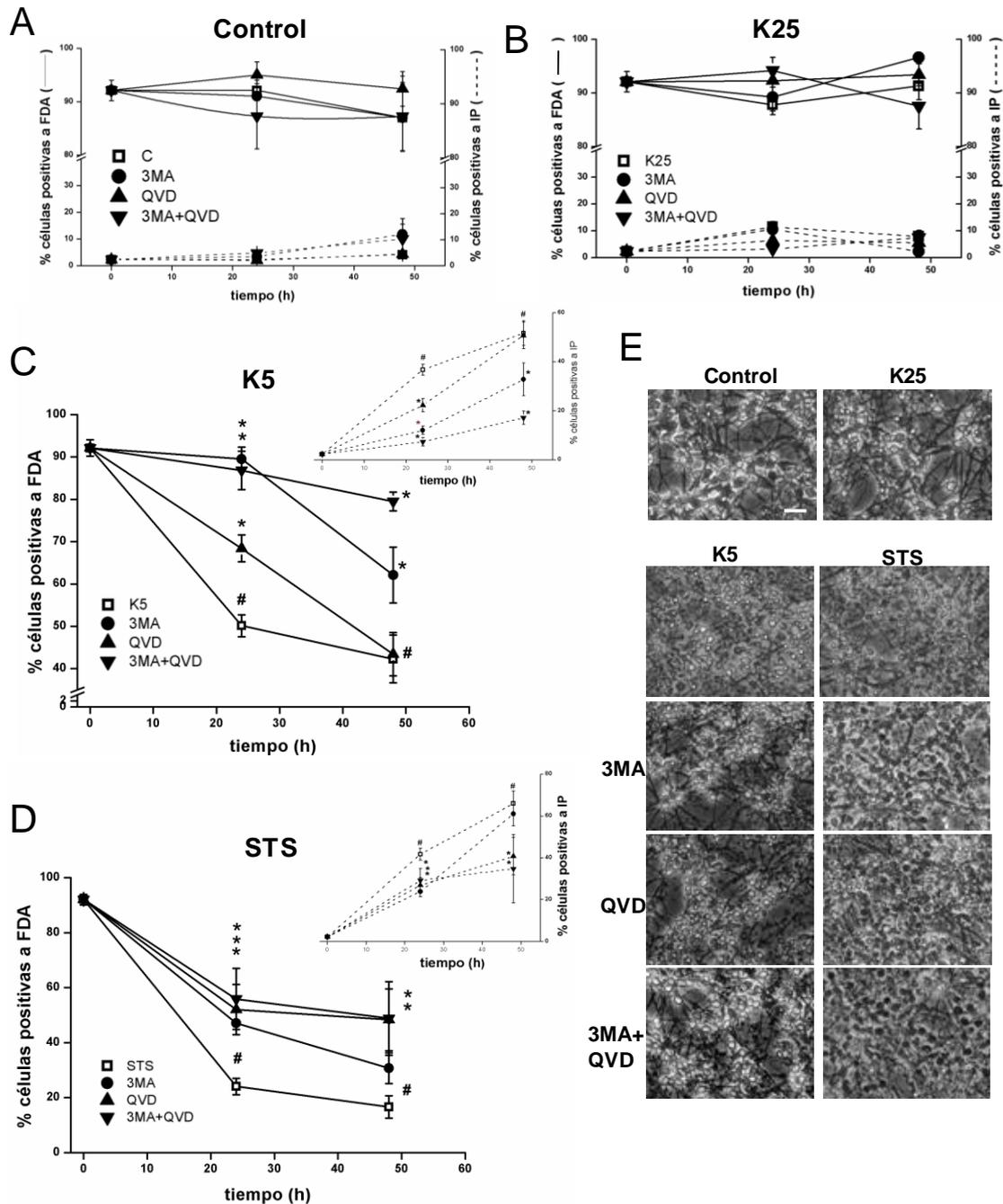


Figura 13. Efecto de la inhibición de la apoptosis/ autofagia en la viabilidad de NGC tratadas con K5 y STS. Las NGC se crecieron por 7 DIV en un medio con alto potasio y suero (C) y se trataron por el tiempo indicado con un medio con alto potasio sin suero (K25), con bajo potasio sin suero (K5) o con STS 0.5 μ M en presencia o ausencia del inhibidor de autofagia 3-metil adenina (3MA, 10 mM) o con el inhibidor de caspasas Q-VD-OPH (QVD 20 μ M). En A-D la viabilidad se evaluó con tinción de FDA (líneas continuas) y tinción de IP (líneas punteadas). Las gráficas muestran media \pm error estándar de 5 experimentos independientes, # representa diferencias de t=0, * representa diferencia de su control

respectivo sin inhibidor, $p \leq 0.05$. En E, las células se trataron como se describió anteriormente y se observaron en un microscopio de contraste de fases. La barra representa 20 μm .

En las células tratadas con STS (Figura 13 D y E), como se esperaba, el inhibidor de caspasas disminuye la muerte observada a las 24 y a las 48h, sin embargo esta protección sólo llega a valores cercanos al 50%. El inhibidor de la autofagia (3MA) disminuye la muerte observada a las 24h por el tratamiento con STS, sin embargo esta protección es únicamente un retraso en la muerte porque las células tratadas con STS y 3MA llegan al nivel de sus controles tratados sólo con STS a las 48h. Por lo tanto, las características autofágicas observadas en el tratamiento con STS sí parecen estar contribuyendo a la muerte aunque sólo de manera parcial. Finalmente, aunque ya se ha descrito la participación de la muerte autofágica por STS en otras células [121], no se había descrito en NGC.

b. Efecto de los Inhibidores de la Apoptosis y de la Autofagia sobre las Características Apoptóticas

Para ver si el tratamiento de los inhibidores de apoptosis/ autofagia tenían algún efecto sobre las características apoptóticas estudiadas, se evaluó tanto condensación nuclear como fragmentación internucleosomal con cada uno de los inhibidores de muerte.

En las células control (C) y en las células privadas de suero (K25), ni el 3MA ni el QVD-OPH tuvieron efecto sobre el DNA ni sobre la condensación nuclear (Figura 14 A, D). El 3MA inhibió la fragmentación internucleosomal en las células tratadas con K5 a las 12 pero no a las 24 h (Figura 14 B), así como la condensación nuclear a las 48 h (Figura 14 C, E). Por lo tanto, el retraso en la muerte celular observado con el tratamiento con 3MA y K5 es sólo un retraso en la apoptosis ya que el DNA se sigue fragmentando y la muerte observada a las 48 h en esta condición parece ser apoptótica. Es interesante notar que aunque no se observa muerte celular a las 24 h con K5 y 3MA (Figura 13 C), el DNA se fragmenta casi igual que en las células tratadas con K5, que muestran un 50% de reducción en la viabilidad en este tiempo (Figura 15 B). Por otro lado, no se observa fragmentación internucleosomal en las células tratadas con K5 y el inhibidor de caspasas hasta las 48 h, sugiriendo que las caspasas están siendo inhibidas hasta este tiempo. Bajo estas condiciones, la condensación nuclear disminuyó aunque no se observó protección de la muerte a ese tiempo (Figura 13 C). Finalmente, el tratamiento con ambos inhibidores de muerte inhibió por completo la condensación nuclear y la fragmentación internucleosomal del DNA a las 48 h, sugiriendo la activación de dos vías independientes por la privación de potasio.

Del mismo modo, la 3MA inhibió la fragmentación internucleosomal en las células tratadas con STS a las 12 pero no a las 24 h (Figura 14 B). Además, redujo la condensación nuclear a las 24 pero no a las 48 h (Figura 14 F). Tanto la inhibición de caspasas como el tratamiento con ambos inhibidores inhibieron completamente la fragmentación del DNA y la condensación nuclear a las 48 h (Figura 14 B, F).

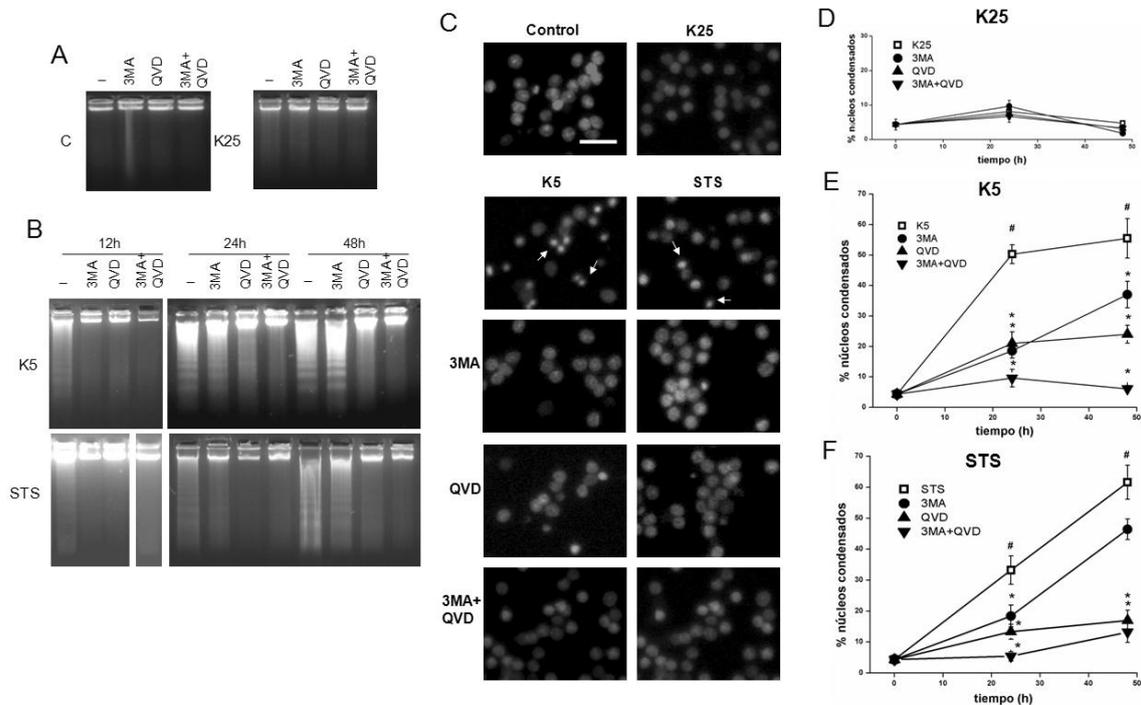


Figura 14. Papel de la inhibición de la apoptosis y la autofagia en la muerte de NGC inducida por bajo potasio y STS. La fragmentación internucleosomal del DNA (A,B) y la condensación nuclear (C-F) se evaluaron como características apoptóticas en NGC tratadas con K5 o STS con o sin inhibidores de la apoptosis o autofagia. Las CGN se crecieron por 7 DIV en un medio con alto potasio y suero (C) y se trataron con el inhibidor de la autofagia 3-metil adenina (3MA) o el inhibidor de caspasas Q-VD-OPH (QVD) (A) o se trataron por los tiempos indicados con un medio con alto potasio sin suero (K25) (A, D), con un medio con bajo potasio sin suero (K5) (B, E) o con STS 0.5 μ M (B, F) en presencia o ausencia de 3MA o QVD. Las fotos en A y en B muestran imágenes representativas de 3 experimentos independientes. En C, las células se trataron como ya se ha indicado y los núcleos se tiñeron usando H \ddot{o} chst. Las flechas muestran núcleos condensados, la barra representa 20 μ m. Las gráficas en D-F muestran media \pm error estándar de 5 experimentos independientes, # representa diferencias de t=0, * representa diferencias de cada control sin inhibidor de muerte, $p \leq 0.05$.

c. Efecto de los Inhibidores de la Apoptosis y de la Autofagia sobre las Características Autofágicas

Para evaluar si la muerte celular programada no apoptótica que ocurre en las NGC tratadas con K5 y STS junto con los inhibidores de muerte tenía características autofágicas, evaluamos la presencia de autofagosomas por microscopía electrónica y el procesamiento de LC-3 por Western Blot.

El corte de LC-3 (microtubule associated protein light chain-3) se ha utilizado como parámetro indicativo de un proceso autofágico [121, 123]. El LC-3 endógeno se detecta como dos bandas por SDS-PAGE. Una representa LC3-I, que es citosólica, y la otra LC3-II, que se conjuga con fosfatidiletanolamina (PE) y se encuentra en las membranas de aislamiento y en los autofagosomas, y en menor cantidad en los auto lisosomas. El LC-3 recién sintetizado (pro LC-3), no se detecta en condiciones normales porque se procesa por Atg4 inmediatamente después de su síntesis. Aunque el peso molecular de LC3-II es mayor que el de LC3-I debido a la adición de PE, LC3-II migra más rápidamente que LC3-I en un gel de SDS-PAGE probablemente por el aumento en hidrofobicidad y LC3-I se detecta en un gel desnaturizante en un peso de alrededor de 16 kD y LC3-II alrededor de 14 kD [123].

En las células tratadas con K5 y STS, la formación de autofagosomas (Figura 15 A, asteriscos) y el procesamiento de LC-3 (Figura 15 B, C) aumentaron, y la 3MA disminuyó ambos parámetros autofágicos. De manera interesante, se encontraron numerosas estructuras membranales con forma de copa en las células tratadas con 3MA (Figura 15 A, flechas), probablemente reflejando la acumulación de estructuras pre-autofagosomales. Por otro lado, el tratamiento con QVD-OPH indujo la formación de autofagosomas (Figura 15 A, asteriscos), así como el aumento en LC3-II (Figura 15 B, C), el cual se inhibió por el tratamiento con 3MA. Por lo tanto, cuando se inhiben las caspasas en las NGC tratadas con K5 y STS, la muerte celular programada muestra características autofágicas.

Finalmente, para evaluar si la apoptosis y la autofagia ocurrían al mismo tiempo en una misma célula o si se trataba de dos poblaciones de NGC que mueren por distintos tipos de MCP, hicimos una inmunocitoquímica con un anticuerpo dirigido contra LC-3 junto con tinción de TUNEL.

Encontramos que prácticamente todas las células tratadas con K5 y las tratadas con STS mostraron un aumento en el patrón punteado de LC-3 después de 8 h de tratamiento (Figura 16

A). Algunas de estas células también se tiñeron con TUNEL y mostraron condensación así como fragmentación nuclear (Figura 16 A, flechas).

A

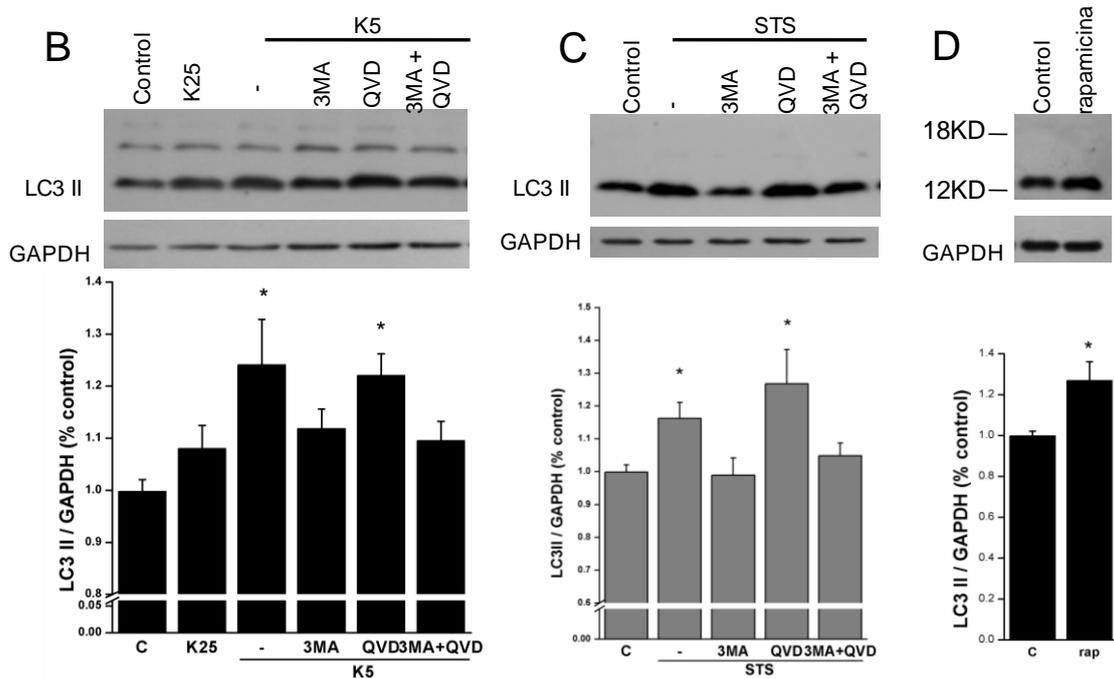
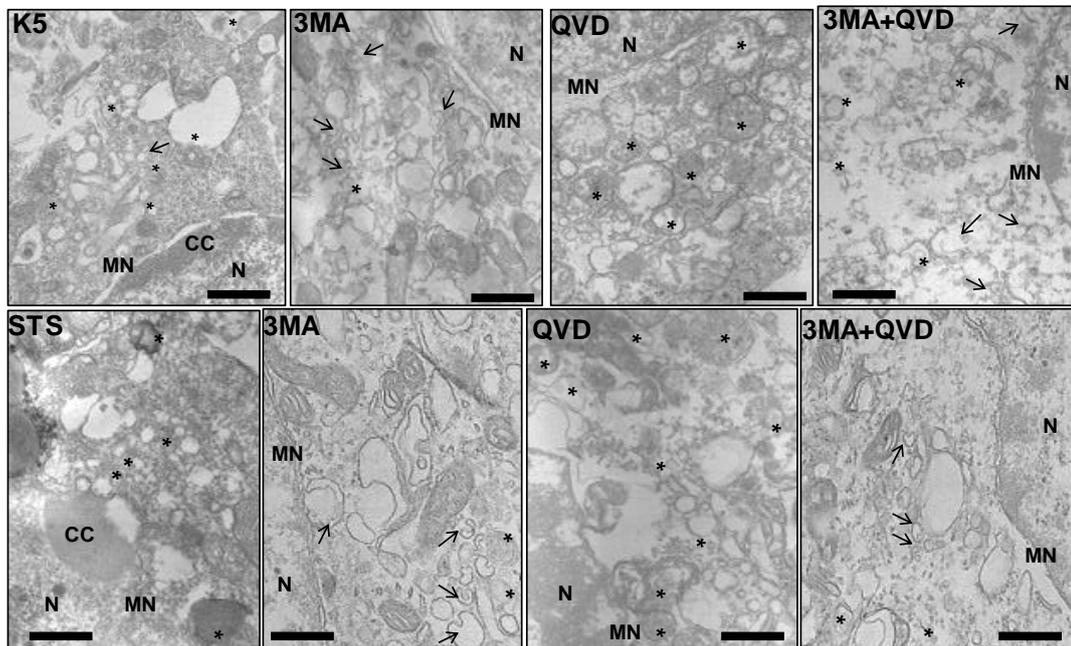


Figura 15. Efecto de la inhibición de la apoptosis y la autofagia en las características autofágicas de NGC tratadas con K5 y STS. Se utilizó la microscopía electrónica (A) y el corte de LC-3 (B, C, D) para evaluar autofagia en NGC inducida por bajo potasio (K5) o STS. Las NGC se crecieron por 7 DIV en un medio con alto potasio y suero (Control), se trataron con por los tiempos indicados con un medio con alto potasio sin suero (K25), con un medio con bajo potasio sin suero (K5) o con STS 0.5 μ M en presencia o ausencia de 3MA o QVD-OPH (QVD). Las células se trataron por 12 h (A) o por el tiempo indicado (B, C). Los asteriscos en A muestran autofagosomas y las flechas muestran fagóforos. N, núcleo; MN,

membrana nuclear; CC, cromatina condensada. En D, las células se trataron con rapamicina 200 nM junto con pepstatina A 20 µg/ml por 24 h para inducir autofagia. La barra en A representa 500 nm. Las gráficas en B, C y D muestran la media de unidades de densidad óptica ± error estándar de 5 experimentos independientes, * representa diferencia de las células control, $p \leq 0.05$.

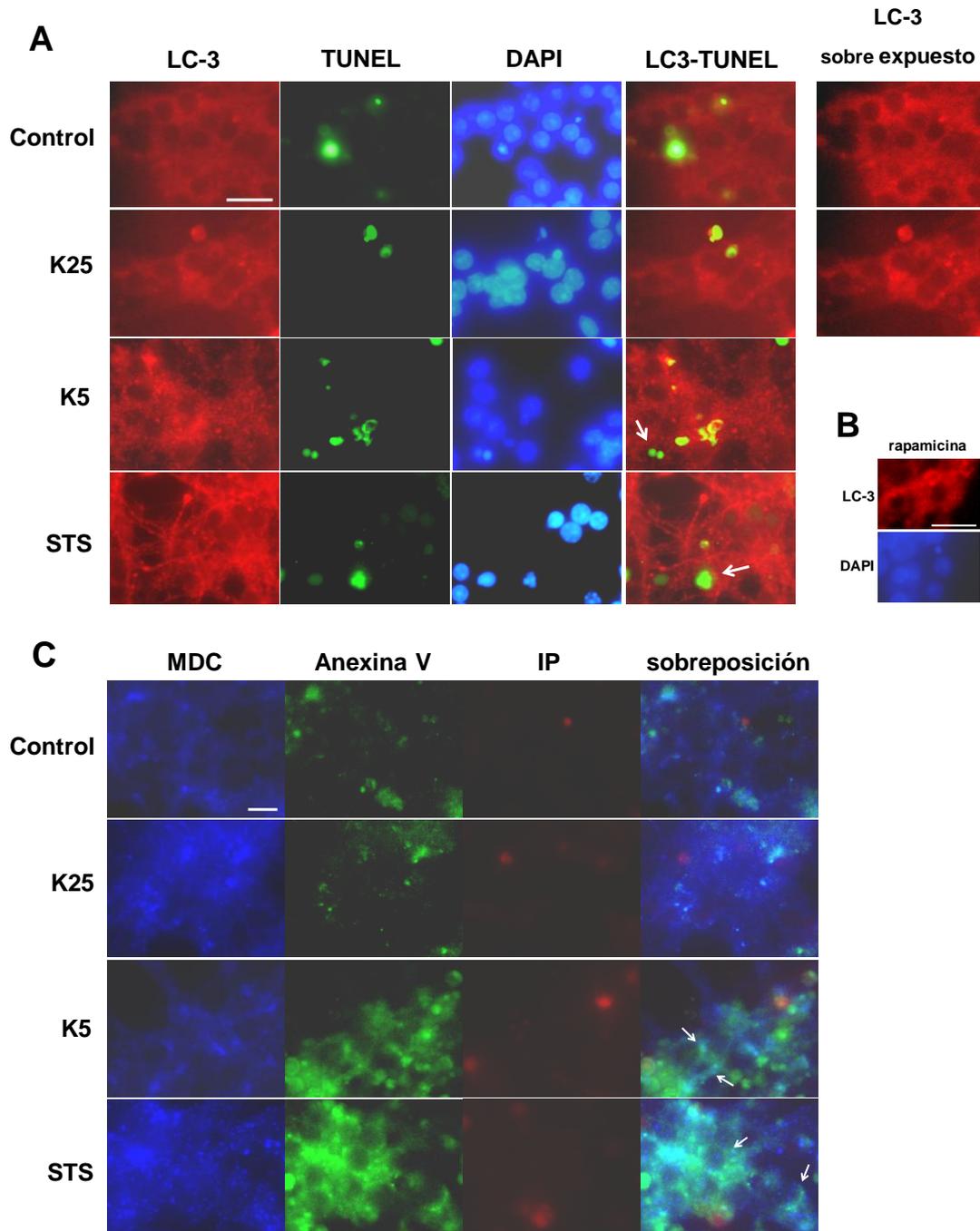


Figura 16. La apoptosis y la autofagia ocurren simultáneamente en la muerte de NGC inducida por bajo potasio y STS. La figura muestra imágenes de microscopía de fluorescencia de NGC control, de células tratadas con alto potasio sin suero (K25), con un medio con bajo potasio sin suero (K5) o con STS 0.5 µM. En A, la autofagia se evaluó por inmunocitoquímica de LC-3 y la apoptosis se evaluó por tinción de TUNEL junto con fragmentación nuclear. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. El tratamiento con

rapamicina se utilizó como control positivo (B). En C, la autofagia se evaluó por tinción con monodansilcadaverina (MDC) y la apoptosis por tinción con Anexina V. Los núcleos de las células necróticas se tiñeron con yoduro de propidio (IP). Las flechas señalan la co-localización de características apoptóticas y autofágicas. Las barras representan 10 μ m.

Para confirmar estos resultados, utilizamos la tinción con MDC junto con Anexina V. La anexina V se une a la fosfatidilserina que se expone en la membrana plasmática de las células apoptóticas como señal de fagocitosis. También podría unir fosfatidilserina en la cara interna de la membrana plasmática de las células con membrana plasmática dañada (necróticas), por lo que se utiliza junto con yoduro de propidio (IP). Las flechas en la figura 16 B muestran células con características tanto apoptóticas como autofágicas.

Estos resultados sugieren que ambos procesos, apoptosis y autofagia, pueden ocurrir en la misma célula y que la autofagia debe ser un evento más temprano.

III. Participación del Estrés Oxidativo en el Tipo de Muerte de NGC

Cuando las NGC son tratadas con K5 o STS, se observa un aumento en ERO que se ha involucrado con la muerte. Trabajos previos han atribuido esta producción de ERO a la familia de enzimas de la NADPH oxidasa [124]. En este trabajo encontramos que cuando las NGC se tratan con K5 o STS junto con el inhibidor de la autofagia 3MA, no se observa producción de ERO medida por oxidación de dihidroetidio (Figura 17 A).

Como ya se ha reportado previamente [124], encontramos un aumento en la producción de células positivas a dihidroetidio (DHE) después de 4.5 h en células tratadas con K5 y después de 5 h en células tratadas con STS. Este aumento en ERO se inhibió por el tratamiento con 3MA o con un antioxidante (MnTMPyP, MN) (Figura 17). Este efecto no se debe a propiedades antioxidantes de la 3MA ya que ésta no pudo evitar el aumento en células positivas a DHE provocado por el tratamiento con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o con xantina / xantina oxidasa (Xa/XO), un sistema generador de superóxido. Además, la 3MA así como la wortmanina, otro inhibidor de la PI3K, evitaron el aumento en actividad de la NADPH oxidasa observado a las 4 h en NGC tratadas con K5 y a 5 h en células tratadas con STS (resultados no mostrados). Esta observación puede deberse al hecho de que algunas subunidades de la NADPH oxidasa tienen sitios de unión a lípidos que ayudan al anclaje de las subunidades regulatorias de la enzima a la membrana. Cuando las células se activan, p40^{phox} se fosforila y se transloca junto con el complejo p47^{phox}-p67^{phox} a la membrana, donde su dominio PX se une a fosfatidilinositol-3 fosfato, el producto de la PI3K tipo III [125].

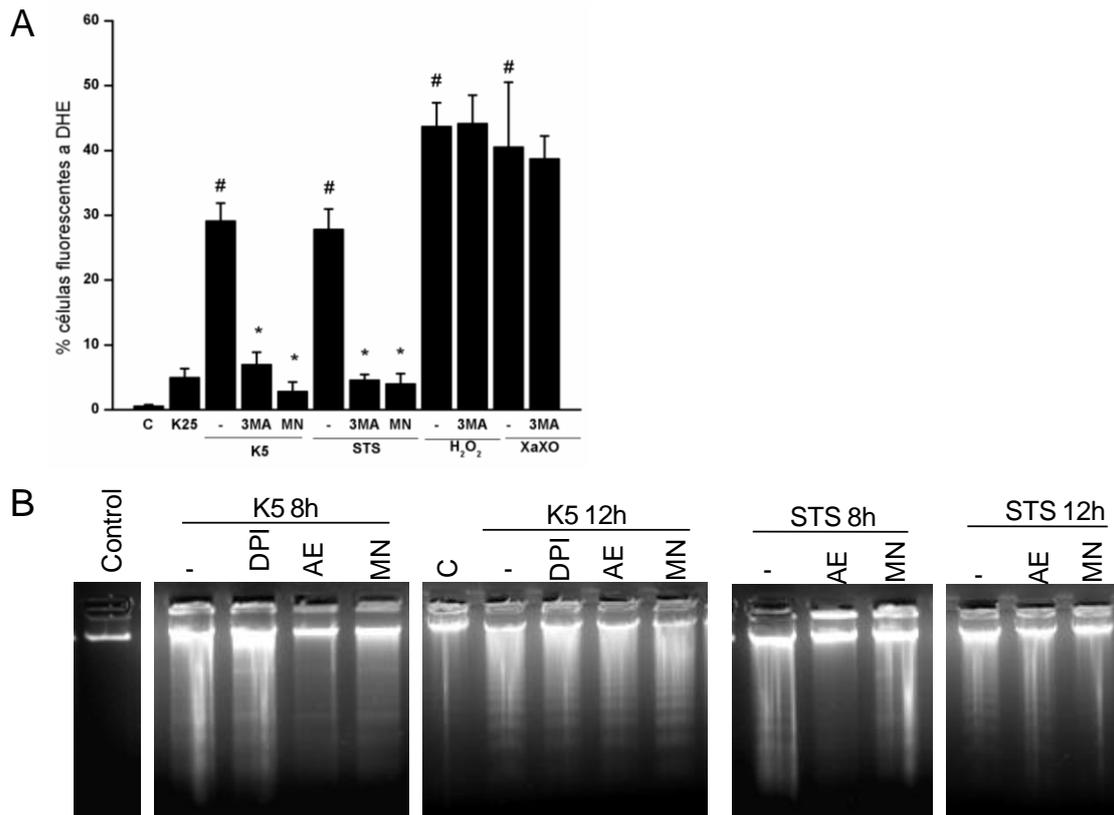


Figura 17. Papel de las ERO y de la NADPH oxidasa en las características apoptóticas de la muerte de NGC inducida por K5 y STS. A) La producción de ERO se evaluó por tinción de dihidroetidio. El MnTMPyP (MN) se utilizó como antioxidante. La gráfica muestra la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes, # representa diferencias con respecto al control, * representa diferencia de su control respectivo sin 3MA o antioxidante, $p \leq 0.05$. B) La fragmentación internucleosomal del DNA se utilizó para evaluar el efecto de la inhibición de la NADPH oxidasa sobre la apoptosis. Se utilizaron DPI y AEBSF (AE) para inhibir a la enzima.

Se evaluó también el papel de las ERO y de la NADPH oxidasa en la aparición de las características apoptóticas (Figura 17) y autofágicas (Figura 18) de NGC tratadas con K5 y STS. Utilizamos dos inhibidores de la NADPH oxidasa, difeniliodonio (DPI), y 4-(2-aminoetil) bencensulfonil fluoruro (AEBSF, AE) así como un antioxidante (MN). Aunque el AEBSF (AE) y el MN disminuyeron la fragmentación internucleosomal que se observa a las 8 h en las células tratadas con K5 y STS (Figura 17 B), esto refleja sólo un retraso en la aparición de las características apoptóticas ya que a las 12 h no se observa diferencia. El DPI puede inducir un aumento en la muerte cuando se utiliza junto con STS, por lo que no se utilizó en este tratamiento [124].

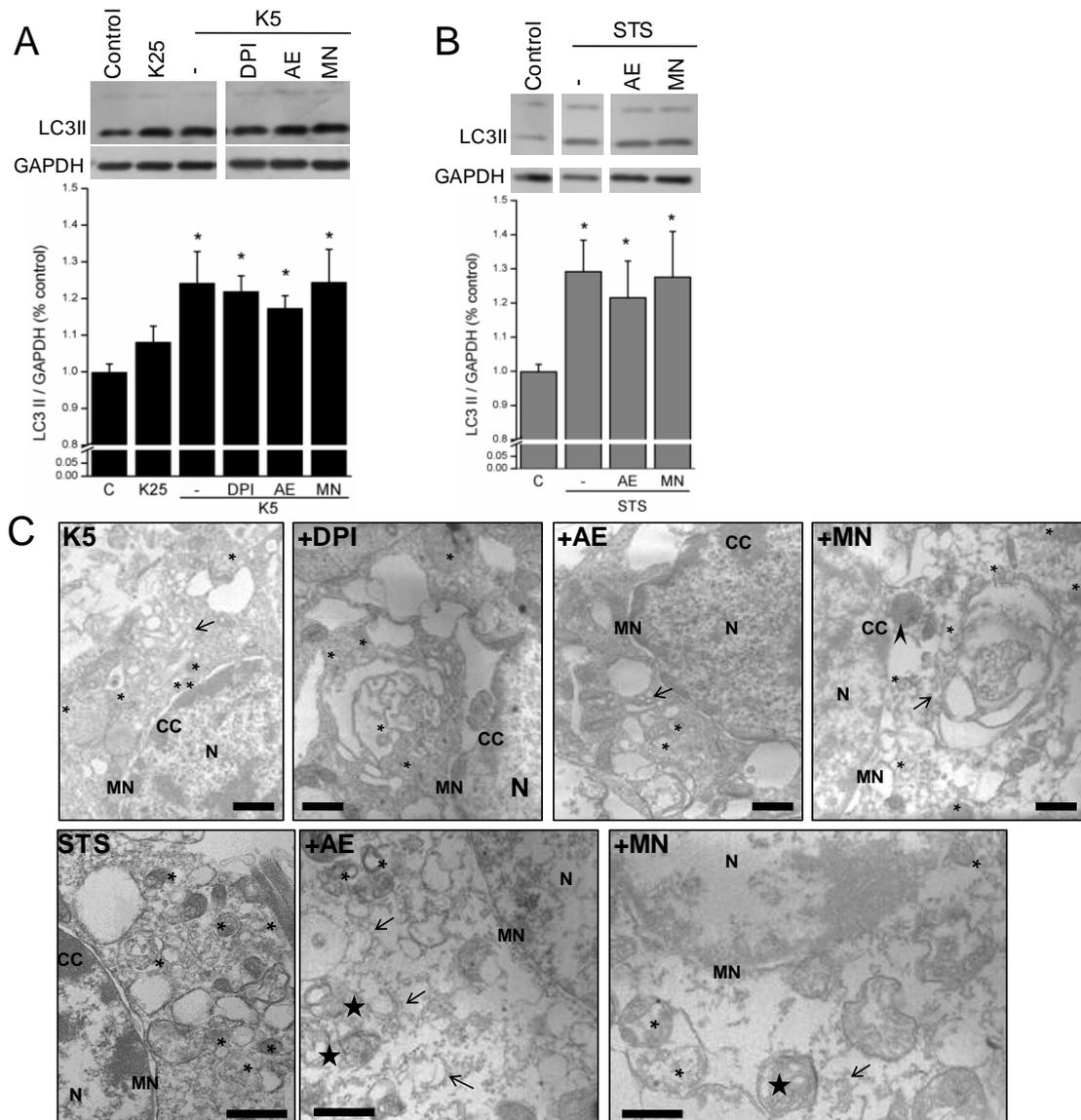


Figura 18. Papel de las ERO y de la NADPH oxidasa en las características autofágicas de la muerte de NGC inducida por K5 y STS. Para evaluar las características autofágicas se utilizó microscopía electrónica junto con Western Blots anti LC3 para evaluar procesamiento del mismo. Las células se trataron con K5 o STS junto con un antioxidante (MN) o con inhibidores de la NADPH oxidasa (DPI, AE). Las gráficas en A y B muestran la media \pm error estándar de 6 experimentos independientes, * representa diferencia con respecto al control, $p \leq 0.05$. Los asteriscos en C muestran estructuras consideradas como autofagosomas, las flechas muestran estructuras pre autofagosomales y las estrellas muestran vacuolas con acumulación de membranas. N, núcleo, MN, membrana nuclear, CC, cromatina condensada. La barra en C representa 500 nm.

Del mismo modo, ni los inhibidores de la NADPH oxidasa (AE, DPI) ni el antioxidante utilizado (MN) aumentaron el procesamiento de LC 3 (Figura 18 A y B) en las NGC tratadas con K5 o STS. Además, se observaron autofagosomas y fagóforos en las NGC tratadas con K5

o STS en presencia de MN, DPI o AEBSF en la microscopía electrónica (Figura 18 C). También se observó la acumulación de estructuras membranales en CGN tratadas con STS y AEBSF o MN (Figura 18 C).

IV. Papel del Metabolismo Energético en el Tipo de Muerte de NGC Tratadas con K5 o STS

Con el fin de evaluar el papel del metabolismo energético en el tipo de muerte de NGC se utilizaron inhibidores energéticos para disminuir el ATP en células sometidas a los siguientes tratamientos: privación de suero y potasio (K5), estaurosporina (STS) y sus respectivos controles: privación de suero (K25) y células crecidas en alto potasio (C). Se utilizó oligomicina, un inhibidor de la ATP sintasa mitocondrial, y yodoacetato de sodio, un agente alquilante de grupos sulfhidrilo que se sabe puede inhibir a la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa glicolítica. Como se muestra en la figura 19, en todas las condiciones estudiadas, a las 4 h la oligomicina en sus dos concentraciones y el yodoacetato pudieron disminuir el ATP intracelular. A las 12 horas, los inhibidores energéticos siguen disminuyendo el ATP a excepción de las células K5 donde sólo el yodoacetato puede disminuirlo. Probablemente la glicólisis sea un proceso más importante que la fosforilación oxidativa en el mantenimiento de los niveles de ATP en estas células. Por el contrario, en el aumento en ATP que se observa a las 4 horas parecen estar involucradas tanto la glicólisis como la fosforilación oxidativa de acuerdo con lo reportado anteriormente (Atlante *et al*, 2005).

Para evaluar el papel de la disminución de ATP causada por los inhibidores energéticos en la viabilidad de las NGC, ésta se evaluó por tinción de FDA/IP (Figura 19).

Las células control, al igual que las tratadas con K25, muestran un comportamiento similar al tratarse con los inhibidores energéticos, aunque las células K25 parecen ser más resistentes a la disminución en la viabilidad causada por oligomicina 1.5 ng/ml a las 12 h. En ambos casos, la muerte causada por el yodoacetato muestra un aumento en la tinción a IP a las 12 h.

En las células K5 no se modifica la disminución en la viabilidad con oligomicina en sus dos concentraciones hasta las 24 h. Por lo tanto, el aumento de ATP que se ve a las 4 h con este tratamiento no tiene ningún efecto en la viabilidad de estas células. Falta evaluar si tiene algún efecto sobre las características de la muerte. En este mismo tratamiento, el yodoacetato produce una drástica disminución en la viabilidad a las 12 h que también ocurre con un aumento en la tinción con IP.

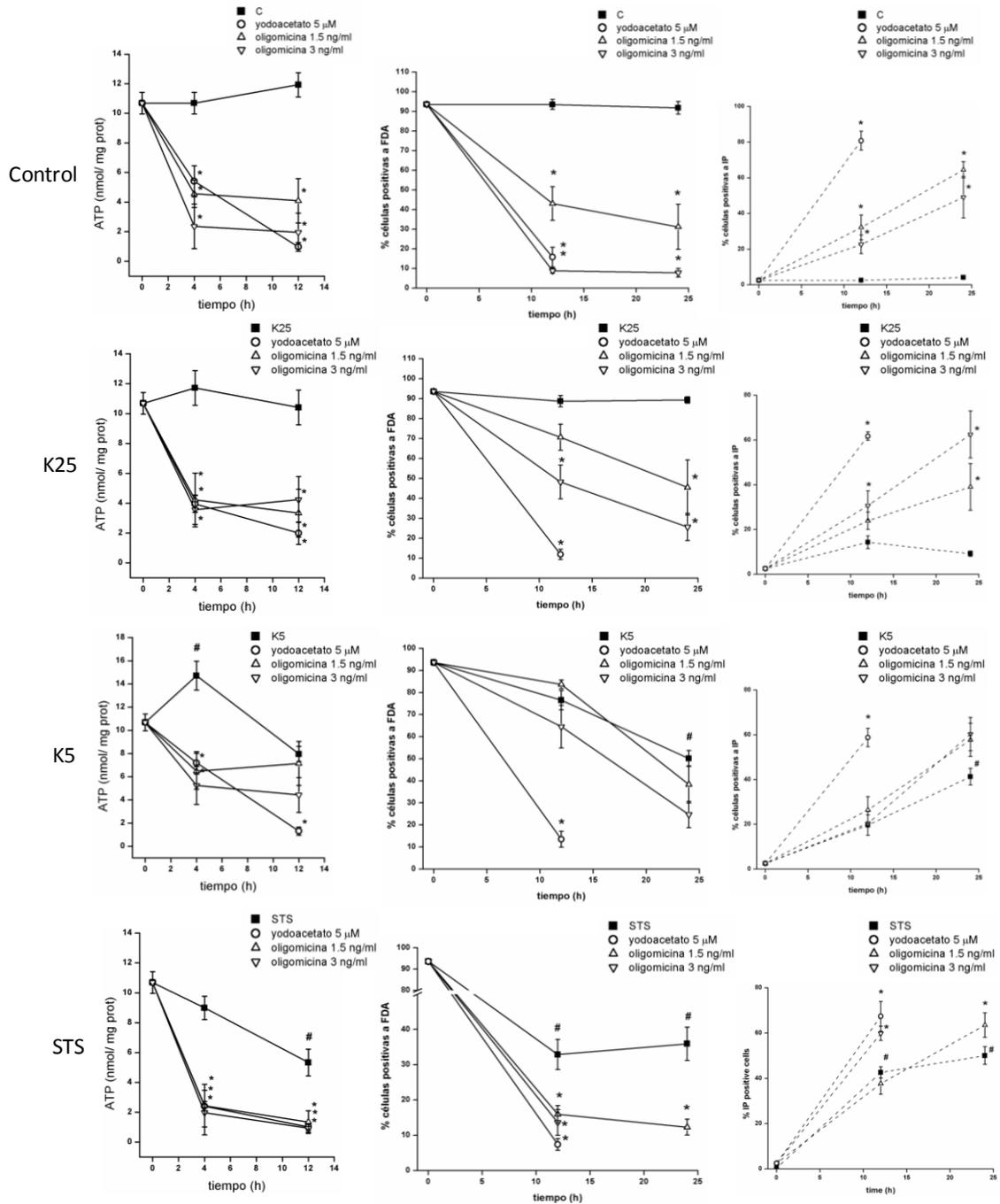


Figura 19. Concentración de ATP y viabilidad de NGC sometidas a distintos tratamientos inductores de muerte junto con inhibidores energéticos. Las células control, privadas de suero (K25), privadas de suero y potasio (K5), y tratadas con estaurosporina (STS) se trataron con oligomycin o yodoacetato para disminuir la concentración intracelular de ATP. La viabilidad se evaluó con tinción de FDA/IP. Las gráficas de ATP muestran datos de 4 experimentos independientes y en las gráficas de FDA/IP se muestran datos de 6 experimentos independientes. # diferencia significativa con K25, tiempo 0 h, $p = 0.05$; * diferencia significativa con su respectivo control sin inhibidores energéticos, $p = 0.05$.

Finalmente, las células tratadas con STS muestran una marcada reducción en la viabilidad con todos los inhibidores energéticos desde las 12 h y esta muerte parece ser de tipo necrótico por el aumento en IP que se observa a este tiempo.

Para determinar si las características apoptóticas que presentan las NGC se ven afectadas por la concentración intracelular de ATP, se evaluó la fragmentación internucleosomal del DNA, los resultados se muestran en la figura 20.

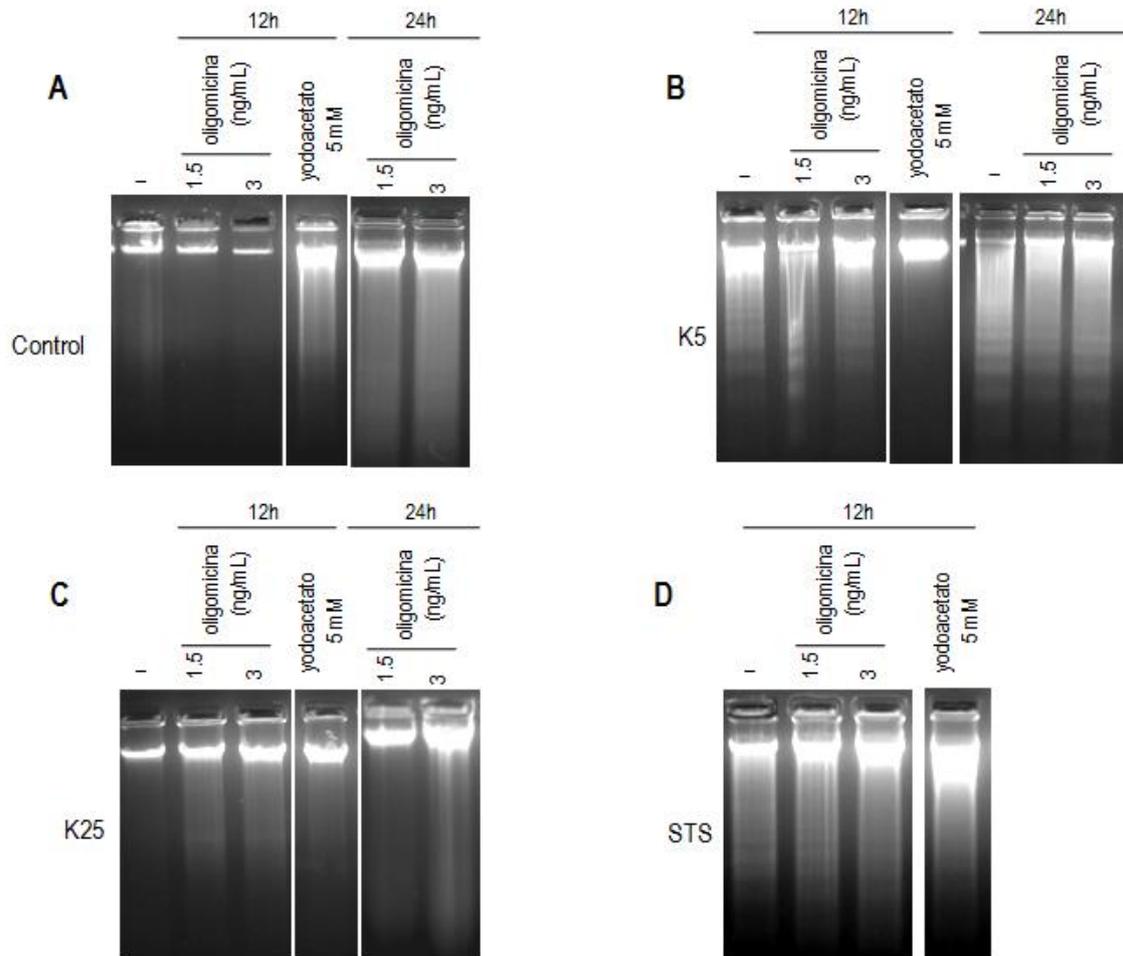


Figura 20. Efecto de la inhibición energética sobre la fragmentación internucleosomal de NGC con distintos tratamientos inductores de muerte. Las células control, privadas de suero (K25), privadas de suero y potasio (K5), y tratadas con estaurosporina (STS) se trataron con oligomycin o yodoacetato para disminuir la concentración intracelular de ATP y se evaluó la fragmentación internucleosomal como característica apoptótica.

En las células control, el yodoacetato a las 12 h induce una marcada degradación del DNA. La oligomycin en sus dos concentraciones sólo indujo degradación del DNA así como una ligera fragmentación internucleosomal a las 24 h. Es interesante observar que aunque la oligomycin 3

ng/ml y el yodoacetato a las 12 h disminuyen el ATP y la viabilidad a los mismos niveles (Figura 19 A), el DNA sólo se degrada con el tratamiento con yodoacetato a este tiempo.

En las células privadas de suero (K25), a pesar de que a las 12 h tanto la oligomicina 3 ng/mL como el yodoacetato han disminuido la viabilidad y la concentración intracelular de ATP de manera significativa, no se observa fragmentación internucleosomal del ADN ni degradación del mismo (Figura 20 C), por lo que la inhibición energética en estas células parece no producir muerte apoptótica ni necrótica.

En las células privadas de suero y potasio (K5) aunque la oligomicina en ambas concentraciones inhibe el aumento en ATP a las 4 h, se sigue observando la fragmentación internucleosomal característica de la apoptosis (Figura 20 B), por lo que este aumento en ATP no es necesario para que ocurra la apoptosis. En el caso del yodoacetato 5 uM, a pesar de que provoca una disminución drástica en la viabilidad que nos podría sugerir un tipo de muerte necrótica, no produce degradación del DNA a las 12h (Figura 20 B), falta por evaluar las características autofágicas en todos los tratamientos.

Las células tratadas con STS, disminuyen su viabilidad desde las 12h tanto con oligomicina como con yodoacetato (Figura 19), y a pesar de disminuir también sus niveles de ATP drásticamente, la muerte parece seguir siendo apoptótica, ya que se sigue observando la fragmentación del ADN (Figura 20). Por otro lado, el yodoacetato, a pesar de disminuir los niveles de ATP y la viabilidad a niveles semejantes a la oligomicina, produce también una degradación del DNA, sugiriendo un componente necrótico.

Resulta interesante cómo el yodoacetato a pesar de provocar degradación del DNA en las células control y las tratadas con STS, no tiene el mismo efecto en las células K25 y K5.

DISCUSIÓN

En este trabajo encontramos evidencias de características apoptóticas y autofágicas en NGC en proceso de muerte inducida por tratamiento con K5 o STS. Ambos procesos parecen estar involucrados en la disminución en la viabilidad y nuestros resultados sugieren que ocurren en la misma célula. Proponemos que las especies reactivas de oxígeno y la autofagia funcionan como dos mecanismos independientes que promueven la apoptosis en este modelo.

La muerte celular programada que ocurre en el sistema nervioso central ha sido considerada de tipo apoptótico [61]. Sin embargo, bajo ciertas condiciones fisiológicas y patológicas, la muerte neuronal también puede mostrar características no apoptóticas [3]. Se ha demostrado que en ciertas áreas del sistema nervioso, las neuronas deficientes en caspasas mueren por un mecanismo no apoptótico [4]. Aunque en células en proceso de muerte se pueden observar niveles de autofagia excesivos [3, 126, 127], aún no es claro si el proceso autofágico está involucrado en la muerte celular o si se trata de una respuesta de sobrevivencia activada después de una señal inductora de muerte. Sin embargo, se encuentran características autofágicas en células que convencionalmente se ha considerado que mueren apoptóticamente [68, 70] así como en células donde se inhibe la apoptosis [57].

Aunque se ha considerado que los tratamientos utilizados en este estudio inducen muerte de tipo apoptótico [65, 66], encontramos una contribución importante de la muerte celular autofágica en NGC tratadas con K5 o STS. Nuestros resultados sugieren dos vías de muerte independientes. De manera interesante, mientras que la muerte celular autofágica parece ser más importante en la muerte por K5, la apoptosis tiene un papel más significativo en la muerte de NGC inducida por STS.

Se considera que la autofagia precede a la apoptosis en NGC tratadas con K5, y se ha propuesto que la activación de las catepsinas sea necesaria para la activación de las caspasas [68]. En nuestro trabajo encontramos que la inhibición de la autofagia indujo un retraso en la aparición de las características apoptóticas inducidas por K5 y STS. Por otro lado, la inhibición de caspasas ocasionó un retraso en la muerte celular inducida por ambos tratamientos, sin fragmentación internucleosomal del DNA (Figura 14), aumento en la formación de autofagosomas y aumento en el procesamiento de LC3 (Figura 15), sugiriendo que la muerte que ocurre es de tipo autofágica.

De manera interesante, en el caso de K5, cuando las NGC se tratan con inhibidores de autofagia y de apoptosis, el DNA no se fragmenta, los núcleos no se condensan o fragmentan (Figura 14),

el procesamiento de LC3 no aumenta (Figura 15) y no se observa disminución en la viabilidad, aún a las 48 h (Figura 13). Ambos inhibidores poseen un efecto aditivo en la muerte celular inducida por K5, sugiriendo de nuevo, que se activan dos mecanismos independientes con este tratamiento. Además, mientras la 3MA evita la muerte por K5 a las 24 h, la inhibición de caspasas sólo aumenta la viabilidad celular en un 20% (Figura 13). Por lo tanto, la autofagia parece contribuir más que la apoptosis a la disminución en la viabilidad observada en este tratamiento.

Cuando la muerte de NGC es inducida por STS, tanto el inhibidor de la apoptosis como el de la autofagia disminuyen la muerte celular, esta disminución en la viabilidad es sólo transitoria y las NGC mueren a las 48 h (Figura 13). Posiblemente la inhibición de proteínas cinasas por STS tenga un efecto sumamente tóxico en el que las células no pueden recuperarse aún cuando ambas vías de muerte están inhibidas.

Además, en el caso de STS, la autofagia parece estar promoviendo la apoptosis y no tener un papel fundamental en la disminución de la viabilidad, dado que el 3MA solo disminuye la muerte transitoriamente y no se observa efecto sinérgico con ambos inhibidores (Figura 13 D). También, aunque ambos inhibidores de muerte muestran una protección similar de la muerte a las 24 h, sólo el QVD-OPH protege de la muerte a las 48 h (Figura 13 D). Por lo tanto, la apoptosis parece ser la vía principal de muerte en las NGC tratadas con STS.

Todos estos resultados sugieren que las NGC mueren tanto por mecanismos de MCP tipo I y II cuando se tratan con K5 o STS y que son capaces de sufrir un mecanismo alterno de muerte cuando el otro se encuentra inhibido. Es importante mencionar que se encontraron características apoptóticas y autofágicas en la misma célula (Figura 16). Esta evidencia nos sugiere que la activación de ambas vías ocurre en la misma célula más que en una sub población de NGC.

Por otro lado, la familia de la NADPH oxidasa se ha involucrado en la muerte apoptótica de NGC tratadas con K5 o STS. Los inhibidores de la NADPH oxidasa pueden disminuir la muerte de estas células así como la actividad de caspasas a las 8 h con ambos tratamientos [124]. En este trabajo, los inhibidores de la NADPH oxidasa, DPI y AEBSF así como un antioxidante, retrasaron la aparición de los fragmentos internucleosomales del DNA a las 8 h en ambos tratamientos. Sin embargo, esta disminución es sólo transitoria y las células finalmente mueren de manera apoptótica (Figura 17). Además, no se observaron diferencias en el procesamiento de LC3 a los tiempos estudiados (Figura 18 A). Por lo tanto, la producción de ERO por la NADPH oxidasa y el proceso autofágico deben estar promoviendo la apoptosis de manera independiente.

Finalmente, el inhibidor de la PI3K, la 3 metil adenina (3MA), disminuyó la muerte celular y la producción de ROS en los tratamientos de K5 y STS (Figura 13 y Figura 17 A). Parte de este efecto podría deberse al hecho de que durante la activación de la NADPH oxidasa, una de sus subunidades requiere la unión de fosfatidil inositol-3 fosfato, el producto de la PI3K tipo III [125]. La protección tan evidente que se observa después del tratamiento con 3MA, especialmente con K5, podría deberse a la inhibición simultánea de la producción de ERO por la NADPH oxidasa y la autofagia, los dos procesos promotores de apoptosis.

Al evaluar el posible papel de los niveles intracelulares de ATP en el tipo de muerte de NGC tratadas con K5 y STS, no encontramos una asociación entre la aparición de las características apoptóticas y la concentración intracelular de ATP. El tratamiento con oligomicina pudo inhibir el aumento en ATP que se observa en las células tratadas con K5 a las 4h así como los niveles de ATP en las células tratadas con STS. Sin embargo, no fue capaz de inhibir la fragmentación internucleosomal del ADN. Aunque se sabe que la apoptosis tiene pasos dependientes de ATP (Figura 3) y se propone que necesita mitocondrias relativamente intactas [10] y ciertos niveles de ATP para ocurrir [98], las NGC tratadas con K5 o STS y con niveles disminuidos de ATP siguen muriendo de manera apoptótica. Falta evaluar si el componente autofágico que se observa en estos tratamientos se ve afectado por el tratamiento con oligomicina.

Por otro lado, cuando los niveles de ATP disminuyen por el tratamiento con yodoacetato, se observa degradación del DNA en las células control y las tratadas con STS, sugiriendo un tipo de muerte necrótico. Además, el yodoacetato puede inhibir la recuperación de los niveles de ATP en las células tratadas con K5 y disminuir su viabilidad y no así la oligomicina (Figura 19). Por lo tanto, las NGC parecen ser particularmente susceptibles a la inhibición glicolítica. Queda por evaluar si las NGC con los tratamientos inductores de muerte y yodoacetato muestran alteraciones en las características autofágicas.

En conclusión, encontramos que la autofagia promueve apoptosis en las NGC tratadas con K5 o STS; sin embargo, parece que la autofagia no es necesaria para que ocurra la apoptosis porque las células con inhibición de la autofagia, siguen muriendo de manera apoptótica. Por lo tanto, proponemos un mecanismo en el que las NGC tratadas con K5 y STS activan ambos mecanismos de muerte, y cuando uno se inhibe, las células son capaces de morir por la vía alterna. Encontramos que tanto la autofagia como los ROS promueven apoptosis. La formación de los cuerpos apoptóticos podría acelerar la remoción de las células en proceso de muerte por heterofagocitosis y por lo tanto, parece ser que la apoptosis es la vía preferida de MCP bajo estas condiciones. La autofagia podría entonces estar funcionando como un mecanismo para

reducir la masa celular previo al proceso apoptótico, como ya se ha sugerido con anterioridad [128], y como un mecanismo de respaldo en caso de que la apoptosis se vea inhibida.

RESUMEN DE RESULTADOS**I. Caracterización del Tipo de Muerte de NGC Sometidas a Distintos Tratamientos Inductores de Muerte**

Se observaron características apoptóticas (condensación nuclear, fragmentación internucleosomal y condensación de la cromatina) en las NGC tratadas con K5, K5+S y STS (Tabla 1).

Se observaron características autofágicas (aumento en tinción con MDC, formación de autofagosomas) en las NGC tratadas con K5, K5+S y STS (Tabla 1).

Se observaron características necróticas (degradación del DNA, liberación de LDH, tinción con IP) en las células tratadas con glutamato, junto con características apoptóticas (ligera fragmentación internucleosomal del DNA, condensación nuclear, Tabla 1).

Las células tratadas con K5 y K5+S mostraron un aumento en los niveles de ATP a las 4 h de tratamiento y no así las tratadas con STS que sufren una disminución gradual en estos niveles.

Se observa un aumento en la concentración de ERO en las células tratadas con glutamato, K5, K25 y STS.

Tipo de Muerte	Característica	Tratamiento					
		K25	K5	K5+S	STS	L	Glu
Apoptosis	Condensación Nuclear		X	X	X		X
	Fragmentación Internucleosomal		X	X	X		X
Autofagia	Tinción con MDC	X	X	X	X	X	X
	Autofagosomas por microscopía electrónica		X		X	X	
Necrosis	Liberación de LDH				X		X
	Degradación del DNA						X

Tabla 1. Resumen de las características de cada uno de los tipos de muerte estudiados. Privación de suero (K25), privación de suero y potasio (K5), privación de potasio (K5+S), estaurosporina (STS), glutamato (Glu), control de glutamato (Locke, L).

II. Papel de la Apoptosis y la Autofagia en cada uno de los Tratamientos de Muerte

El tratamiento con 3MA no tuvo ningún efecto en la viabilidad de las células control ni en las K25, por lo que la autofagia parece no tener un papel importante en la sobrevivencia de estas células.

Tanto el 3MA como el inhibidor de caspasas disminuyeron la muerte de las células tratadas con K5. Sin embargo, la muerte en estas células parece ser principalmente de tipo autofágico, ya que la mayor protección se observa con el tratamiento con 3MA.

Tanto el 3MA como el QVD-OPH disminuyeron la muerte de las NGC tratadas con STS. Sin embargo, la muerte en estas células parece ser principalmente de tipo apoptótico, ya que la mayor protección se observa con el tratamiento con QVD-OPH.

Las NGC tratadas con K5 o STS y 3MA para inhibir la autofagia, mueren con características apoptóticas (fragmentación internucleosomal y condensación nuclear).

Las NGC tratadas con K5 o STS y QVD-OPH para inhibir la apoptosis, mueren con características autofágicas (aumento en el número de autofagosomas, aumento en el procesamiento de LC3).

Se observaron características apoptóticas (fragmentación nuclear, TUNEL, tinción con Anexina V) así como autofágicas (patrón punteado de LC3, aumento en la tinción con MDC) en la misma célula con ambos tratamientos (K5 y STS), por lo que ambos mecanismos parecen estar activándose en la misma célula y no en una subpoblación de NGC.

III. Participación del Estrés Oxidativo en el Tipo de Muerte de NGC

La 3MA puede disminuir las ERO que se observan en las NGC tratadas con K5 y STS probablemente por medio de la inhibición de la NADPH oxidasa.

Los inhibidores de la NADPH oxidasa solo retrasan la aparición de los fragmentos internucleosomales del DNA y no tienen ningún efecto sobre las características autofágicas, por lo que la autofagia y los ROS parecen estar contribuyendo de manera independiente a la aparición de características apoptóticas. La protección tan marcada que se observa con la 3MA tanto en los tratamientos de K5 como de STS puede deberse a la inhibición simultánea de la NADPH oxidasa y la autofagia.

IV. Papel del Metabolismo Energético en el Tipo de Muerte de NGC Tratadas con K5 o STS

El tratamiento con oligomicina o yodoacetato pudo disminuir los niveles de ATP en casi todos los tratamientos estudiados. Las NGC tratadas con K5 y oligomicina son capaces de restablecer sus niveles de ATP, probablemente por acción de la glicólisis.

En general, los inhibidores energéticos causan una disminución en la viabilidad de las NGC con los tratamientos estudiados. Las células control y las tratadas con STS son particularmente susceptibles a esta inhibición energética. Por otro lado, las células K5 tratadas con oligomicina no muestran cambios en la viabilidad con respecto a sus controles.

La aparición de fragmentos internucleosomales del DNA puede ocurrir a pesar de una disminución en los niveles de ATP en las NGC tratadas con K5 o STS.

Falta por evaluar las características autofágicas en las NGC con los distintos tratamientos y los inhibidores energéticos.

CONCLUSIONES

Encontramos que la autofagia puede promover un proceso apoptótico en las NGC tratadas con K5 o STS. Sin embargo, la autofagia no es necesaria para que ocurra la apoptosis porque las células con inhibición de la autofagia, siguen muriendo de manera apoptótica. Se propone un mecanismo en el que las NGC tratadas con K5 y STS activan ambos mecanismos de muerte, y cuando uno se inhibe, las células son capaces de morir por la vía alterna. Además, encontramos características tanto de apoptosis como de autofagia en la misma célula sugiriendo que ambos procesos ocurren en la misma población celular y no en dos poblaciones diferentes. Encontramos que tanto la autofagia como los ROS promueven apoptosis. La formación de los cuerpos apoptóticos podría acelerar la remoción de las células en proceso de muerte por heterofagocitosis y por lo tanto, parece ser que la apoptosis es la vía preferida de MCP bajo estas condiciones. La autofagia podría funcionar como un mecanismo para reducir la masa celular previo al proceso apoptótico y como un mecanismo de respaldo en el caso de que la apoptosis se vea inhibida.

No se encontró asociación entre la aparición de las características apoptóticas y la concentración de ATP, ya que la disminución de los mismos por inhibidores energéticos no pudo evitar la aparición de la fragmentación internucleosomal en las células tratadas con K5 o STS. Falta por evaluar el papel de la concentración de ATP sobre las características autofágicas.

PERSPECTIVAS

El papel de la apoptosis en las neuronas durante el desarrollo y en las enfermedades neurodegenerativas está ampliamente documentado. En este trabajo, encontramos un papel importante de la autofagia en la muerte de neuronas granulares de cerebelo en cultivo sometidas a dos tratamientos diferentes, privación de potasio y STS. Sería interesante determinar si la autofagia está involucrada en la muerte de todas las neuronas que mueren durante la morfogénesis del sistema nervioso o si esto depende del sitio del sistema nervioso, o del estado de diferenciación neuronal. También es importante establecer si el proceso autofágico contribuye a la muerte de las neuronas en las enfermedades neurodegenerativas y en procesos de hipoxia o isquemia, o si se trata de una respuesta de sobrevivencia. La inhibición o estimulación de la autofagia podría utilizarse junto con la inhibición de la apoptosis para disminuir la muerte neuronal en estos padecimientos.

REFERENCIAS

1. Jacobson, M.D., M. Weil, and M.C. Raff, *Programmed cell death in animal development*. Cell, 1997. **88**(3): p. 347-54.
2. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer, 1972. **26**(4): p. 239-57.
3. Clarke, P.G., *Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms*. Anat Embryol (Berl), 1990. **181**(3): p. 195-213.
4. Oppenheim, R.W., R.A. Flavell, S. Vinsant, D. Prevette, C.Y. Kuan, and P. Rakic, *Programmed cell death of developing mammalian neurons after genetic deletion of caspases*. J Neurosci, 2001. **21**(13): p. 4752-60.
5. Leist, M., B. Single, A.F. Castoldi, S. Kuhnle, and P. Nicotera, *Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis*. J Exp Med, 1997. **185**(8): p. 1481-6.
6. Chernyak, B.V., O.Y. Pletjushkina, D.S. Izyumov, K.G. Lyamzaev, and A.V. Avetisyan, *Bioenergetics and death*. Biochemistry (Mosc), 2005. **70**(2): p. 240-5.
7. Adams, J.M. and S. Cory, *Apoptosomes: engines for caspase activation*. Curr Opin Cell Biol, 2002. **14**(6): p. 715-20.
8. Wullschlegel, S., R. Loewith, and M.N. Hall, *TOR signaling in growth and metabolism*. Cell, 2006. **124**(3): p. 471-84.
9. Atlante, A., S. Giannattasio, A. Bobba, S. Gagliardi, V. Petragallo, P. Calissano, E. Marra, and S. Passarella, *An increase in the ATP levels occurs in cerebellar granule cells en route to apoptosis in which ATP derives from both oxidative phosphorylation and anaerobic glycolysis*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1708**(1): p. 50-62.
10. Ankarcrona, M., J.M. Dypbukt, E. Bonfoco, B. Zhivotovsky, S. Orrenius, S.A. Lipton, and P. Nicotera, *Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function*. Neuron, 1995. **15**(4): p. 961-73.
11. Shen, H.M. and S. Pervaiz, *TNF receptor superfamily-induced cell death: redox-dependent execution*. FASEB J, 2006. **20**(10): p. 1589-98.
12. Valencia, A. and J. Moran, *Role of oxidative stress in the apoptotic cell death of cultured cerebellar granule neurons*. J Neurosci Res, 2001. **64**(3): p. 284-97.
13. Covarrubias, L., D. Hernandez-Garcia, D. Schnabel, E. Salas-Vidal, and S. Castro-Obregon, *Function of reactive oxygen species during animal development: passive or active?* Dev Biol, 2008. **320**(1): p. 1-11.
14. Valencia, A. and J. Moran, *Reactive oxygen species induce different cell death mechanisms in cultured neurons*. Free Radic Biol Med, 2004. **36**(9): p. 1112-25.
15. Saito, Y., K. Nishio, Y. Ogawa, J. Kimata, T. Kinumi, Y. Yoshida, N. Noguchi, and E. Niki, *Turning point in apoptosis/necrosis induced by hydrogen peroxide*. Free Radic Res, 2006. **40**(6): p. 619-30.
16. Scherz-Shouval, R. and Z. Elazar, *ROS, mitochondria and the regulation of autophagy*. Trends Cell Biol, 2007. **17**(9): p. 422-7.
17. Reed, J.C., K.S. Doctor, and A. Godzik, *The domains of apoptosis: a genomics perspective*. Sci STKE, 2004. **2004**(239): p. re9.
18. Broker, L.E., F.A. Kruyt, and G. Giaccone, *Cell death independent of caspases: a review*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(9): p. 3155-62.
19. Boatright, K.M., M. Renatus, F.L. Scott, S. Sperandio, H. Shin, I.M. Pedersen, J.E. Ricci, W.A. Edris, D.P. Sutherland, D.R. Green, and G.S. Salvesen, *A unified model for apical caspase activation*. Mol Cell, 2003. **11**(2): p. 529-41.
20. Tinel, A. and J. Tschopp, *The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress*. Science, 2004. **304**(5672): p. 843-6.
21. Nakagawa, T., H. Zhu, N. Morishima, E. Li, J. Xu, B.A. Yankner, and J. Yuan, *Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta*. Nature, 2000. **403**(6765): p. 98-103.
22. Ogura, Y., F.S. Sutterwala, and R.A. Flavell, *The inflammasome: first line of the immune response to cell stress*. Cell, 2006. **126**(4): p. 659-62.
23. Adams, J.M., *Ways of dying: multiple pathways to apoptosis*. Genes Dev, 2003. **17**(20): p. 2481-95.

24. Thornberry, N.A. and Y. Lazebnik, *Caspases: enemies within*. Science, 1998. **281**(5381): p. 1312-6.
25. Harris, M.H. and C.B. Thompson, *The role of the Bcl-2 family in the regulation of outer mitochondrial membrane permeability*. Cell Death Differ, 2000. **7**(12): p. 1182-91.
26. Salvesen, G.S. and C.S. Duckett, *IAP proteins: blocking the road to death's door*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(6): p. 401-10.
27. Bremer, E., G. van Dam, B.J. Kroesen, L. de Leij, and W. Helfrich, *Targeted induction of apoptosis for cancer therapy: current progress and prospects*. Trends Mol Med, 2006. **12**(8): p. 382-93.
28. Hengartner, M.O., *The biochemistry of apoptosis*. Nature, 2000. **407**(6805): p. 770-6.
29. Cuervo, A.M., *Autophagy: in sickness and in health*. Trends Cell Biol, 2004. **14**(2): p. 70-7.
30. Levine, B. and D.J. Klionsky, *Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy*. Dev Cell, 2004. **6**(4): p. 463-77.
31. Kelekar, A., *Autophagy*. Ann N Y Acad Sci, 2005. **1066**: p. 259-71.
32. Yu, L., A. Alva, H. Su, P. Dutt, E. Freundt, S. Welsh, E.H. Baehrecke, and M.J. Lenardo, *Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8*. Science, 2004. **304**(5676): p. 1500-2.
33. Shimizu, S., T. Kanaseki, N. Mizushima, T. Mizuta, S. Arakawa-Kobayashi, C.B. Thompson, and Y. Tsujimoto, *Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes*. Nat Cell Biol, 2004. **6**(12): p. 1221-8.
34. Baehrecke, E.H., *Autophagy: dual roles in life and death?* Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(6): p. 505-10.
35. Suzuki, K., T. Kirisako, Y. Kamada, N. Mizushima, T. Noda, and Y. Ohsumi, *The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation*. EMBO J, 2001. **20**(21): p. 5971-81.
36. Mizushima, N., T. Yoshimori, and Y. Ohsumi, *Role of the Apg12 conjugation system in mammalian autophagy*. Int J Biochem Cell Biol, 2003. **35**(5): p. 553-61.
37. Klionsky, D.J., H. Abeliovich, P. Agostinis, D.K. Agrawal, G. Aliev, D.S. Askew, M. Baba, E.H. Baehrecke, B.A. Bahr, A. Ballabio, B.A. Bamber, D.C. Bassham, E. Bergamini, X. Bi, M. Biard-Piechaczyk, J.S. Blum, D.E. Bredesen, J.L. Brodsky, J.H. Brumell, U.T. Brunk, W. Bursch, N. Camougrand, E. Cebollero, F. Cecconi, Y. Chen, L.S. Chin, A. Choi, C.T. Chu, J. Chung, P.G. Clarke, R.S. Clark, S.G. Clarke, C. Clave, J.L. Cleveland, P. Codogno, M.I. Colombo, A. Coto-Montes, J.M. Cregg, A.M. Cuervo, J. Debnath, F. Demarchi, P.B. Dennis, P.A. Dennis, V. Deretic, R.J. Devenish, F. Di Sano, J.F. Dice, M. Difiglia, S. Dinesh-Kumar, C.W. Distelhorst, M. Djavaheri-Mergny, F.C. Dorsey, W. Droge, M. Dron, W.A. Dunn, Jr., M. Duszenko, N.T. Eissa, Z. Elazar, A. Esclatine, E.L. Eskelinen, L. Fesus, K.D. Finley, J.M. Fuentes, J. Fueyo, K. Fujisaki, B. Galliot, F.B. Gao, D.A. Gewirtz, S.B. Gibson, A. Gohla, A.L. Goldberg, R. Gonzalez, C. Gonzalez-Estevez, S. Gorski, R.A. Gottlieb, D. Haussinger, Y.W. He, K. Heidenreich, J.A. Hill, M. Hoyer-Hansen, X. Hu, W.P. Huang, A. Iwasaki, M. Jaattela, W.T. Jackson, X. Jiang, S. Jin, T. Johansen, J.U. Jung, M. Kadowaki, C. Kang, A. Kelekar, D.H. Kessel, J.A. Kiel, H.P. Kim, A. Kimchi, T.J. Kinsella, K. Kiselyov, K. Kitamoto, E. Knecht, M. Komatsu, E. Kominami, S. Kondo, A.L. Kovacs, G. Kroemer, C.Y. Kuan, R. Kumar, M. Kundu, J. Landry, M. Laporte, W. Le, H.Y. Lei, M.J. Lenardo, B. Levine, A. Lieberman, K.L. Lim, F.C. Lin, W. Liou, L.F. Liu, G. Lopez-Berestein, C. Lopez-Otin, B. Lu, K.F. Macleod, W. Malorni, W. Martinet, K. Matsuoka, J. Mautner, A.J. Meijer, A. Melendez, P. Michels, G. Miotto, W.P. Mistiaen, N. Mizushima, B. Mograbi, I. Monastyrska, M.N. Moore, P.I. Moreira, Y. Moriyasu, T. Motyl, C. Munz, L.O. Murphy, N.I. Naqvi, T.P. Neufeld, I. Nishino, R.A. Nixon, T. Noda, B. Nurnberg, M. Ogawa, N.L. Oleinick, L.J. Olsen, B. Ozpolat, S. Paglin, G.E. Palmer, I. Papassideri, M. Parkes, D.H. Perlmutter, G. Perry, M. Piacentini, R. Pinkas-Kramarski, M. Prescott, T. Proikas-Cezanne, N. Raben, A. Rami, F. Reggiori, B. Rohrer, D.C. Rubinsztein, K.M. Ryan, J. Sadoshima, H. Sakagami, Y. Sakai, M. Sandri, C. Sasakawa, M. Sass, C. Schneider, P.O. Seglen, O. Seleverstov, J. Settleman, J.J. Shacka, I.M. Shapiro, A. Sibirny, E.C. Silva-Zacarin, H.U. Simon, C. Simone, A. Simonsen, M.A. Smith, K. Spanel-Borowski, V. Srinivas, M. Steeves, H. Stenmark, P.E. Stromhaug, C.S. Subauste, S. Sugimoto, D. Sulzer, T. Suzuki, M.S. Swanson, I. Tabas, F. Takeshita, N.J. Talbot, Z. Talloczy, K. Tanaka, I. Tanida, G.S. Taylor, J.P. Taylor, A. Terman, G. Tettamanti, C.B. Thompson, M. Thumm, A.M. Tolkovsky, S.A. Tooze, R. Truant, L.V. Tumanovska, Y. Uchiyama, T. Ueno, N.L. Uzcategui, I. van der Klei, E.C. Vaquero, T. Vellai, M.W. Vogel, H.G. Wang, P. Webster, J.W. Wiley, Z. Xi, G. Xiao, J. Yahalom, J.M. Yang, G. Yap, X.M. Yin, T. Yoshimori, L. Yu, Z. Yue, M. Yuzaki, O. Zabinryk, X. Zheng, X. Zhu and R.L. Deter,

- Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes.* Autophagy, 2008. **4**(2): p. 151-75.
38. Tanida, I., N. Minematsu-Ikeguchi, T. Ueno, and E. Kominami, *Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy.* Autophagy, 2005. **1**(2): p. 84-91.
 39. Scherz-Shouval, R., E. Shvets, E. Fass, H. Shorer, L. Gil, and Z. Elazar, *Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4.* EMBO J, 2007. **26**(7): p. 1749-60.
 40. Kihara, A., T. Noda, N. Ishihara, and Y. Ohsumi, *Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in Saccharomyces cerevisiae.* J Cell Biol, 2001. **152**(3): p. 519-30.
 41. Sarkar, S., B. Ravikumar, R.A. Floto, and D.C. Rubinsztein, *Rapamycin and mTOR-independent autophagy inducers ameliorate toxicity of polyglutamine-expanded huntingtin and related proteinopathies.* Cell Death Differ, 2009. **16**(1): p. 46-56.
 42. Bursch, W., A. Ellinger, H. Kienzl, L. Torok, S. Pandey, M. Sikorska, R. Walker, and R.S. Hermann, *Active cell death induced by the anti-estrogens tamoxifen and ICI 164 384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy.* Carcinogenesis, 1996. **17**(8): p. 1595-607.
 43. Stoka, V., B. Turk, S.L. Schendel, T.H. Kim, T. Cirman, S.J. Snipas, L.M. Ellerby, D. Bredesen, H. Freeze, M. Abrahamson, D. Bromme, S. Krajewski, J.C. Reed, X.M. Yin, V. Turk, and G.S. Salvesen, *Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route.* J Biol Chem, 2001. **276**(5): p. 3149-57.
 44. Levine, B., S. Sinha, and G. Kroemer, *Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy.* Autophagy, 2008. **4**(5): p. 600-6.
 45. Proskuryakov, S.Y., A.G. Konoplyannikov, and V.L. Gabai, *Necrosis: a specific form of programmed cell death?* Exp Cell Res, 2003. **283**(1): p. 1-16.
 46. Festjens, N., T. Vanden Berghe, and P. Vandenabeele, *Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response.* Biochim Biophys Acta, 2006. **1757**(9-10): p. 1371-87.
 47. Vercammen, D., G. Brouckaert, G. Denecker, M. Van de Craen, W. Declercq, W. Fiers, and P. Vandenabeele, *Dual signaling of the Fas receptor: initiation of both apoptotic and necrotic cell death pathways.* J Exp Med, 1998. **188**(5): p. 919-30.
 48. Fink, S.L. and B.T. Cookson, *Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells.* Infect Immun, 2005. **73**(4): p. 1907-16.
 49. Gabai, V.L., A.B. Meriin, J.A. Yaglom, J.Y. Wei, D.D. Mosser, and M.Y. Sherman, *Suppression of stress kinase JNK is involved in HSP72-mediated protection of myogenic cells from transient energy deprivation. HSP72 alleviates the stress-induced inhibition of JNK dephosphorylation.* J Biol Chem, 2000. **275**(48): p. 38088-94.
 50. Smith, S., *The world according to PARP.* Trends Biochem Sci, 2001. **26**(3): p. 174-9.
 51. Lankiewicz, S., C. Marc Luetjens, N. Truc Bui, A.J. Krohn, M. Poppe, G.M. Cole, T.C. Saido, and J.H. Prehn, *Activation of calpain I converts excitotoxic neuron death into a caspase-independent cell death.* J Biol Chem, 2000. **275**(22): p. 17064-71.
 52. Nath, R., K.J. Raser, K. McGinnis, R. Nadimpalli, D. Stafford, and K.K. Wang, *Effects of ICE-like protease and calpain inhibitors on neuronal apoptosis.* Neuroreport, 1996. **8**(1): p. 249-55.
 53. Leist, M. and M. Jaattela, *Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(8): p. 589-98.
 54. Sperandio, S., K. Poksay, I. de Belle, M.J. Lafuente, B. Liu, J. Nasir, and D.E. Bredesen, *Paraptosis: mediation by MAP kinases and inhibition by AIP-1/Alix.* Cell Death Differ, 2004. **11**(10): p. 1066-75.
 55. Castedo, M., J.L. Perfettini, T. Roumier, A. Valent, H. Raslova, K. Yakushijin, D. Horne, J. Feunteun, G. Lenoir, R. Medema, W. Vainchenker, and G. Kroemer, *Mitotic catastrophe constitutes a special case of apoptosis whose suppression entails aneuploidy.* Oncogene, 2004. **23**(25): p. 4362-70.
 56. Ianzini, F., A. Bertoldo, E.A. Kosmacek, S.L. Phillips, and M.A. Mackey, *Lack of p53 function promotes radiation-induced mitotic catastrophe in mouse embryonic fibroblast cells.* Cancer Cell Int, 2006. **6**: p. 11.

57. Lang-Rollin, I.C., H.J. Rideout, M. Noticewala, and L. Stefanis, *Mechanisms of caspase-independent neuronal death: energy depletion and free radical generation*. J Neurosci, 2003. **23**(35): p. 11015-25.
58. Buss, R.R., W. Sun, and R.W. Oppenheim, *Adaptive roles of programmed cell death during nervous system development*. Annu Rev Neurosci, 2006. **29**: p. 1-35.
59. Hamburger, V., *Trophic interactions in neurogenesis: a personal historical account*. Annu Rev Neurosci, 1980. **3**: p. 269-78.
60. Kuida, K., T.S. Zheng, S. Na, C. Kuan, D. Yang, H. Karasuyama, P. Rakic, and R.A. Flavell, *Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice*. Nature, 1996. **384**(6607): p. 368-72.
61. De Zio, D., L. Giunta, M. Corvaro, E. Ferraro, and F. Cecconi, *Expanding roles of programmed cell death in mammalian neurodevelopment*. Semin Cell Dev Biol, 2005. **16**(2): p. 281-94.
62. Los, M., S. Wesselborg, and K. Schulze-Osthoff, *The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice*. Immunity, 1999. **10**(6): p. 629-39.
63. Yoshida, Y., Y. Ogura, and K. Hasunuma, *Interaction of nucleoside diphosphate kinase and catalases for stress and light responses in Neurospora crassa*. FEBS Lett, 2006. **580**(13): p. 3282-6.
64. White, F.A., C.R. Keller-Peck, C.M. Knudson, S.J. Korsmeyer, and W.D. Snider, *Widespread elimination of naturally occurring neuronal death in Bax-deficient mice*. J Neurosci, 1998. **18**(4): p. 1428-39.
65. Moran, J., T. Itoh, U.R. Reddy, M. Chen, E.S. Alnemri, and D. Pleasure, *Caspase-3 expression by cerebellar granule neurons is regulated by calcium and cyclic AMP*. J Neurochem, 1999. **73**(2): p. 568-77.
66. Caballero-Benitez, A. and J. Moran, *Caspase activation pathways induced by staurosporine and low potassium: role of caspase-2*. J Neurosci Res, 2003. **71**(3): p. 383-96.
67. Villalba, M., J. Bockaert, and L. Journot, *Concomitant induction of apoptosis and necrosis in cerebellar granule cells following serum and potassium withdrawal*. Neuroreport, 1997. **8**(4): p. 981-5.
68. Canu, N., R. Tufi, A.L. Serafino, G. Amadoro, M.T. Ciotti, and P. Calissano, *Role of the autophagic-lysosomal system on low potassium-induced apoptosis in cultured cerebellar granule cells*. J Neurochem, 2005. **92**(5): p. 1228-42.
69. Kaasik, A., T. Rikk, A. Piirsoo, T. Zharkovsky, and A. Zharkovsky, *Up-regulation of lysosomal cathepsin L and autophagy during neuronal death induced by reduced serum and potassium*. Eur J Neurosci, 2005. **22**(5): p. 1023-31.
70. Xue, L., G.C. Fletcher, and A.M. Tolkovsky, *Autophagy is activated by apoptotic signalling in sympathetic neurons: an alternative mechanism of death execution*. Mol Cell Neurosci, 1999. **14**(3): p. 180-98.
71. Stefanis, L., *Caspase-dependent and -independent neuronal death: two distinct pathways to neuronal injury*. Neuroscientist, 2005. **11**(1): p. 50-62.
72. Felbor, U., B. Kessler, W. Mothes, H.H. Goebel, H.L. Ploegh, R.T. Bronson, and B.R. Olsen, *Neuronal loss and brain atrophy in mice lacking cathepsins B and L*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(12): p. 7883-8.
73. Hara, T., K. Nakamura, M. Matsui, A. Yamamoto, Y. Nakahara, R. Suzuki-Migishima, M. Yokoyama, K. Mishima, I. Saito, H. Okano, and N. Mizushima, *Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice*. Nature, 2006. **441**(7095): p. 885-9.
74. Komatsu, M., S. Waguri, T. Chiba, S. Murata, J. Iwata, I. Tanida, T. Ueno, M. Koike, Y. Uchiyama, E. Kominami, and K. Tanaka, *Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice*. Nature, 2006. **441**(7095): p. 880-4.
75. Hara, M.R. and S.H. Snyder, *Cell signaling and neuronal death*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2007. **47**: p. 117-41.
76. van Wijk, S.J. and G.J. Hageman, *Poly(ADP-ribose) polymerase-1 mediated caspase-independent cell death after ischemia/reperfusion*. Free Radic Biol Med, 2005. **39**(1): p. 81-90.
77. Ferrer, I., B. Friguls, E. Dalfo, C. Justicia, and A.M. Planas, *Caspase-dependent and caspase-independent signalling of apoptosis in the penumbra following middle cerebral artery occlusion in the adult rat*. Neuropathol Appl Neurobiol, 2003. **29**(5): p. 472-81.
78. Shall, S. and G. de Murcia, *Poly(ADP-ribose) polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model?* Mutat Res, 2000. **460**(1): p. 1-15.

79. Bursch, W., *The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death*. Cell Death Differ, 2001. **8**(6): p. 569-81.
80. Zhu, C., X. Wang, F. Xu, B.A. Bahr, M. Shibata, Y. Uchiyama, H. Hagberg, and K. Blomgren, *The influence of age on apoptotic and other mechanisms of cell death after cerebral hypoxia-ischemia*. Cell Death Differ, 2005. **12**(2): p. 162-76.
81. Burgoyne, R.D. and M.A. Cambray-Deakin, *The cellular neurobiology of neuronal development: the cerebellar granule cell*. Brain Res, 1988. **472**(1): p. 77-101.
82. Moran, J. and A.J. Patel, *Stimulation of the N-methyl-D-aspartate receptor promotes the biochemical differentiation of cerebellar granule neurons and not astrocytes*. Brain Res, 1989. **486**(1): p. 15-25.
83. Wiedmann, M., X. Wang, X. Tang, M. Han, M. Li, and Z. Mao, *PI3K/Akt-dependent regulation of the transcription factor myocyte enhancer factor-2 in insulin-like growth factor-1- and membrane depolarization-mediated survival of cerebellar granule neurons*. J Neurosci Res, 2005. **81**(2): p. 226-34.
84. D'Mello, S.R., C. Galli, T. Ciotti, and P. Calissano, *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 U S A, 1993. **90**(23): p. 10989-93.
85. Brewster, J.L., D.A. Linseman, R.J. Bouchard, F.A. Loucks, T.A. Precht, E.A. Esch, and K.A. Heidenreich, *Endoplasmic reticulum stress and trophic factor withdrawal activate distinct signaling cascades that induce glycogen synthase kinase-3 beta and a caspase-9-dependent apoptosis in cerebellar granule neurons*. Mol Cell Neurosci, 2006. **32**(3): p. 242-53.
86. Piccioli, P., C. Porcile, S. Stanzione, M. Bisaglia, A. Bajetto, R. Bonavia, T. Florio, and G. Schettini, *Inhibition of nuclear factor-kappaB activation induces apoptosis in cerebellar granule cells*. J Neurosci Res, 2001. **66**(6): p. 1064-73.
87. Miller, T.M., K.L. Moulder, C.M. Knudson, D.J. Creedon, M. Deshmukh, S.J. Korsmeyer, and E.M. Johnson, Jr., *Bax deletion further orders the cell death pathway in cerebellar granule cells and suggests a caspase-independent pathway to cell death*. J Cell Biol, 1997. **139**(1): p. 205-17.
88. Schulz, J.B., M. Weller, and T. Klockgether, *Potassium deprivation-induced apoptosis of cerebellar granule neurons: a sequential requirement for new mRNA and protein synthesis, ICE-like protease activity, and reactive oxygen species*. J Neurosci, 1996. **16**(15): p. 4696-706.
89. Zhang, F.X., R. Rubin, and T.A. Rooney, *N-Methyl-D-aspartate inhibits apoptosis through activation of phosphatidylinositol 3-kinase in cerebellar granule neurons. A role for insulin receptor substrate-1 in the neurotrophic action of n-methyl-D-aspartate and its inhibition by ethanol*. J Biol Chem, 1998. **273**(41): p. 26596-602.
90. Lauritzen, I., M. Zanzouri, E. Honore, F. Duprat, M.U. Ehrenguber, M. Lazdunski, and A.J. Patel, *K+-dependent cerebellar granule neuron apoptosis. Role of task leak K+ channels*. J Biol Chem, 2003. **278**(34): p. 32068-76.
91. Schramm, M., S. Eimerl, and E. Costa, *Serum and depolarizing agents cause acute neurotoxicity in cultured cerebellar granule cells: role of the glutamate receptor responsive to N-methyl-D-aspartate*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(3): p. 1193-7.
92. Atabay, C., C.M. Cagnoli, E. Kharlamov, M.D. Ikonomovic, and H. Manev, *Removal of serum from primary cultures of cerebellar granule neurons induces oxidative stress and DNA fragmentation: protection with antioxidants and glutamate receptor antagonists*. J Neurosci Res, 1996. **43**(4): p. 465-75.
93. Maycotte, P., S. Blancas, and J. Moran, *Role of inhibitor of apoptosis proteins and Smac/DIABLO in staurosporine-induced cerebellar granule neurons death*. Neurochem Res, 2008. **33**(8): p. 1534-40.
94. Budd, S.L. and D.G. Nicholls, *Mitochondria, calcium regulation, and acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells*. J Neurochem, 1996. **67**(6): p. 2282-91.
95. Pang, Z. and J.W. Geddes, *Mechanisms of cell death induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: acute excitotoxic necrosis and delayed apoptosis*. J Neurosci, 1997. **17**(9): p. 3064-73.
96. Leist, M., B. Single, H. Naumann, E. Fava, B. Simon, S. Kuhnle, and P. Nicotera, *Inhibition of mitochondrial ATP generation by nitric oxide switches apoptosis to necrosis*. Exp Cell Res, 1999. **249**(2): p. 396-403.
97. Atlante, A., A. Bobba, P. Calissano, S. Passarella, and E. Marra, *The apoptosis/necrosis transition in cerebellar granule cells depends on the mutual relationship of the antioxidant and the proteolytic*

- systems which regulate ROS production and cytochrome c release en route to death.* J Neurochem, 2003. **84**(5): p. 960-71.
98. Volbracht, C., M. Leist, and P. Nicotera, *ATP controls neuronal apoptosis triggered by microtubule breakdown or potassium deprivation.* Mol Med, 1999. **5**(7): p. 477-89.
 99. Eguchi, Y., A. Srinivasan, K.J. Tomaselli, S. Shimizu, and Y. Tsujimoto, *ATP-dependent steps in apoptotic signal transduction.* Cancer Res, 1999. **59**(9): p. 2174-81.
 100. Schafer, Z.T. and S. Kornbluth, *The apoptosome: physiological, developmental, and pathological modes of regulation.* Dev Cell, 2006. **10**(5): p. 549-61.
 101. Chandra, D., S.B. Bratton, M.D. Person, Y. Tian, A.G. Martin, M. Ayres, H.O. Fearnhead, V. Gandhi, and D.G. Tang, *Intracellular nucleotides act as critical prosurvival factors by binding to cytochrome C and inhibiting apoptosome.* Cell, 2006. **125**(7): p. 1333-46.
 102. Kass, G.E., J.E. Eriksson, M. Weis, S. Orrenius, and S.C. Chow, *Chromatin condensation during apoptosis requires ATP.* Biochem J, 1996. **318** (Pt 3): p. 749-52.
 103. Skulachev, V.P., *Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis.* Apoptosis, 2006. **11**(4): p. 473-85.
 104. Krohn, A.J., T. Wahlbrink, and J.H. Prehn, *Mitochondrial depolarization is not required for neuronal apoptosis.* J Neurosci, 1999. **19**(17): p. 7394-404.
 105. Lum, J.J., R.J. DeBerardinis, and C.B. Thompson, *Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(6): p. 439-48.
 106. Colell, A., J.E. Ricci, S. Tait, S. Milasta, U. Maurer, L. Bouchier-Hayes, P. Fitzgerald, A. Guio-Carrion, N.J. Waterhouse, C.W. Li, B. Mari, P. Barbry, D.D. Newmeyer, H.M. Beere, and D.R. Green, *GAPDH and autophagy preserve survival after apoptotic cytochrome c release in the absence of caspase activation.* Cell, 2007. **129**(5): p. 983-97.
 107. Hammerman, P.S., C.J. Fox, and C.B. Thompson, *Beginnings of a signal-transduction pathway for bioenergetic control of cell survival.* Trends Biochem Sci, 2004. **29**(11): p. 586-92.
 108. Du, L., X. Zhang, Y.Y. Han, N.A. Burke, P.M. Kochanek, S.C. Watkins, S.H. Graham, J.A. Carcillo, C. Szabo, and R.S. Clark, *Intra-mitochondrial poly(ADP-ribosylation) contributes to NAD+ depletion and cell death induced by oxidative stress.* J Biol Chem, 2003. **278**(20): p. 18426-33.
 109. Valko, M., D. Leibfritz, J. Moncol, M.T. Cronin, M. Mazur, and J. Telser, *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.* Int J Biochem Cell Biol, 2007. **39**(1): p. 44-84.
 110. Storz, P., *Mitochondrial ROS--radical detoxification, mediated by protein kinase D.* Trends Cell Biol, 2007. **17**(1): p. 13-8.
 111. Tammariello, S.P., M.T. Quinn, and S. Estus, *NADPH oxidase contributes directly to oxidative stress and apoptosis in nerve growth factor-deprived sympathetic neurons.* J Neurosci, 2000. **20**(1): p. RC53.
 112. Kahlert, S., G. Zundorf, and G. Reiser, *Glutamate-mediated influx of extracellular Ca²⁺ is coupled with reactive oxygen species generation in cultured hippocampal neurons but not in astrocytes.* J Neurosci Res, 2005. **79**(1-2): p. 262-71.
 113. Bonfoco, E., D. Krainc, M. Ankarcrona, P. Nicotera, and S.A. Lipton, *Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(16): p. 7162-6.
 114. Koh, D.W., T.M. Dawson, and V.L. Dawson, *Poly(ADP-ribosyl)ation regulation of life and death in the nervous system.* Cell Mol Life Sci, 2005. **62**(7-8): p. 760-8.
 115. Yu, L., F. Wan, S. Dutta, S. Welsh, Z. Liu, E. Freundt, E.H. Baehrecke, and M. Lenardo, *Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(13): p. 4952-7.
 116. Crescentini, G. and V. Stocchi, *Fast reversed-phase high-performance liquid chromatographic determination of nucleotides in red blood cells.* J Chromatogr, 1984. **290**: p. 393-9.
 117. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
 118. Alavez, S., D. Pedroza, and J. Moran, *Mechanisms of cell death by deprivation of depolarizing conditions during cerebellar granule neurons maturation.* Neurochem Int, 2003. **43**(6): p. 581-90.
 119. Biederbick, A., H.F. Kern, and H.P. Elsasser, *Monodansylcadaverine (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles.* Eur J Cell Biol, 1995. **66**(1): p. 3-14.

120. Niemann, A., A. Takatsuki, and H.P. Elsasser, *The lysosomotropic agent monodansylcadaverine also acts as a solvent polarity probe*. J Histochem Cytochem, 2000. **48**(2): p. 251-8.
121. Bampton, E.T., C.G. Goemans, D. Niranjana, N. Mizushima, and A.M. Tolkovsky, *The dynamics of autophagy visualized in live cells: from autophagosome formation to fusion with endo/lysosomes*. Autophagy, 2005. **1**(1): p. 23-36.
122. Nicotera, P., M. Leist, and E. Ferrando-May, *Intracellular ATP, a switch in the decision between apoptosis and necrosis*. Toxicol Lett, 1998. **102-103**: p. 139-42.
123. Mizushima, N. and T. Yoshimori, *How to interpret LC3 immunoblotting*. Autophagy, 2007. **3**(6): p. 542-5.
124. Coyoy, A., A. Valencia, A. Guemez-Gamboa, and J. Moran, *Role of NADPH oxidase in the apoptotic death of cultured cerebellar granule neurons*. Free Radic Biol Med, 2008. **45**(8): p. 1056-64.
125. Lambeth, J.D., T. Kawahara, and B. Diebold, *Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression*. Free Radic Biol Med, 2007. **43**(3): p. 319-31.
126. Codogno, P. and A.J. Meijer, *Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death*. Cell Death Differ, 2005. **12 Suppl 2**: p. 1509-18.
127. Levine, B. and J. Yuan, *Autophagy in cell death: an innocent convict?* J Clin Invest, 2005. **115**(10): p. 2679-88.
128. Lockshin, R.A. and Z. Zakeri, *Apoptosis, autophagy, and more*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(12): p. 2405-19.

Apoptosis and Autophagy in Rat Cerebellar Granule Neuron Death:

Role of Reactive Oxygen Species

Paola Maycotte, Alicia Guemez-Gamboa, Julio Moran

División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular,
Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F., México

Programmed cell death (PCD) has been defined as an active, controlled process in which cells participate in their own demise. Apoptosis, or type I PCD, has been widely characterized, both morphologically and biochemically. More recently, autophagy, the self-digesting mechanism involved in the removal of cytoplasmic long-lived proteins, has been involved in cell death and type II PCD is defined as cell death occurring with autophagic features. Neurons can undergo more than one type of PCD as a backup mechanism when the traditional death pathway is inhibited, or in response to a particular death inducing stimulus. Reactive oxygen species (ROS) have shown to be important signaling molecules in the execution of apoptosis and more recently, in the autophagic pathway. In this work, we characterized apoptotic and autophagic cell death in rat cerebellar granule neuron (CGN) culture, a widespread model for the study of neuronal death. Potassium deprivation (K5) and staurosporine (STS) were used for death induction. We found apoptotic and autophagic features under both conditions. Caspase inhibition as well as autophagy inhibition by 3-methyl adenine decreased cell death. Moreover, CGN can undergo the alternative type of cell death when the other one is inhibited. An antioxidant or NADPH oxidase inhibitors, delayed apoptosis and had no effect in autophagic features. Thus, we found that autophagy plays a role in cell death of CGN and that when cells are treated with K5 or STS, both autophagy and ROS seem to promote apoptosis by independent mechanisms.

Keywords: caspases, 3-methyl adenine, serum and potassium deprivation, staurosporine.

Programmed cell death (PCD) occurs in physiological and pathological processes. In the nervous system it is important for the correct shaping of structures during development and in the neuronal loss occurring in neurodegenerative

diseases (De Zio et al. 2005; Krantic et al. 2005). Type I PCD or apoptosis is characterized by the activation of a family of cysteine proteases or caspases. Caspases are responsible for chromatin and nuclear condensation, phosphatidylserine translocation, internucleosomal DNA fragmentation and cell disintegration into apoptotic bodies which are later removed by heterophagocytosis (Clarke 1990; Thornberry and Lazebnik 1998).

Autophagy was initially described as a process in which cytoplasmic material is degraded in lysosomes providing nutrients for survival. However, autophagic features have also been observed in cells exposed to pathologic insults as well as in remodeling tissues and autophagy inhibitors can rescue cells from death (Canu et al. 2005; Codogno and Meijer 2005; Xue et al. 1999). Thus, type II PCD or autophagic cell death is characterized by the presence of autophagosomes, double-membrane vacuoles, which transport cytoplasmic content into lysosomes for its degradation and depends on the activation of Atg proteins (Codogno and Meijer 2005).

Rat cerebellar granule neuron (CGN) culture is a widespread model for the study of cell death. Cultured CGN require depolarizing conditions as high extracellular potassium (KCl 25 mM, K25) or glutamatergic stimulation to survive and mature *in vitro*. It has been suggested that this stimulation mimics the establishment of CGN glutamatergic connections with mossy fibers during *in vivo* development (Balazs et al. 1988; Moran and Patel 1989). When CGN grown in K25 for 6-8 days *in vitro* (DIV) are transferred to a medium with KCl 5 mM (K5), about 40-80% cells die with apoptotic features after 24-48 h, respectively (Caballero-Benitez and Moran 2003; Moran et al. 1999). Although PCD induced by potassium deprivation in CGN has usually been considered apoptotic, recent evidences suggest the involvement of autophagy (Canu et al. 2005; Kaasik et al. 2005) in this model. CGN also die apoptotically when cells are treated with staurosporine (STS), a protein kinase inhibitor, which induces cell death with caspase activation,

cytochrome-c release and nuclear condensation (Caballero-Benitez and Moran 2003).

On the other hand, reactive oxygen species (ROS) have been implicated in a large diversity of processes, not only as byproducts of cellular reactions but also as signaling molecules involved in cell functions (Covarrubias et al. 2008), in apoptotic signaling pathways (Valencia and Moran 2001), and more recently in autophagic cell death (Scherz-Shouval and Elazar 2007). It has been recently reported that when CGN are treated with K5 or STS, an increase in ROS generation occurs as well as an activation of a NADPH oxidase, a superoxide producing enzyme that seems to be involved in the apoptotic death of GCN (Coyoy et al. 2008). In this work we evaluated the autophagic cell death of CGN induced by K5 and STS as well as its relationship with apoptosis. We corroborated that apoptotic cell death is induced under these conditions; however, we also found an important contribution of autophagic PCD to the loss of cell viability induced by K5 and STS. We also studied ROS involvement in both types of PCD induced by K5 and STS in CGN. Although ROS have been previously involved in the appearance of apoptotic features in both treatments, we only found a delay in apoptotic feature appearance and no effect in autophagic features when CGN are treated with K5 or STS together with an antioxidant or with NADPH oxidase inhibitors.

MATERIALS AND METHODS

Reagents. Unless otherwise noted reagents were purchased from Sigma.

Cell culture. Animals used for experimentation in this study were treated in accordance with procedures approved by the local Committee of Research and Ethics of the Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. Protocols used followed the Guidelines for the Use of Animals in Neuroscience Research as well as the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used.

CGN were obtained as previously described (Moran and Patel 1989). Briefly, eight-day-old Wistar rats were decapitated and dissociated cerebellar cell suspensions were plated at a density of 265,000 cells/cm³ in plastic dishes coated previously with 5 µg/ml poly-L-lysine. Culture medium contained basal Eagle's medium supplemented with 10% (v/v) heat inactivated foetal calf serum (Gibco-

Invitrogen), 2 mM glutamine, 25 mM KCl (K25), 50 µg/ml streptomycin and 50 U/ml penicillin. Culture dishes were incubated at 37°C in a humidified 5% CO₂/ 95% air atmosphere, and cytosine arabinoside (10 µM) was added after 24 h. After 7-8 DIV, CGN were changed to a medium containing 25 mM KCl without serum (K25), or a medium containing 5 mM KCl without serum (K5). Other cells were treated with STS (0.5 µM) for the indicated time or with 100 µM glutamate plus 1 µM glycine in Locke medium (154 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 3.6 mM NaHCO₃, 2.3 CaCl₂, 5.6 mM glucose, 10 mM Hepes, pH 7.4) for 30 min and then returned to its culture medium for the indicated time. Glutamate control cells were left in Locke medium for 30 min and returned to their original medium for the indicated time (Locke). To inhibit apoptosis, we used Q-VD-OPH (QVD), a general caspase inhibitor (MP Biomedicals). Diphenylene iodonium (DPI) and 4-(2-aminoethyl) benzensulfonyl fluoride (AEBSF) were used to inhibit NADPH oxidase at a concentration of 520 nM and 40 µM, respectively.

Cell viability. Cells were treated with 5 µM fluorescein diacetate (FDA) and 10 µM propidium iodide (PI) for 5 min at 37°C, washed and observed in a Zeiss Axiovert 200M epifluorescence microscope with excitation wavelengths of 510-560 nm and 450-490 nm respectively.

Nuclear condensation. After treatment, CGN were fixed with 4% formaldehyde in PBS for 30 min, washed and incubated with 0.01% Hoechst 33258 (Molecular Probes) for 5 min. Cultures were washed and observed in a Zeiss Axiovert 200M epifluorescence microscope with excitation wavelength of 330-380 nm.

DNA extraction. CGN were homogenized in lysis buffer (10 mM Trizma, 10 mM EDTA, 10 mM NaCl, 2% SDS, pH 7.4) for 30 min at 4°C and digested with proteinase K at 56°C for 2 h. DNA was extracted with phenol-chloroform and precipitated with ethanol. Samples were digested with RNase A (Roche), separated in a 1.5% agarose gel and visualized with ethidium bromide staining.

Monodansylcadaverine (MDC) staining. Cells were grown on coverslips and after treatment were incubated with 0.5 µM MDC in PBS for 10 min at 37°C, washed and mounted on a perfusion chamber. Cells were observed on an inverted Zeiss Axiovert 200M epifluorescence microscope with excitation wavelength of 330-380 nm. For annexin staining, CGN were previously incubated with Annexin-V FLUOS staining Kit (Roche) for 10 min at 37 °C and

then incubated with MDC. Annexin-V and propidium iodide were observed at excitation wavelengths of 510-560 nm and 450-490 nm, respectively.

Electron microscopy: Cells were washed, fixed with 3% glutaraldehyde in PBS, collected, washed and secondary fixation was done with 1% OsO₄. Cells were dehydrated in increasing ethanol concentrations, treated with propylene oxide and embedded in Epon resin. 70 nm sections were stained and observed in a JEOL JEM-1200 EXII electronic microscope at 60-70 kV. Area measurement was done using the Image-J program, NIH Image version 1.38x.

Immunoblots. Cells were washed with PBS and homogenized using lysis buffer containing 25 mM Tris, 50 mM NaCl, 2% Igepal, 0.2% SDS and Complete protease inhibitors (Roche), pH 7.4. Protein concentration was determined by the method of Bradford (Bradford 1976). Cell homogenates were separated in 20% acrylamide Tris-Tricine gels and were transferred to a PVDF (Millipore) membrane. Blots were blocked with Tris-buffered saline (100 mM Trizma, 150 mM NaCl, pH 7.5) containing 5% non-fat dry milk for 1 h, washed with TTBS (0.1% Tween in TBS) and incubated overnight with anti-LC3 antibody (PD014, MBL Int.) or anti-GAPDH antibody (Chemicon) primary antibody at 4°C. After washing, blots were incubated with an anti-rabbit (Zymed) or anti-mouse (Sigma) secondary antibodies coupled to alkaline phosphatase for 1 h at room temperature. Blots were processed for visualization using a chemiluminescence system according to the manufacturer's recommendations (CDP-Star) and exposed to Kodak Biomax Light film. Densitometric analysis was done using the Image-J program, NIH Image version 1.38x. As a positive control, CGN were treated with 200 nM rapamycin and 20 µg/ml pepstatin A for 24 h.

Immunocytochemistry. CGN were grown on cover slips previously coated with 25 µg/ml poly-L-lysine. After treatment, CGN were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS, washed and permeabilized using 0.1% sodium citrate and 0.1% Triton. Cells were blocked with 10% goat serum in 0.3% Triton in PBS, washed and treated with TUNEL reagent (Roche) coupled to fluorescein for 60 min at 37°C. Primary anti-LC3 antibody (PM036 MBL Int.) was used at 1:100 in blocking solution overnight at 4°C. Cells were washed and incubated with Texas Red secondary antibody (Vector Labs) at 1:500 in blocking solution at 37°C, washed and mounted using Vectashield mounting media with

DAPI (Vector Labs). Cells were visualized in an Olympus IX71 fluorescence microscope.

ROS detection. CGN were either changed to a medium containing 25 mM KCl without serum (K25), changed to a medium containing 5 mM KCl without serum (K5) for 4 h or treated with 0.5 µM STS for 5 h and incubated for 30 min with 3.2 µM dihydroethidine (Molecular Probes) in culture medium at 37°C. Cells were washed with PBS, fixed with 3% formaldehyde at 4°C for 7 min, washed and observed in an epifluorescence Nikon microscope using a G2A filter (excitation 546 nm, emission 590 nm). 25 µM H₂O₂ and xantine / xantine oxidase (XaXO) were used as positive controls. CGN were treated for 4 h with H₂O₂ or for XaXO treatment, cells were incubated with 100 µM xantine for 2 h and then treated with 45 mU/ml of xantine oxidase for another 2 h. MnTMPyP (MN, Calbiochem) was used at a concentration of 50 µM for the indicated time.

NADPH oxidase activity. NADPH oxidase activity was evaluated by the superoxide dismutase (SOD)-inhibitable reduction of cytochrome-c in a quantitative kinetic assay (Shpungin et al. 1989). After 4h of K5 or 5h of STS treatment, cells were washed with PBS and homogenized in a saline buffer (150mM KCl, 150mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1mM EGTA, 2 mM NaN₃, 1 mM DTT, pH 7.4) plus 2% (v/v) glycerol. The homogenate was incubated at 25°C for 90 s with a reaction mixture containing saline buffer plus 0.1 mM cytochrome-c, 10 µM FAD, 1 mM DTT and 100 µM SDS, pH 6.8. Activity was started with the addition of 0.2 mM NADPH and followed spectrophotometrically as the reduction of cytochrome-c at an excitation wavelength of 550 nm during 120 s. The reference cuvette additionally contained 300 U/ml SOD (Roche). Protein was determined by the method of Bradford and results are expressed as change in absorbance per second per gram of protein.

Statistical Analysis. Data in graphs are expressed as mean ± SE of more than three independent experiments. One-way ANOVAs were used followed by Tukey-Kramer HSD pairwise comparisons using Systat 11 Software (Systat Software, Inc).

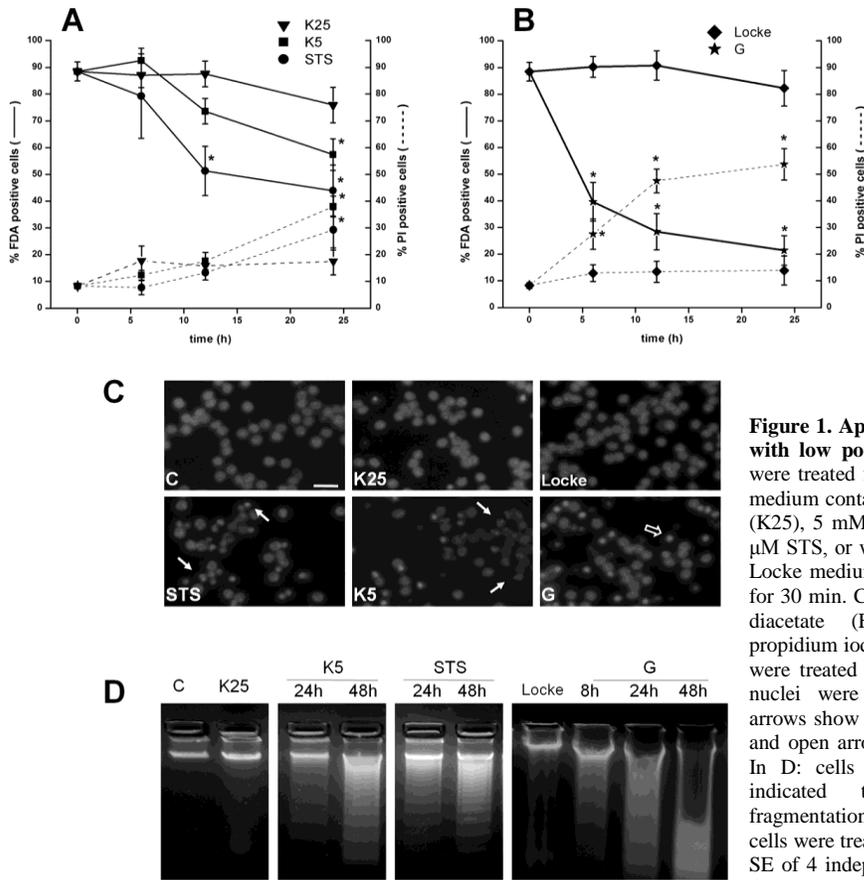


Figure 1. Apoptotic features of CGN treated with low potassium or staurosporine. Cells were treated for the time indicated with (A): a medium containing 25 mM KCl without serum (K25), 5 mM KCl without serum (K5), or 0.5 μ M STS, or with (B): 100 μ M glutamate (G) or Locke medium as a control for G treated cells for 30 min. Cells were stained with fluorescein diacetate (FDA, continuous lines) and propidium iodide (PI, dashed lines). In C: CGN were treated for 24 h as indicated above and nuclei were stained with H \ddot{o} chst. Closed arrows show fragmented and condensed nuclei and open arrows show only condensed nuclei. In D: cells were treated as above for the indicated times, and internucleosomal fragmentation was evaluated. K25 and Locke cells were treated for 48h. Graphs show mean \pm SE of 4 independent experiments, * represents differences from $t = 0$ h, $p \leq 0.05$. C and D show representative images of 3 independent experiments. Scale bar in C represents 20 μ m.

RESULTS

Characterization of cell death of CGN

To define the type of PCD of CGN induced by different experimental conditions, we evaluated apoptotic and autophagic features in cells grown for 7 DIV under depolarizing conditions (25 mM KCl, control cells (C)) and then switched to low potassium (5 mM KCl, K5) or treated with 0.5 μ M STS. Because potassium deprivation is also accompanied by serum deprivation, and since autophagy has a survival role in cells deprived of nutrients, we studied the effect of serum deprivation of CGN maintained in a medium with 25 mM KCl (K25).

Under these conditions we found that serum deprived cells (K25) were not affected for up to 24 h (Fig. 1 A), in contrast to K5 and STS treated cells that suffered a gradual decrease of cell viability of 57 and 43% as compared to untreated cells, respectively. To evaluate a possible necrotic component of death under these conditions, we also studied the effect of glutamate that is known to induce excitotoxic cell death of CGN (Ankarcrona et al. 1995). Glutamate treatment also induced a marked decrease of cell viability that, in contrast to K5 and STS (Fig. 1 A), showed a marked PI staining at early times of treatment (i.e. 6h) (Fig. 1 B). So,

although K5 and STS also induced an increase of PI staining, it could be attributable to secondary necrosis probably occurring by the absence of phagocytes in culture.

In agreement with previous results (Caballero-Benitez and Moran 2003; D'Mello et al. 1993; Moran et al. 1999), we found that both K5 and STS induced CGN death with apoptotic features. After 24 h of both treatments we found nuclear condensation and fragmentation (Fig. 1 C) as well as internucleosomal DNA fragmentation (Fig. 1 D). No DNA degradation was observed in K5 nor STS treated cells after 48 h, suggesting the existence of a programmed rather than necrotic cell death. In contrast, glutamate induced nuclear condensation (Fig. 1 C) and a marked DNA degradation as well as a slight internucleosomal DNA fragmentation at 8 h (Fig. 1 D), which is in accordance to previously published results (Ankarcrona et al. 1995).

To characterize autophagy, we carried out monodansylcadaverine (MDC) staining and electron microscopy analysis (Fig. 2). MDC accumulates in the acidic spherical compartments containing acid phosphatase and cathepsin D (Biederbick et al. 1995) and it has also high affinity for the lipid content of autophagic vacuoles

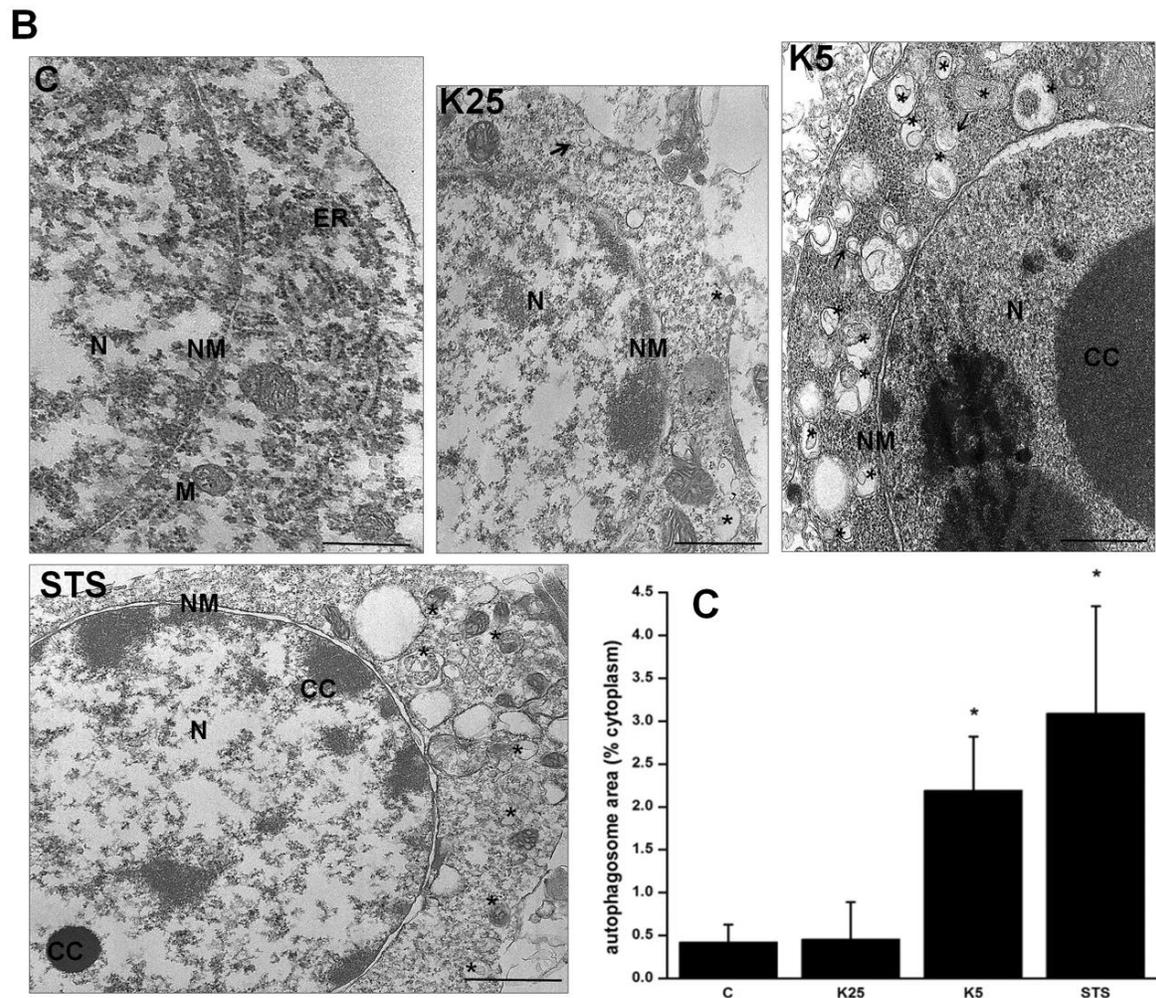
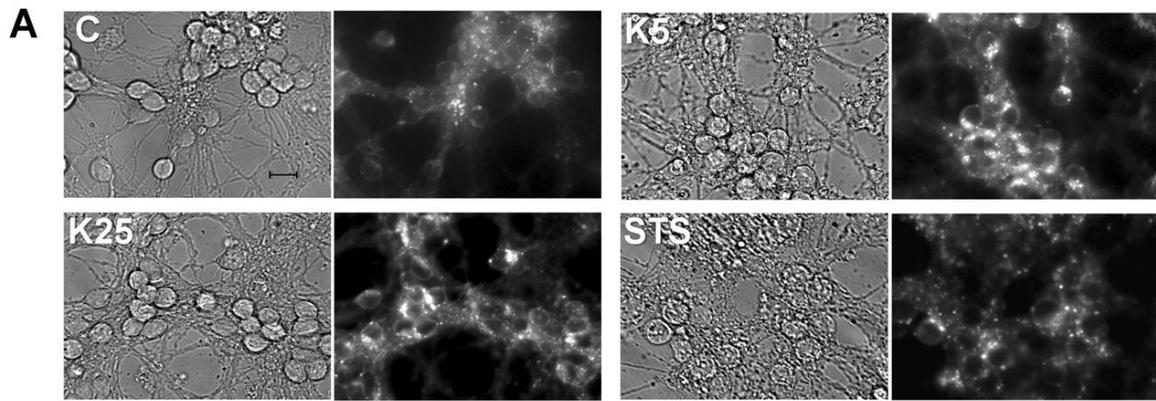


Figure 2. Evaluation of autophagic features in CGN treated with low potassium or staurosporine. Cells were treated for 8 h with a medium containing 25 mM KCl without serum (K25), 5 mM KCl without serum (K5), or 0.5 μ M STS and stained with monodansylcadaverine (MDC, A) or treated for 12 h and analyzed by electron microscopy as detailed in methods (B). The scale bar in A represents 10 μ m and in B 1 μ m. Asterisks in B show vesicles with double membrane considered as autophagosomes; arrows show membranous structures considered as phagophores; N, nucleus; NM, nuclear membrane; CC, condensed chromatin; M, mitochondria; ER, endoplasmic reticulum. C shows the quantification of autophagosome area as the percent of cytoplasmic area and shows mean \pm SE of 3 independent experiments, * represents difference from C, $p \leq 0.05$.

(Niemann et al. 2000). Therefore, although a basal lysosome staining is expected, an increase in fluorescence could indicate autophagosome formation. This was observed in untreated cells that showed a basal MDC staining with diffuse cytoplasmic staining and fluorescent dots (Fig. 2 A). K25 cells showed an increase of fluorescence and dye accumulation. We also found that most CGN treated with K5 showed a marked dye accumulation which occurred in one pole of the cells after 8 h of treatment. On the other hand, dye accumulation was not clearly observed in STS treated cells; however, fluorescent dots looked bigger when compared to control cells.

Electron microscopy analysis showed that control cells contained healthy mitochondria, uncondensed nucleus and relaxed chromatin. After 12 h of treatment, K25 cells showed some double membrane vacuoles with autophagic content, which were considered autophagosomes that could account for the increase in MDC staining (Fig. 2 A). However, no increase in autophagosome area in electron microscopy analysis could be detected in K25 when compared to control cells (Fig. 2 C). In K5 and STS treated cells, we observed chromatin condensation and an intense autophagosome formation (Fig. 2 B, asterisks) as well as an increase in the autophagosome area (Fig. 2 C). We also observed an increase in LC3 processing by Western Blot as well as an increase in LC3 punctuate staining by immunocytochemistry induced by both treatments.

Effect of apoptosis and autophagy inhibition on PCD features

We evaluated the possible interrelationship between autophagy and apoptosis in cell death induced by K5 and STS. It is known that the autophagic process is regulated by class III PI3K that can be inhibited by 3-methyl adenine (3MA) (Canu et al. 2005; Codogno and Meijer 2005; Xue et al. 1999). Also, it has been reported that caspase inhibition blocks apoptosis in both K5 and STS treated cells. Fig. 3 A and B show that neither 3MA nor QVD-OPH (QVD), a cell permeant general caspase inhibitor, had any effect on the viability of control or K25 cells. In agreement with previous results (Caballero-Benitez and Moran 2003; Canu et al. 2005), both apoptosis and autophagy inhibitors protected K5 treated CGN from cell death at 24 h, being 3MA more effective than the caspase inhibitor (Fig. 3 C, E). The observed protection is significantly reduced after 48 h of 3MA treatment and no protection was seen with QVD-OPH. Moreover, treatment with both inhibitors protected CGN more than 3MA alone, suggesting two independent death pathways.

STS induced cell death was also delayed by both apoptosis and autophagy inhibitors (Fig. 3 D, E). At 24 h, both 3MA and QVD-OPH reduced cell death to the same extent and at 48 h only caspase inhibition could decrease cell death. However, at 24 h about 50% of cells die regardless of the treatment with both inhibitors, suggesting that STS could have an additional toxic effect and cells cannot recover although both death pathways are inhibited.

To further evaluate the contribution of each type of PCD on death occurring with both stimuli we evaluated apoptotic and autophagic features on CGN treated with K5 and STS in the presence of both inhibitors. We used internucleosomal DNA fragmentation and nuclear condensation to assess apoptosis. Under these conditions, neither 3MA nor QVD-OPH treatment had any effect on internucleosomal DNA fragmentation or nuclear condensation in control (C) or serum deprived cells (K25, Fig. 4 A, D). However, 3MA inhibited internucleosomal DNA fragmentation in K5 treated cells at 12 h but not at 24 or 48 h (Fig. 4 B) as well as nuclear condensation at 48 h (Fig. 4 C, E). Thus, the delay in cell death observed with 3MA treatment in K5 cells is only a delay in apoptosis since DNA is still fragmented and cell death observed at 48 h under this condition seems to be apoptotic. It is interesting to note that although no cell death was observed at 24 h with K5 and 3MA, DNA is fragmented to almost the same degree as in K5 treated cells showing a 50% cell death (Fig. 4 B). On the other hand, no internucleosomal DNA fragmentation was seen in cells treated with K5 and a caspase inhibitor even at 48 h, suggesting that caspases are being effectively inhibited. Under these conditions, nuclear condensation was decreased even though no protection from cell death was seen at that time. Finally, treatment with both death inhibitors completely inhibited nuclear condensation and internucleosomal DNA fragmentation at 48 h, suggesting the activation of two simultaneous death pathways triggered by potassium deprivation.

Likewise, 3MA inhibited internucleosomal DNA fragmentation in STS treated CGN at 12 but not at 24 h (Fig. 4 B). In addition, it reduced nuclear condensation at 24 but not at 48 h (Fig. 4 F). Caspase inhibition as well as treatment with both inhibitors completely blocked DNA fragmentation and nuclear condensation at 48 h (Fig. 4 B, F).

We also evaluated the effect of both death inhibitors on autophagic characteristics in CGN treated with K5 and STS. Under these conditions, we examined the presence of autophagosomes by electron microscopy (Fig. 5 A) as well as LC3 processing by Western Blot (Fig. 5 B, C). An increase in LC3 conjugated to phosphatidylethanolamine (LC3

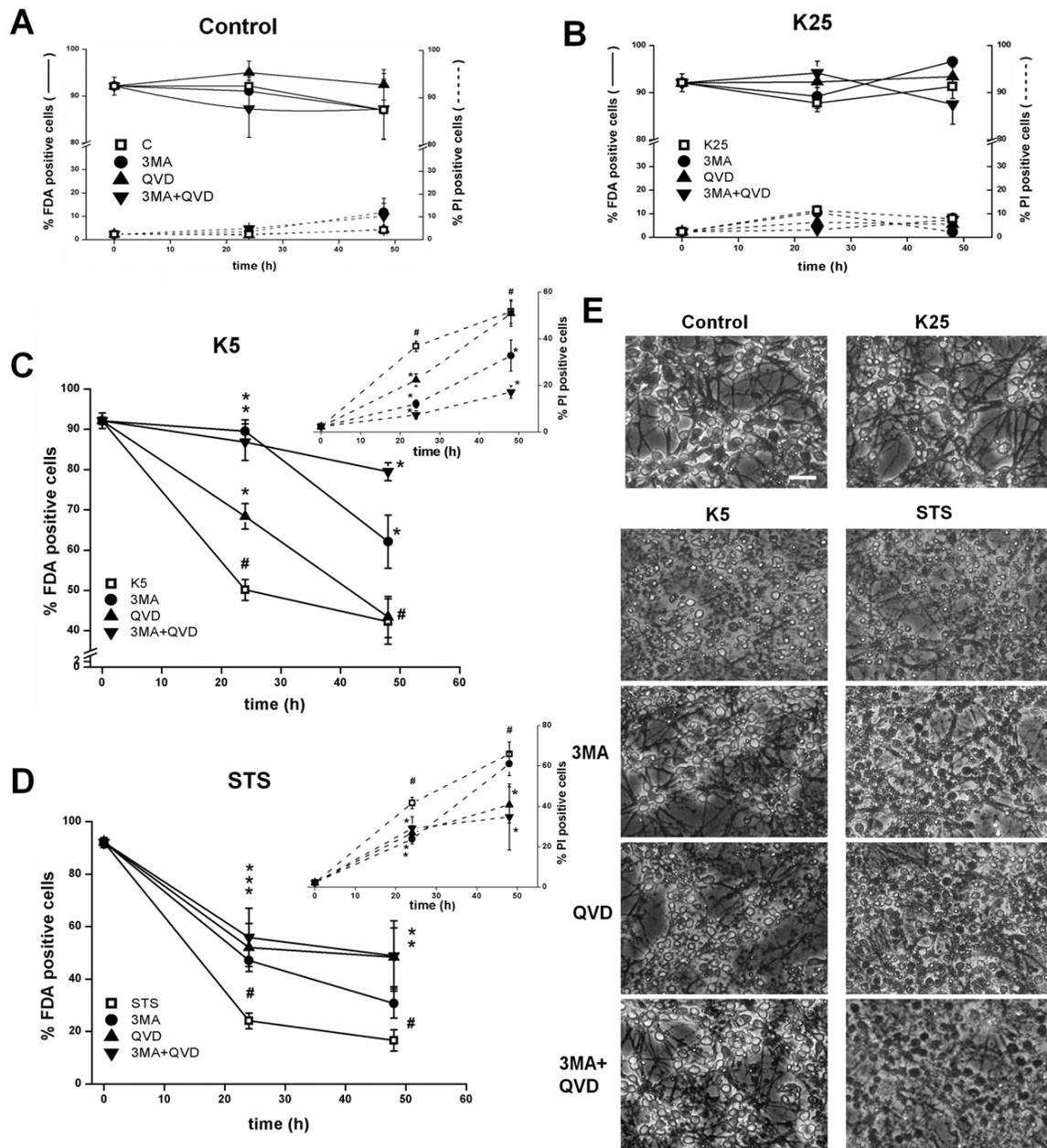


Figure 3. Effect of apoptosis and autophagy inhibitors on CGN death induced by low potassium and staurosporine. CGN were grown for 7 DIV in a 25 mM KCl medium with serum (C) and treated for the indicated times with 25 mM KCl medium without serum (K25), with 5 mM KCl medium without serum (K5) or with 0.5 μM STS in the presence or absence of the autophagy inhibitor 3-methyladenine (3MA, 10 mM) or the caspase inhibitor Q-VD-OPH (QVD, 20 μM). In A-D, viability was assessed using FDA (continuous lines) and PI staining (dashed lines). Graphs show mean ± SE of 5 independent experiments; # represents difference from t = 0 h; * represents difference from each respective control with no inhibitor, $p \leq 0.05$. In E, cells were treated as described above and observed by phase contrast microscopy. Scale bar represents 20 μm.

II), which migrates faster in SDS-PAGE due to its increase in hydrophobicity, reflects an increase in autophagosome formation (Klionsky et al. 2008; Mizushima and Yoshimori 2007).

In K5 and STS treated CGN, both autophagosome formation (Fig. 5 A, asterisks) and LC3 processing (Fig. 5 B, C) were clearly increased, and 3MA

effectively decreased both autophagic parameters. Interestingly, numerous cup shaped membrane structures were found in 3MA treated cells (Fig. 5 A, arrows), probably reflecting pre-autophagosomal structure accumulation. On the other hand, QVD-OPH treatment induced the formation of autophagosomes (Fig. 5 A, asterisks), as well as an

which was inhibited by 3MA. Thus, when caspases are inhibited in K5 and STS treated CGN, neuronal death is reduced. However, cells still die showing autophagic features.

To evaluate if both apoptosis and autophagy are occurring at the same time in a single cell or in two different populations of CGN dying by different

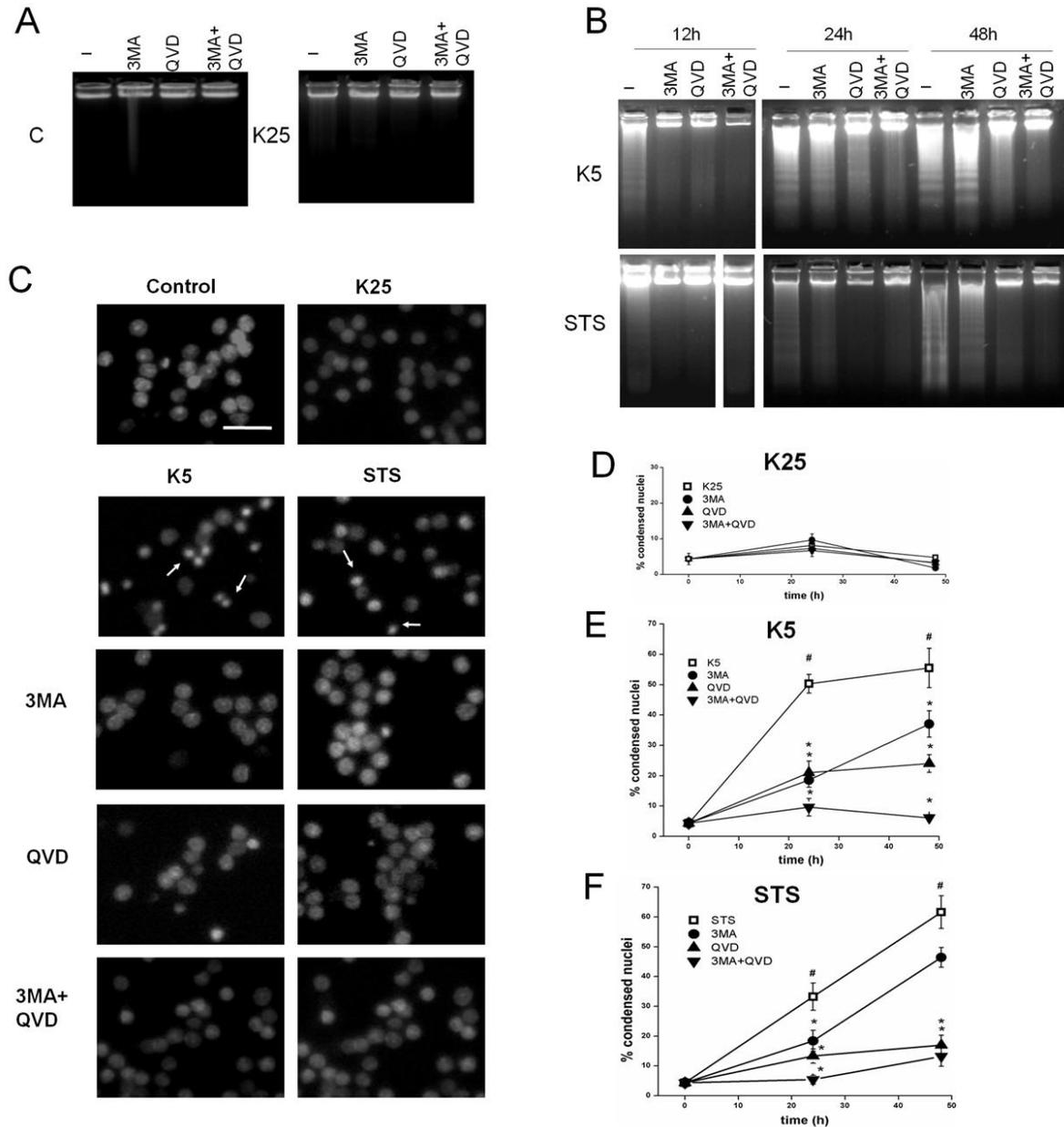


Figure 4. Effect of apoptosis and autophagy inhibitors on apoptotic features of CGN treated with low potassium and staurosporine. Internucleosomal DNA fragmentation (A, B) and nuclear condensation (C-F) were evaluated as apoptotic features in CGN treated with K5 or STS with or without apoptosis or autophagy inhibitors. CGN were grown for 7 DIV (control, C) and treated with 10 mM 3MA or 20 μ M QVD-OPH (QVD, A) or were treated with 25 mM KCl medium without serum (K25, A, D), 5 mM KCl medium without serum (K5, B, E) or 0.5 μ M STS (B, F) in the presence or absence of 3MA or QVD. Pictures in A and B show representative images of 3 independent experiments. In C, arrows show condensed nuclei, scale bar represents 20 μ m. Graphs in D-F show mean \pm SE of 5 independent experiments; # represents difference from $t = 0$; * represents difference from its control with no death inhibitor, $p \leq 0.05$.

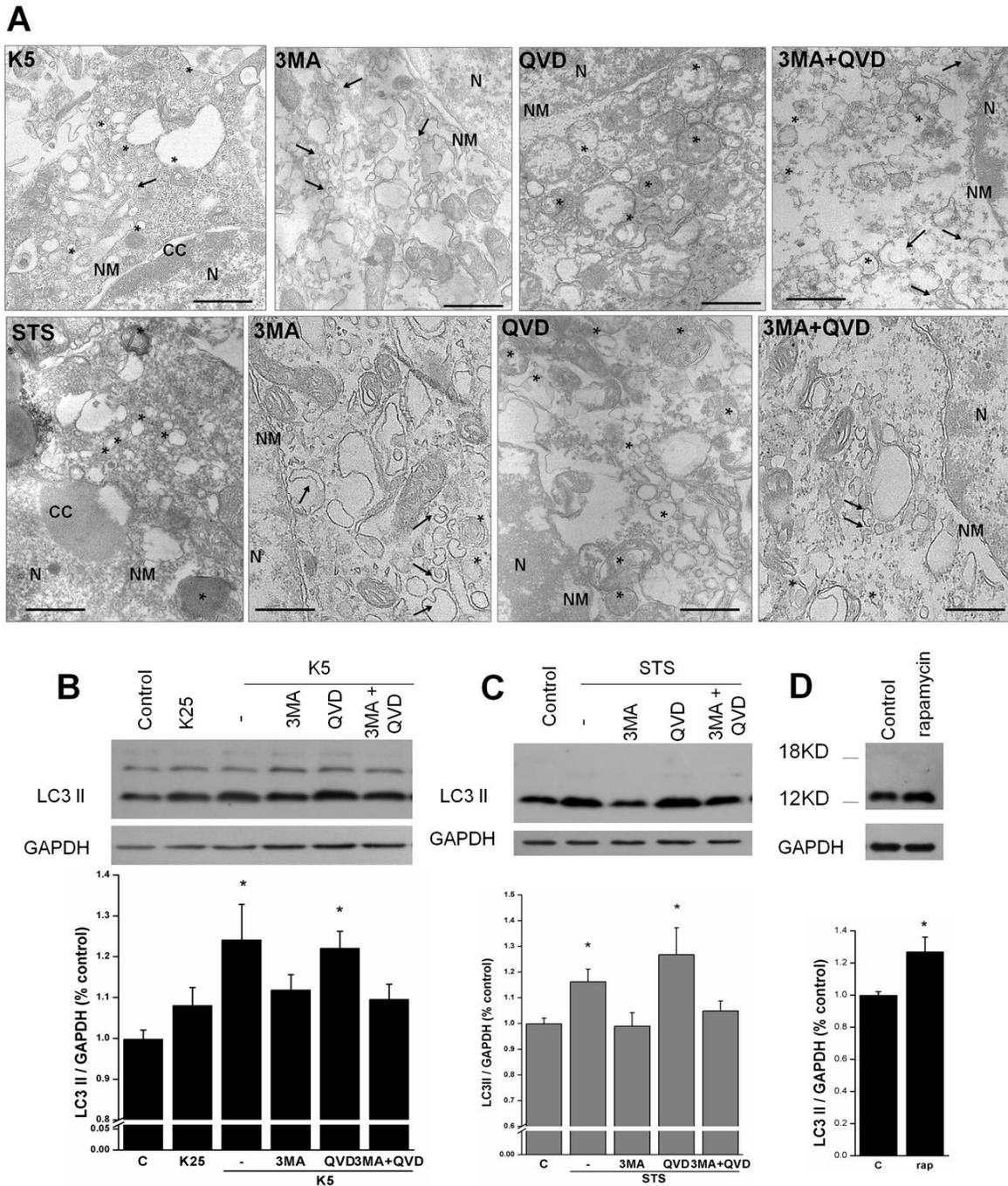


Figure 5. Effect of apoptosis and autophagy inhibitors on autophagic features of CGN treated with low potassium and staurosporine. Autophagy of CGN treated with 5 mM KCl medium (K5) or STS was evaluated by electron microscopy (A) and LC3 immunoblots (B, C, D). CGN were grown for 7 DIV (control) and were treated with 25 mM KCl medium without serum (K25), 5 mM KCl medium without serum (K5) or 0.5 μ M STS with or without 10 mM 3MA or 20 μ M QVD-OPH (QVD). Cells were treated for 12 h (A) or for 6 h (B, C). Asterisks in A show autophagosomes and arrows show phagophores; N, nucleus; NM, nuclear membrane; CC, condensed chromatin. In D, cells were treated with 200 nM rapamycin for 24 h to induce autophagy. Scale bar in A represents 500 nm. Graphs in B, C and D show mean optical density units \pm SE of 5 independent experiments; * represents difference from control cells, $p \leq 0.05$.

types of PCD, we performed a chemistry analysis with an anti-LC3 antibody together with TUNEL staining. We found that practically all K5 and STS treated cells showed an increase in LC3 punctuates staining after 8 h of treatment (Fig. 6 A) and some of

some cells with increased MDC accumulation after K5 treatment or with enlarged fluorescent dots after STS treatment were also stained with Annexin V, an indicator of phosphatidylserine exposure (Supplemental Figure). These facts suggest that in

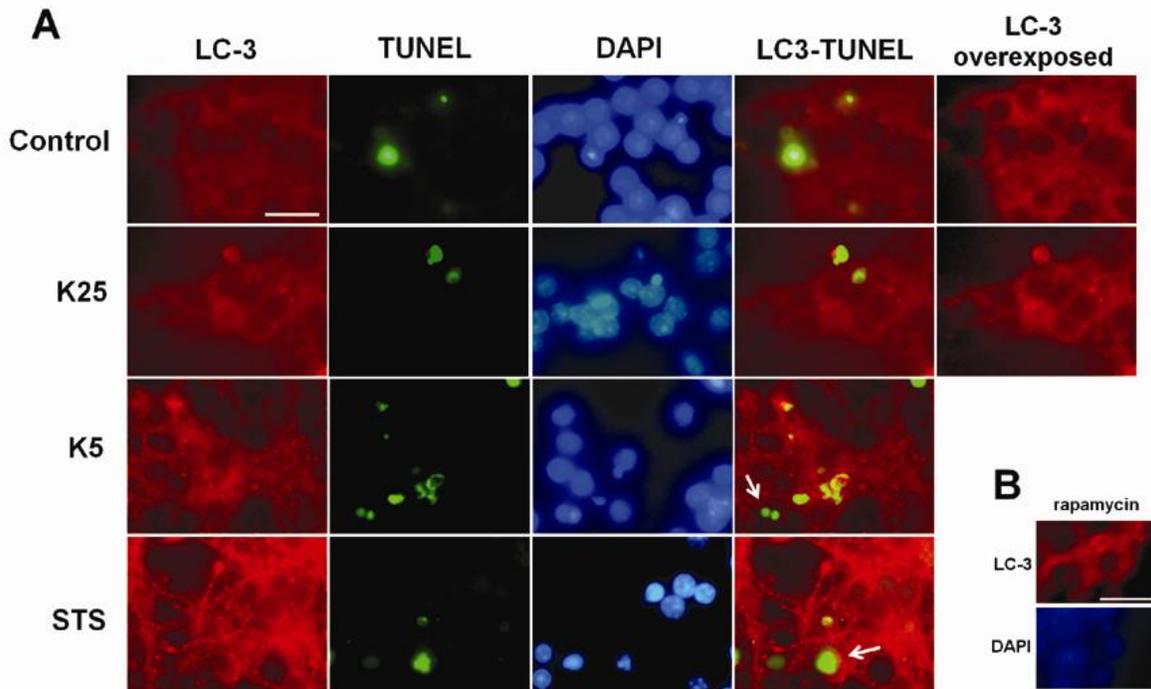


Figure 6. Localization of autophagic and apoptotic parameters in CGN. CGN were treated with 25 mM KCl medium without serum (K25), 5 mM KCl medium without serum (K5) or with 0.5 μ M STS and visualized by fluorescence microscopy. Autophagy was assessed with LC3 immunocytochemistry and apoptosis was evaluated with TUNEL staining and nuclear fragmentation. Nuclei were stained with DAPI. For a clearer comparison between treatments, control and K25 LC3 staining pictures were overexposed. Rapamycin was used as a positive control (B). Arrows show cells with both apoptotic and autophagic features. Scale bar represent s 10 μ m.

both treatments, apoptosis and autophagy are taking place in the same cell and that autophagy could be an earlier event.

Role of oxidative stress and NADPH oxidase in CGN programmed cell death

When CGN are treated with K5 or STS, an increase in ROS occurs that seems to be involved in cell death. Previous studies have suggested that ROS could be attributable to NADPH oxidase. We found an increase in ROS measured as dihydroethidine (DHE) positive cells after 4-5 h of K5 or STS treatment that was inhibited by an antioxidant (MnTMPyP, MN). Interestingly, we also found that the inhibitor of autophagy 3MA markedly prevented the observed ROS generation induced by both K5 and STS (Fig. 7 A). This effect was not due to a possible antioxidant property of 3MA because it did not prevent the increase of DHE positive cells induced by hydrogen peroxide (H_2O_2) or xantine/xantine oxidase (XaXO), a superoxide generating system (Fig. 7 A). Moreover, 3MA as well as wortmannin (W), another PI3K inhibitor, prevented the increase of NADPH oxidase activity seen at 4-5 h in K5 and STS treated cells (Fig. 7 B).

We also evaluated apoptotic and autophagic features of CGN treated with K5 or STS with the antioxidant MN as well as two different NADPH oxidase inhibitors: diphenylene iodonium (DPI) and 4-(2-aminoethyl) benzensulfonyl fluoride (AEBSF). Under these conditions we found that although AEBSF (AE) and MN decreased internucleosomal DNA fragmentation at 8 h in K5 and STS treated cells, no differences were seen at 12 h as compared to their respective controls (Fig. 7 C). Neither NADPH oxidase inhibitors nor the antioxidant tested changed the amount of LC3 II processed in K5 and STS treated CGN (Fig. 8 A). Furthermore, autophagosomes and phagophores were still observed in CGN treated with K5 or STS in the presence of MN, DPI or AEBSF in electron microscopy analysis (Fig. 8 C). Also, the accumulation of membranous structures was observed in CGN treated with STS plus AEBSF or MN (Fig. 8 C). It has been reported that DPI induces an increased cell death when used together with STS, therefore it was not used in STS treated cells (Coyoy et al. 2008).

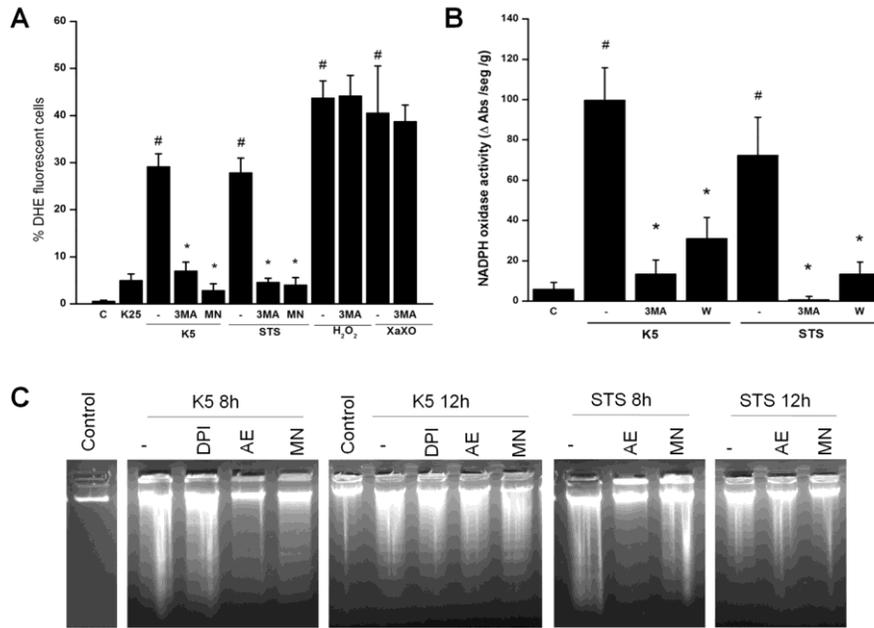


Figure 7. Role of ROS and NADPH oxidase in apoptotic features of CGN death induced by low potassium and staurosporine. ROS production was evaluated as dihydroethidium staining (A) and NADPH oxidase activity was measured spectrophotometrically (B). MnTMPyP (MN, 50 μ M) was used as an antioxidant and diphenylene iodonium (DPI, 520 nM) and AEBSF (AE, 40 μ M) were used to inhibit NADPH oxidase. Graphs show mean \pm SE of 3 independent experiments; # represents difference from control and * represents differences from each respective control with no 3MA or antioxidant, $p \leq 0.05$. Internucleosomal DNA fragmentation (C) was evaluated in CGN treated as indicated above and as detailed in methods.

DISCUSSION

In this study we found evidence of apoptotic and autophagic features in CGN undergoing cell death by K5 or STS treatment. Both processes seem to be involved in the observed decrease of viability and our results suggest that they occur in the same cell. We propose that reactive oxygen species and autophagy function as two independent mechanisms for promoting apoptosis in this model.

Programmed cell death occurring in the nervous system has usually been considered to be apoptotic (De Zio et al. 2005). However, under some physiological and pathological conditions, neuronal death can also show non apoptotic features (Clarke 1990). It has been demonstrated that in some areas of the nervous system, caspase deficient neurons die by a non apoptotic mechanism (Oppenheim et al. 2001). Although excessive levels of autophagy can be found in dying cells (Clarke 1990; Codogno and Meijer 2005; Levine and Yuan 2005) it is not yet clear whether the autophagic process is involved in the cell demise or if it is rather a survival response activated after a death inducing signal. However, autophagic features are found in cells conventionally considered to die apoptotically (Canu et al. 2005; Xue et al.

1999) as well as in cells where the apoptosis pathway is inhibited (Lang-Rollin et al. 2003). Although the treatments used in this study have been considered to be apoptotic (Caballero-Benitez and Moran 2003; Moran et al. 1999), we found an important contribution of autophagic cell death in CGN treated with K5 or STS. Our results suggest two independent death pathways. Interestingly, while autophagic cell death seems to be more important in K5-induced cell death, apoptosis would play a more significant role in CGN death induced by STS. Autophagy is considered to precede apoptosis in CGN treated with K5, and cathepsin activation has been proposed to be necessary for caspase activity (Canu et al. 2005). In our study we found that autophagy inhibition induced a delay in the appearance of apoptotic features induced by both K5 and STS. On the other hand, caspase inhibition produced a delay of cell death induced by both treatments, with no internucleosomal DNA fragmentation, an increase of autophagosome formation and an increase in LC3 processing (Fig. 5) suggesting that cell death is occurring through autophagy. Interestingly, in the case of K5 when CGN are treated with both autophagy and apoptosis inhibitors, DNA is not fragmented (Fig. 4 B),

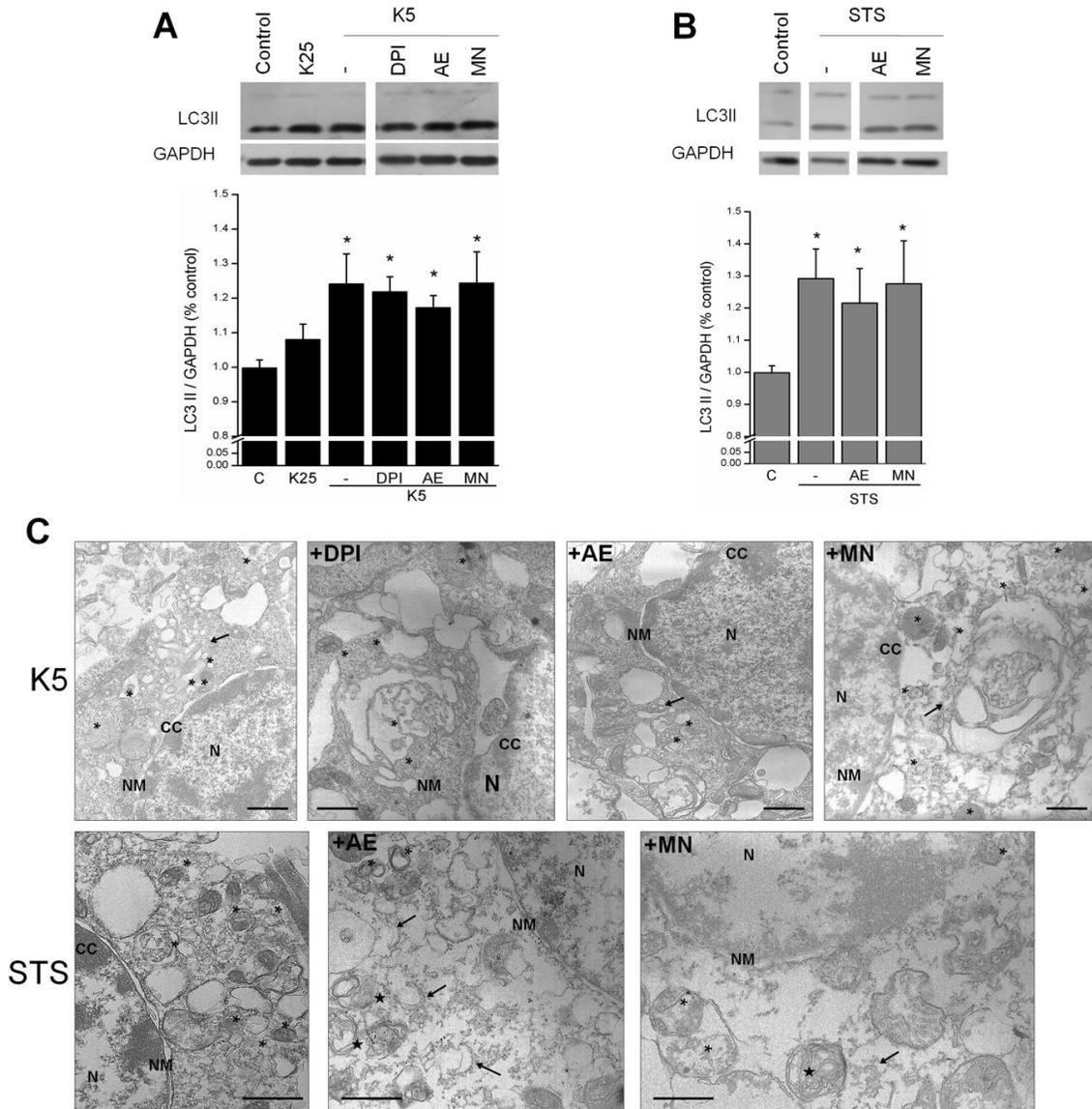


Figure 8. Role of ROS and NADPH oxidase inhibitors in autophagic features of CGN death induced by low potassium and staurosporine. Autophagy of CGN was evaluated by electron microscopy and LC3 immunoblots. Cells were treated with potassium deprivation (K5) or 0.5 μ M STS in the presence or absence of the antioxidant MnTMPyP (MN, 50 μ M) and the inhibitors of NADPH oxidase diphenylene iodonium (DPI, 520 nM) and AEBSF (AE, 40 μ M). Graphs in A and B show mean \pm SE of 6 independent experiments; * represents differences from control cells (C), $p \leq 0.05$. Asterisks in C show autophagosomes; arrows show pre-autophagosomal structures; stars show vacuoles with membranous accumulation. N, nucleus; NM, nuclear membrane; CC, condensed chromatin. Bars in C represent 500 nm.

nuclei are not condensed or fragmented (Fig. 4 E), LC3 processing does not increase (Fig. 5 B) and no decrease in viability is seen, even at 48 h (Fig. 3 C). Both inhibitors show an additive effect on cell death induced by K5, suggesting again that two independent pathways are

activated by this treatment. Moreover, while 3MA prevents cell death of K5 cells at 24 h, caspase inhibition only increases cell viability by 20% (Fig. 3 C). Thus, autophagy seems to contribute more than apoptosis to the decrease in viability observed under this treatment.

When CGN death is induced by STS, both inhibitors of apoptosis and autophagy decrease cell death, this decrease in viability is only transient (Fig. 3) and CGN die at 48 h. It is possible that inhibition of protein kinases by STS is having an effect that cells cannot face although both death pathways are inhibited. Moreover, in the case of STS, autophagy seems to be promoting apoptosis and not to have a key role in the decrease in viability, since 3MA only decreases cell death transiently and no synergistic effect is seen with both death inhibitors (Fig. 3 D). Furthermore, although both death inhibitors show a similar protection from cell death at 24 h, only QVD-OPH protects from cell death at 48 h (Fig. 3 D). Thus apoptosis seems to be the main death pathway occurring in STS treated CGN.

All these results suggest that CGN die through both type I and II PCD mechanisms when treated with K5 or STS and that they are able to undergo one cell death pathway when the other one is inhibited. It is worth mentioning that both apoptotic and autophagic features were detected in the same cell (Fig. 6 and supplemental figure). This evidence strongly suggests the activation of both pathways in the same cell rather than in a subpopulation of CGN.

On the other hand, the NADPH oxidase family has been involved in apoptotic death of CGN treated with K5 or STS. NADPH oxidase inhibitors can decrease K5 and STS treated CGN death as well as caspase activity at 8 h (Coyoy et al. 2008). In this study, the use of NADPH oxidase inhibitors, DPI and AEBSF, as well as an antioxidant delays the appearance of internucleosomal DNA fragments at 8 h in both K5 or STS treated CGN. However, this decrease is only transient and cells finally die apoptotically (Fig. 7 C). Moreover, no differences in LC3 processing were seen at the tested times (Fig. 8 A). Thus, ROS production by NADPH oxidase and autophagy must be promoting apoptosis independently. Finally, the PI3K inhibitor, 3 methyl adenine (3MA), decreased cell death and NADPH oxidase activity as well as ROS production in K5 and STS treatment (Fig. 3 C, D and Fig. 7 A, B). Part of this effect could be due to the fact that during NADPH oxidase activation, one of its

subunits requires the binding of phosphatidylinositol-3 phosphate, the product of class III PI3K (Lambeth et al. 2007). The strong protection from cell death observed after 3MA treatment, especially with K5, could be caused by simultaneous inhibition of both ROS production by NADPH oxidase and autophagy, the two apoptosis promoting pathways.

In conclusion, we found that autophagy promotes apoptosis in CGN treated with K5 or STS; however, it seems that autophagy is not necessary for apoptosis to occur because cells with autophagic inhibition still die apoptotically. Thus, we propose a mechanism in which CGN death induced by K5 and STS activate both death pathways, and when one is inhibited, the cells are able to die by the alternative mechanism. We found that both autophagy and ROS promote apoptosis. Apoptotic body formation could accelerate the clearance of dying cells by heterophagocytes and therefore, it seems to be that apoptosis is the preferred PCD pathway under these conditions. Autophagy could then be functioning as a mechanism to reduce cell mass prior to apoptosis, as it has been previously suggested (Lockshin and Zakeri 2004), and as a backup pathway in case apoptosis is inhibited.

Acknowledgements

The authors are grateful to Guadalupe Domínguez for the excellent technical assistance. This work was supported by DGAPA-UNAM (IN223107) and CONACYT (79788). Paola Maycotte and Alicia Guemez-Gamboa were supported by a CONACYT fellowship.

REFERENCES

- Ankarcrona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, Nicotera P. 1995. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 15(4):961-973.
- Balazs R, Gallo V, Kingsbury A. 1988. Effect of depolarization on the maturation of cerebellar granule cells in culture. *Brain Res* 468(2):269-276.
- Biederbick A, Kern HF, Elsasser HP. 1995. Monodansylcadaverine (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles. *Eur J Cell Biol* 66(1):3-14.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Caballero-Benitez A, Moran J. 2003. Caspase activation pathways induced by staurosporine and low potassium: role of caspase-2. *J Neurosci Res* 71(3):383-396.
- Canu N, Tufi R, Serafino AL, Amadoro G, Ciotti MT, Calissano P. 2005. Role of the autophagic-lysosomal system on

- low potassium-induced apoptosis in cultured cerebellar granule cells. *J Neurochem* 92(5):1228-1242.
- Clarke PG. 1990. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol (Berl)* 181(3):195-213.
- Codogno P, Meijer AJ. 2005. Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ* 12 Suppl 2:1509-1518.
- Covarrubias L, Hernandez-Garcia D, Schnabel D, Salas-Vidal E, Castro-Obregon S. 2008. Function of reactive oxygen species during animal development: passive or active? *Dev Biol* 320(1):1-11.
- Coyoy A, Valencia A, Gumez-Gamboa A, Moran J. 2008. Role of NADPH oxidase in the apoptotic death of cultured cerebellar granule neurons. *Free Radic Biol Med* 45(8):1056-1064.
- D'Mello SR, Galli C, Ciotti T, 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 U S A* 90(23):10989-10993.
- De Zio D, Giunta L, Corvaro M, Ferraro E, Cecconi F. 2005. Expanding roles of programmed cell death in mammalian neurodevelopment. *Semin Cell Dev Biol* 16(2):281-294.
- Gotoh K, Lu Z, Morita M, Shibata M, Koike M, Waguri S, Dono K, Doki Y, Kominami E, Sugioka A, Monden M, Uchiyama Y. 2009. Participation of autophagy in the initiation of graft dysfunction after rat liver transplantation. *Autophagy* 5(3):351-360.
- Kaasik A, Rikk T, Piirsoo A, Zharkovsky T, Zharkovsky A. 2005. Up-regulation of lysosomal cathepsin L and autophagy during neuronal death induced by reduced serum and potassium. *Eur J Neurosci* 22(5):1023-1031.
- Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P, Agrawal DK, Aliev G, Askew DS, Baba M, Baehrecke EH, Bahr BA, Ballabio A, Bamber BA, Bassham DC, Bergamini E, Bi X, Biard-Piechaczyk M, Blum JS, Bredezen DE, Brodsky JL, Brumell JH, Brunk UT, Bursch W, Camougrand N, Cebollero E, Cecconi F, Chen Y, Chin LS, Choi A, Chu CT, Chung J, Clarke PG, Clark RS, Clarke SG, Clave C, Cleveland JL, Codogno P, Colombo MI, Coto-Montes A, Cregg JM, Cuervo AM, Debnath J, Demarchi F, Dennis PB, Dennis PA, Deretic V, Dervenish RJ, Di Sano F, Dice JF, Difiglia M, Dinesh-Kumar S, Distelhorst CW, Djavaheri-Mergny M, Dorsey FC, Droge W, Dron M, Dunn WA, Jr., Duszenko M, Eissa NT, Elazar Z, Esclatine A, Eskelinen EL, Fesus L, Finley KD, Fuentes JM, Fueyo J, Fujisaki K, Galliot B, Gao FB, Gewirtz DA, Gibson SB, Gohla A, Goldberg AL, Gonzalez R, Gonzalez-Estevéz C, Gorski S, Gottlieb RA, Haussinger D, He YW, Heidenreich K, Hill JA, Hoyer-Hansen M, Hu X, Huang WP, Iwasaki A, Jaattela M, Jackson WT, Jiang X, Jin S, Johansen C, Jung JU, Kadowaki M, Kang C, Kelekar A, Kessel DH, Kiel JA, Kim HP, Kimchi A, Kinsella TJ, Kiselyov K, Kitamoto K, Knecht E, Komatsu M, Kominami E, Kondo S, Kovacs AL, Kroemer G, Kuan CY, Kumar R, Kundu M, Landry J, Laporte M, Le W, Lei HY, Lenardo MJ, Levine B, Lieberman A, Lim KL, Lin FC, Liou W, Liu LF, Lopez-Berestein G, Lopez-Otin C, Lu B, Macleod KF, Malorni W, Martinet W, Matsuoaka K, Mautner J, Meijer AJ, Melendez A, Michels P, Miotto G, Mistiaen WP, Mizushima N, Mograbi B, Monastyrska I, Moore MN, Moreira PI, Moriyasu Y, Motyl T, Munz C, Murphy LO, Naqvi NI, Neufeld TP, Nishino I, Nixon RA, Noda T, Nurnberg B, Ogawa M, Oleinick NL, Olsen LJ, Ozpolat B, Paglin S, Palmer GE, Papassideri I, Parkes M, Perlmutter DH, Perry G, Piacentini M, Pinkas-Kramarski R, Prescott M, Proikas-Cezanne T, Raben N, Rami A, Reggiori F, Rohrer B, Rubinsztein DC, Ryan KM, Sadoshima J, Sakagami H, Sakai Y, Sandri M, Sasakawa C, Sass M, Schneider C, Seglen PO, Selverstov O, Settleman J, Shacka JJ, Shapiro IM, Sibirny A, Silva-Zacarin EC, Simon HU, Simone C, Simonsen A, Smith MA, Spanel-Borowski K, Srinivas V, Steeves M, Stenmark H, Stromhaug PE, Subauste CS, Sugimoto S, Sulzer D, Suzuki T, Swanson MS, Tabas I, Takeshita F, Talbot NJ, Tallozy Z, Tanaka K, Tanida I, Taylor GS, Taylor JP, Terman A, Tettamanti G, Thompson CB, Thumm M, Tolkovsky AM, Tooze SA, Truant R, Tumanovska LV, Uchiyama Y, Ueno T, Uzcategui NL, van der Klei I, Vaquero EC, Vellai T, Vogel MW, Wang HG, Webster P, Wiley JW, Xi Z, Xiao G, Yahalom J, Yang JM, Yap G, Yin XM, Yoshimori T, Yu L, Yue Z, Yuzaki M, Zabirnyk O, Zheng X, Zhu X, Deter RL. 2008. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* 4(2):151-175.
- Krantic S, Mechawar N, Reix S, Quirion R. 2005. Molecular basis of programmed cell death involved in neurodegeneration. *Trends Neurosci* 28(12):670-676.
- Lambeth JD, Kawahara T, Diebold B. 2007. Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression. *Free Radic Biol Med* 43(3):319-331.
- Lang-Rollin IC, Rideout HJ, Noticewala M, Stefanis L. 2003. Mechanisms of caspase-independent neuronal death: energy depletion and free radical generation. *J Neurosci* 23(35):11015-11025.
- Levine B, Yuan J. 2005. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest* 115(10):2679-2688.
- Lockshin RA, Zakeri Z. 2004. Apoptosis, autophagy, and more. *Int J Biochem Cell Biol* 36(12):2405-2419.
- Mizushima N, Yoshimori T. 2007. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* 3(6):542-545.
- Moran J, Itoh T, Reddy UR, Chen M, Alnemri ES, Pleasure D. 1999. Caspase-3 expression by cerebellar granule neurons is regulated by calcium and cyclic AMP. *J Neurochem* 73(2):568-577.
- Moran J, Patel AJ. 1989. Stimulation of the N-methyl-D-aspartate receptor promotes the biochemical differentiation of cerebellar granule neurons and not astrocytes. *Brain Res* 486(1):15-25.
- Niemann A, Takatsuki A, Elsasser HP. 2000. The lysosomotropic agent monodansylcadaverine also acts as a solvent polarity probe. *J Histochem Cytochem* 48(2):251-258.
- Oppenheim RW, Flavell RA, Vinsant S, Prevette D, Kuan CY, Rakic P. 2001. Programmed cell death of developing mammalian neurons after genetic deletion of caspases. *J Neurosci* 21(13):4752-4760.
- Scherz-Shouval R, Elazar Z. 2007. ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. *Trends Cell Biol* 17(9):422-427.
- 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(16):9195-9203.
- Thornberry NA, Lazebnik Y. 1998. Caspases: enemies within. *Science* 281(5381):1312-1316.
- Valencia A, Moran J. 2001. Role of oxidative stress in the apoptotic cell death of cultured cerebellar granule neurons. *J Neurosci Res* 64(3):284-297.
- Xue L, Fletcher GC, Tolkovsky AM. 1999. Autophagy is activated by apoptotic signalling in sympathetic neurons: an alternative mechanism of death execution. *Mol Cell Neurosci* 14(3):180-198.

