



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

PROGRAMA DE DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PAPEL DE LOS HOMÓLOGOS DE NOX EN
LA MUERTE APOPTÓTICA DE LAS
NEURONAS GRANULARES DE CEREBELO
EN CULTIVO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

BIÓL. ALICIA DIONÉ GÜEMEZ GAMBOA

DIRECTOR DE TESIS: DR. JULIO MORÁN ANDRADE

MÉXICO, D. F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

*"How do you know I'm mad?"
said Alice
"You must be" said the cat
"Or you wouldn't have come here"¹.*

*"Above all, don't fear difficult moments. The best comes from them"
Rita Levi Montalcini*

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

Este trabajo se realizó con el apoyo de la beca
para estudios de posgrado del Consejo
Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)

A mi madre y a mi padre, por las diferencias
y semejanzas que me hacen ser quien soy
A mi hermana, la más parecida a mí
y a la vez la más diferente

A Jerónimo, por lo que fue, lo que es y lo que será...

AGRADECIMIENTOS:

A mi tutor, el Dr. Julio Morán Andrade por su tiempo, la orientación y apoyo en el desarrollo de mi tesis y su valiosa contribución y asesoría en mi formación académica.

A mi comité tutorial, la Dra. Clorinda Arias Álvarez y el Dr. Jesús Aguirre Linares, por su disponibilidad y comentarios en el desarrollo de este proyecto.

Al jurado: Dr. Julio Morán Andrade, Dr. Ignacio Camacho Arroyo, Dr. Rolando Hernández Muñoz, Dr. Agustín Guerrero Hernández y Dra. Vilma Maldonado Lagunas, por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo, su valiosa contribución y asesoría.

A la Dra. Lourdes Massieu Trigo por su valiosa contribución y asesoría en el desarrollo de mi formación académica.

A la Bióloga Guadalupe Domínguez, por el apoyo técnico recibido durante la realización de este proyecto.

A la Bióloga Teresa Montiel, por el apoyo y disposición recibidos durante la realización de este proyecto.

A mi familia.

A mis compañeros y amigos del laboratorio.

A todos mis amigos, del Instituto, de la Facultad y de épocas pasadas, ustedes saben lo importantes que son.

A nuestra máxima casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México.

ÍNDICE

Resumen.....	3
Abstract.....	4
Lista de Abreviaturas.....	5
I. Introducción.....	7
1.1. Muerte apoptótica.....	7
1.2. Apoptosis en el sistema nervioso.....	11
1.3. Apoptosis y estrés oxidante.....	13
1.4. NADPH oxidasa.....	15
1.5. Familia NOX.....	17
1.6. NOX en el sistema nervioso.....	19
1.7. Muerte neuronal mediada por NOX	21
1.7.1 “Oxidative stress and apoptotic neuronal cell death: The role of NADPH oxidase complex”	21
II. Antecedentes.....	23
III. Planteamiento del problema.....	26
IV. Hipótesis.....	27
V. Objetivos.....	28
5.1. Objetivo general.....	28
5.2. Objetivos particulares.....	28
VI. Metodología.....	29
6.1. Materiales.....	29
6.2. Animales.....	29
6.3. Cultivo de neuronas granulares de cerebelo.....	29
6.4. Inducción de muerte neuronal.....	30
6.5. Viabilidad celular.....	30
6.6. Actividad de caspasas.....	31
6.7. Detección de especies reactivas de oxígeno.....	31
6.8. Actividad de NADPH oxidasa.....	31
6.9. Inmunoblot.....	32
6.10. Evaluación de la condensación nuclear	32
6.11. RT-PCR.....	32
6.12. Estadística.....	32
VII. Resultados.....	33
7.1. La actividad de NOX es indispensable para la muerte apoptótica de neuronas granulares de cerebelo inducida por bajo potasio y estaurosporina.....	34

7.1.1	“NOX2 mediates apoptotic cell death induced by staurosporine, but not by potassium deprivation in cerebellar granule neurons” Guemez-Gamboa y Moran, 2009.....	36
7.1.2	NOX1, NOX3 y NOX4 no participan en la muerte apoptótica de neuronas granulares de cerebelo.....	37
7.1.3	NOX3 participa en la muerte apoptótica de las neuronas granulares de cerebelo cultivadas en un medio con bajo potasio crónico.....	40
7.2.	Papel de NOX en la regulación del decremento del volumen apoptótico y los flujos iónicos durante la apoptosis de neuronas granulares de cerebelo.....	44
7.3.	Papel de p38 en la activación de NOX durante la muerte apoptótica de las neuronas granulares de cerebelo.....	49
VIII.	Discusión.....	52
8.1.	La actividad de NOX es indispensable para la muerte apoptótica de neuronas granulares de cerebelo en cultivo.....	52
8.2.	NOX participa en la regulación del decremento del volumen apoptótico y los flujos iónicos durante la apoptosis de neuronas granulares de cerebelo.....	56
8.3.	p38 participa en la activación de NOX durante la muerte apoptótica de neuronas granulares de cerebelo en cultivo.....	59
IX.	Conclusiones.....	62
X.	Referencias.....	63
XI.	Apéndice.....	68

11.1. Hernández-Enríquez B, Guemez-Gamboa A, y Morán J. ROS generation is related to ionic fluxes and apoptotic volume decrease of cultured granule neurons: role of NOX enzymes

11.2. Ramiro-Cortés Y, Guemez-Gamboa A y Morán J. p38 is involved in the activation of NADPH-oxidase induced by staurosporine but not by potassium deprivation during the apoptosis of cerebellar granule neurons

RESUMEN

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada que participa en el desarrollo embrionario y en ciertas condiciones patológicas. Se ha sugerido que la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) puede constituir un estímulo tanto inductor como ejecutor de la apoptosis. En diferentes modelos de neuronas en cultivo, la inducción de muerte apoptótica genera una condición pro oxidante, y el tratamiento con antioxidantes inhibe la muerte. Asimismo, las ROS generadas bajo estas condiciones podrían estar producidas por una NADPH oxidasa (NOX) presente en neuronas.

En este trabajo se analizó la participación de NOX en la muerte apoptótica de neuronas empleando como modelo el cultivo de neuronas granulares de cerebelo (NGC) de ratones deficientes en los diferentes homólogos de NOX, NOX1 a NOX4, tratadas con inductores apoptóticos como la privación de KCl extracelular (K5) o la aplicación de estaurosporina (ST). Bajo estas condiciones encontramos que en las NGC de ratones deficientes en NOX2 (NOX2 KO) se inhiben los parámetros apoptóticos evaluados y se protege de la muerte inducida por ST, sugiriendo la participación de NOX2 durante la apoptosis inducida específicamente por este tratamiento. En contraste, cuando las NGC se tratan con K5, no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los parámetros evaluados entre las neuronas NOX2 KO y las NGC silvestres. Sin embargo, el empleo de inhibidores de NOX disminuyó la generación de ROS y la muerte apoptótica inducida por K5, sugiriendo la participación de otros homólogos de NOX en este proceso. En este sentido, además de NOX2, detectamos la presencia de NOX1, NOX3 y NOX4 en NGC, por lo que se hicieron cultivos de NGC de ratones deficientes en estos homólogos y se les indujo muerte con K5 y ST. Los resultados obtenidos mostraron que las NGC deficientes en los homólogos de NOX (NOX1, NOX3 y NOX4) tratadas con ambas condiciones apoptóticas mueren de manera similar a las NGC silvestres, sugiriendo que ninguno de estos homólogos es indispensable para la muerte de las NGC inducida tanto por K5 como por ST.

El decremento apoptótico del volumen (AVD) es una característica universal de la apoptosis. Se sabe que los flujos iónicos participan tanto en el AVD como en la muerte de las NGC inducida por K5 y ST y que esta pérdida de volumen coincide con la activación de NOX. Dado que los canales iónicos relacionados con el AVD podrían ser regulados por algunas ROS evaluamos la relación entre las ROS generadas por NOX, el AVD y los flujos iónicos. En este sentido observamos que el AVD inducido por K5 y ST se inhibe por antioxidantes e inhibidores de NOX. Asimismo, el bloqueo de canales iónicos inhibió la actividad de NOX y por lo tanto la generación de ROS, sugiriendo un posible ciclo de retroalimentación entre ambos eventos, el cual podría propagar señales apoptóticas incluyendo el AVD.

Finalmente, se evaluó la relación entre las ROS producidas por la actividad de NOX y la activación de p38, una proteína-cinasa que participa en la apoptosis de NGC. Encontramos que la activación de p38 se encuentra río arriba de la generación de ROS y que al inhibir la activación de p38, se inhibe la actividad de NOX inducida por ST.

En conclusión, los homólogos de NOX participan en la muerte apoptótica de NGC de manera diferencial según el estímulo. En cualquier caso, las NOX parecen regular mecanismos intracelulares fundamentales para la progresión de la muerte apoptótica de estas neuronas.

ABSTRACT

Neuronal apoptotic death involves the participation of reactive oxygen species (ROS), but their sources have not been completely elucidated. Previous studies have demonstrated that the ROS-producing enzyme NADPH oxidase (NOX) is present in neuronal cells and that this enzyme could participate in the apoptotic neuronal death.

Cerebellar granule neurons (CGN) undergo apoptosis when cells are transferred from a medium with 25 mM KCl (K25) to a 5 mM KCl (K5) medium or when they are treated with staurosporine (ST). Under these conditions, apoptotic death of CGN is dependent on ROS production. In this study, we evaluated the role of NOX homologues in the apoptotic death of CGN induced by two different conditions by using mice lacking different NOX enzymes (NOX1 to NOX4). In CGN from NOX2-deficient (NOX2 KO) mice, a significantly lower rate of apoptotic death occurs compared with wild-type (WT) CGN when cells are treated with ST. In contrast, when CGN were treated with K5, no differences were observed between NOX2 KO and WT cells in any of the parameters measured. However, all NOX inhibitors tested noticeably reduced cell death and apoptotic parameters induced by K5 in both WT and NOX2 KO CGN. These results suggest that NOX2 is necessary for apoptotic death induced by ST, but not by K5, which could require other member of the NOX family in the apoptotic process. In this regard, we found that NOX1, NOX3 and NOX4 are also expressed in CGN, so we use neurons from animals lacking these NOX homologues. After K5 and ST treatments, neurons from the 3 different NOX KO mice died similarly to WT neurons. Thus, neither NOX1, NOX3 nor NOX4 have a role in apoptotic death of CGN induced by K5 or ST.

Moreover, in a recent work our group described that K5 and ST produce an apoptotic volume decrease (AVD) in CGN. We also showed that this event begins at a similar time of ROS generation and NOX activation induced by these two conditions. In the present study we evaluated a possible relationship between oxidative stress, NOX activity and AVD. We showed that AVD induced by K5 or ST was inhibited by antioxidants and NOX inhibitors, suggesting that ROS production via NOX activity is involved in AVD regulation. On other hand, it is known that ionic fluxes such as K^+ or Cl^- are involved on AVD and cell death of CGN induced by K5 or ST. In this regard, we found that the blockage of ionic fluxes inhibit ROS generation and NOX activity. These findings suggest that ionic fluxes related to AVD are also related to ROS generation and NOX activation, suggesting a self-amplifying cycle between NOX-produced ROS and ionic fluxes.

Finally, we evaluated the relationship between NOX-produced ROS and p38 activation, as p38 activation seems to be related to apoptotic death of CGN. Our results showed that p38 regulates ROS generation via NADPH oxidase activity in CGN treated with staurosporine.

In conclusion, NOX enzymes have different roles in apoptotic death of CGN despite the treatment; however, in both ST and K5 treatments, NOX homologs regulate fundamental intracellular processes to guarantee apoptotic cell death of these neurons.

INTRODUCCIÓN

1.1 Muerte Apoptótica

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada que contribuye a la eliminación selectiva de células en condiciones fisiológicas o patológicas manteniendo la homeostasis tisular durante el desarrollo o en el estado adulto. Es un proceso activo y ordenado que requiere de energía, síntesis de ARNm y de proteínas (Oppenheim *et al.*, 1990) y se caracteriza por una serie de cambios morfológicos y bioquímicos, como la condensación de la cromatina, la fragmentación del ADN, la translocación de la fosfatidilserina a la capa externa de la membrana, la liberación del citocromo c de la mitocondria y la activación de caspasas, entre otras (Fig. 1) (Moran, *et al.*, 1999, Valencia y Morán, 2001).

Otra característica apoptótica es el decremento del volumen apoptótico (*apoptotic volume decrease*, AVD), que es un evento crítico que involucra una alteración iónica y de la homeostasis del agua, así como una reorganización del citoesqueleto. Además, se ha propuesto que el AVD es un precedente para la progresión de la muerte, ya que podría estar asociado a la activación de caspasas y nucleasas. Éste ocurre en dos fases: primero, la disminución temprana de volumen, antes de algunos eventos como la liberación de citocromo-c y activación de caspasas, y segundo, la disminución tardía que ocurre simultáneamente con la fragmentación del ADN y la ruptura nuclear. (Benson *et al.*, 1996; Hacker, 2000; Maeno *et al.*, 2000).

El AVD está asociado a movimientos de ciertos iones, particularmente cloro (Cl^-) y potasio (K^+). Se ha reportado que el paso inicial en el AVD es una salida de K^+ , debida a la apertura de canales permeables a este ion, que a su vez provoca una salida de Cl^- a favor de su gradiente eléctrico y de concentración, causando un desbalance osmótico. Para restaurar el balance osmótico, ocurre una salida de agua de la célula, lo que conlleva a una reducción del volumen celular.

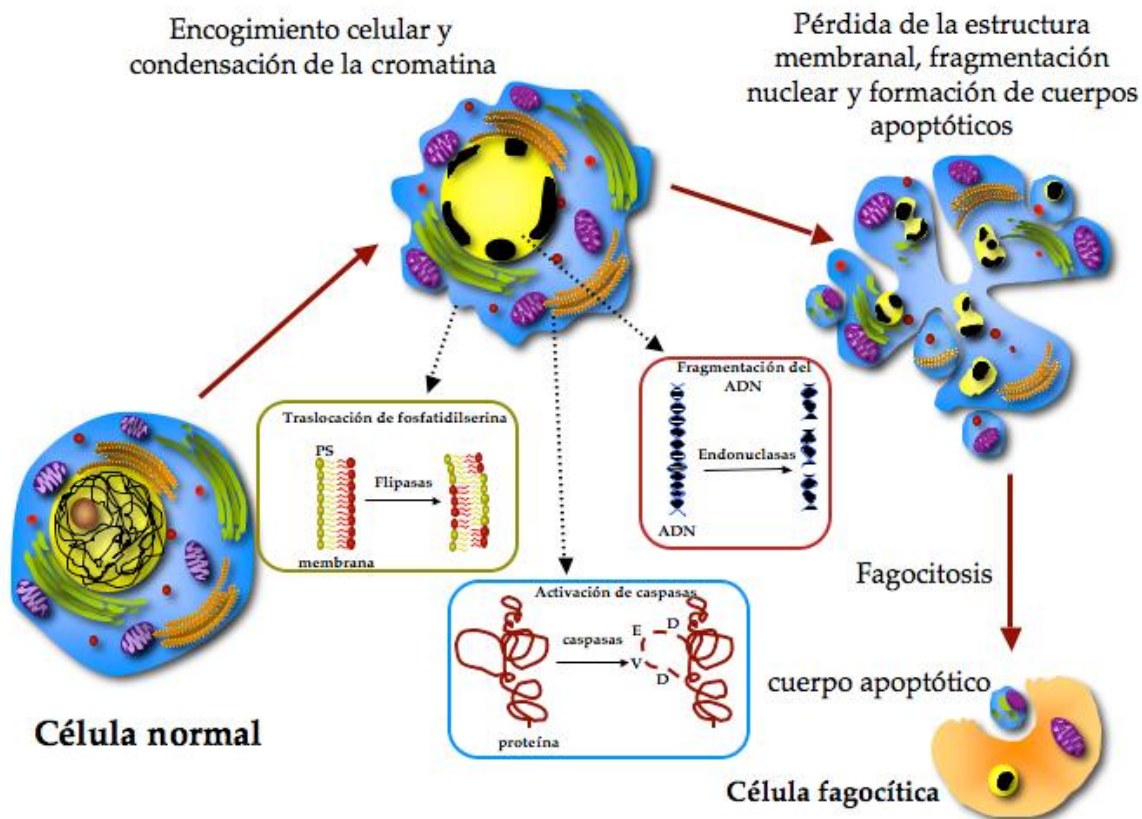


Figura 1. Cambios morfológicos y moleculares durante la apoptosis. Durante el proceso apoptótico ocurren cambios morfológicos como: encogimiento celular, condensación de la cromatina, pérdida en la estructura de la membrana citoplásmica, fragmentación nuclear y formación de cuerpos apoptóticos. Los cambios moleculares incluyen: las traslocación de la fosfatidilserina de la cara interna a la cara externa de la membrana, la activación de caspasas y la fragmentación del ADN por acción de endonucleasas.

Por otro lado, entre las proteínas involucradas en la apoptosis, las caspasas tienen un papel muy importante, tanto en el inicio como en la ejecución de la muerte apoptótica (Thornberry y Lazebnik, 1998). La mayoría de los cambios morfológicos observados durante este proceso se deben a la acción directa e indirecta de este grupo de proteasas, las cuales son responsables del procesamiento de proteínas nucleares y de citoesqueleto que llevan al desensamblaje celular (Hengartner, 2000).

Las caspasas se clasifican en iniciadoras y ejecutoras según la participación temporal que tengan en el proceso de muerte. Las caspasas con grandes prodominios como la -2, -8 y -9, funcionan como iniciadoras, al principio de la cadena proteolítica,

mientras las que presentan un prodominio pequeño como la -3, -6 y -7, funcionan como efectoras, actuando directamente sobre distintos sustratos celulares (Thornberry y Lazebnik, 1998).

Además, existe una gran diversidad de moléculas reguladoras, tanto antiapoptóticas (i.e. Bcl-2, Bcl-x_L, proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs), etc.) como proapoptóticas (i.e., Bax, Bid, AIF, SMAC/DIABLO, etc.), las cuales, según sea el balance entre ellas, van a determinar si la célula vive o muere por apoptosis (Hengartner, 2000, Caballero-Benítez y Moran, 2002, Danial y Korsmeyer, 2004).

En general existen dos mecanismos de inicio de la apoptosis: la vía intrínseca y la vía extrínseca (fig. 2). La primera involucra la liberación de moléculas proapoptóticas de la mitocondria, como Apaf-1 (factor apoptótico activador de proteasas) y el citocromo c, los cuales a su vez activan a la pro caspasa-9, la cual es iniciadora, por medio de la formación del apoptosoma. Una vez activa, la caspasa-9 activará a una caspasa efectora, como puede ser la caspasa-3 o la -7, para continuar así con la cascada proteolítica.

La vía extrínseca está mediada por la activación de receptores localizados en la membrana plasmática. El ejemplo mejor caracterizado es la unión de Fas a su ligando (FasL trimérico), lo que resulta en el reclutamiento de la pro caspasa-8 por medio de la proteína adaptadora FADD. Lo anterior provoca que la caspasa-8 se auto active por proximidad, activando después a la caspasa-3. La vía extrínseca también puede utilizar a la caspasa-10 como iniciadora. Además, ambas vías interactúan cuando Bid es procesado por la caspasa-8 para formar así Bid_t, un miembro proapoptótico de la familia Bcl-2. (Hengartner, 2000; Danial y Korsmeyer, 2004).

Existe una tercera vía de activación de las caspasas, aunque menos caracterizada que las dos anteriores. Esta se origina en el retículo endoplásmico (RE) después de una situación de estrés, lo cual conlleva a la activación de la caspasa-12 y sucesivamente la de la caspasa-3, a través de la activación de la caspasa-9 (Morishima *et al.*, 2002).

Aún cuando las caspasas ya estén activas, la apoptosis puede ser detenida, ya que las IAP, como la XIAP, se unen a la caspasa ya activa, impidiendo así que ésta proteolice sus sustratos. Además, las IAP tienen función de E3 ligasas, mediando así, la degradación

de las caspasas (Deveraux *et al.*, 1997). A su vez, el bloqueo de las caspasas por las IAPs puede ser inhibido por SMAC/DIABLO y Omi/Htra2 (Danial y Korsmeyer, 2004).

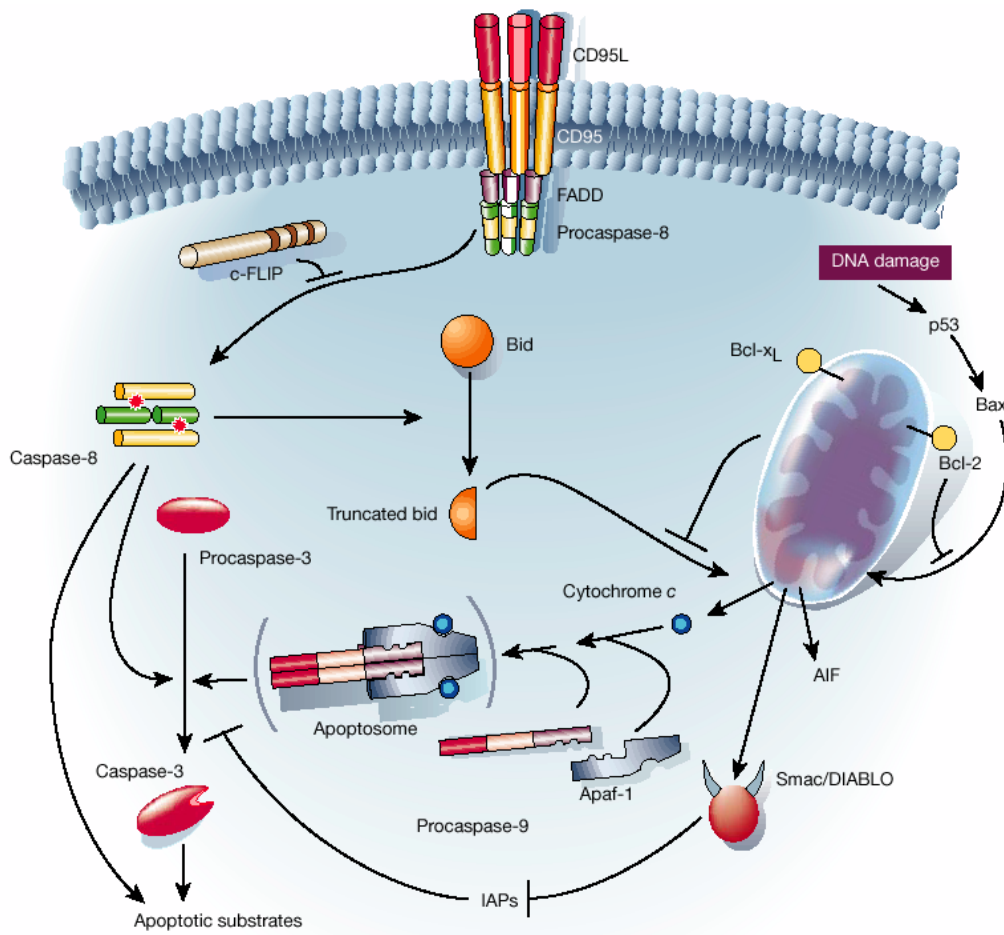


Figura 2. Vías extrínseca e intrínseca de la apoptosis. Las caspasas-8 y 10 se activan en respuesta a la unión de un ligando a su receptor de muerte (TNFR, Fas (CD95) o DR 3, 4, 5 y 6) en una vía conocida como la vía extrínseca de la apoptosis. La oligomerización a través de proteínas adaptadoras en 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 Hertngarner, 2000).

Existe una serie de evidencias que muestran la participación de vías de señalización intracelular en la apoptosis. En particular, se sabe que las MAPK (*Mitogen-activated protein kinases*, proteínas cinasas activadas por mitógenos), específicamente JNK y p38, juegan un

papel importante en algunos modelos de apoptosis. La activación de las MAPK se da por una cascada de fosforilaciones duales subsecuentes, donde las MAPKKK o MEKK (*MAP Kinases kinases kinases*: MAP cinasas cinasas cinasas) reguladas por reclutamiento a la membrana, oligomerización y fosforilación, fosforilan alguna MAPKK o MEK (*MAP Kinase kinase*: MAP cinasa cinasa) en residuos de serina (Ser) y treonina (Thr). Estas a su vez fosforilan a las MAPKs en residuos de Thr y tirosina (Tyr) (Chang *et al.*, 2001; Pimienta *et al.*, 2007), las cuales finalmente fosforilan diversos sustratos como proteínas cinasas, fosfolipasas, factores de transcripción y proteínas del citoesqueleto (Johnson *et al.*, 2002). Uno de los principales sustratos de JNK es el factor de transcripción c-Jun, el cual es esencial para la muerte neuronal (Ham *et al.*, 1995). La p38 también activa diversos sustratos importantes en la muerte, entre los que se incluyen factores de transcripción como ATF2, CREB y p53 (Raman *et al.*, 2007; Krishna *et al.*, 2008).

Finalmente, además de la apoptosis, existen otros tipos de muerte celular programada como la autofagia y la muerte citoplasmática. Aunque estos tipos de muerte se han observado en distintas preparaciones bajo distintas condiciones experimentales, tanto sus características como sus vías de señalización no aún están bien caracterizadas (Bredesen *et al.*, 2006). A diferencia de la apoptosis y los demás tipos de muerte celular programada, la necrosis es un proceso de degeneración celular pasiva, donde la integridad tanto de la membrana plasmática como la interna se pierde, vaciando así el contenido citoplasmático y de los organelos al medio extracelular, lo cual genera un proceso inflamatorio en el área afectada (Hengartner, 2000).

1.2 Apoptosis en el sistema nervioso

La apoptosis es el tipo de muerte celular programada responsable de la eliminación fisiológica de muchas poblaciones celulares durante el desarrollo. Un ejemplo de esto es lo que ocurre en el sistema nervioso central donde se ha estimado que más del 50% de las neuronas mueren durante el desarrollo embrionario y/o la maduración postnatal (Burek y Oppenheim 1996).

El papel que desempeña la apoptosis durante el desarrollo incluye la formación

óptima de conexiones sinápticas y la eliminación de neuronas innecesarias (Nijhawan *et al.*, 2000). Que una neurona muera o no durante el desarrollo depende principalmente del microambiente que la rodea. Si una neurona logra hacer una conexión exitosa con su célula blanco, ésta le aportará factores tróficos que promoverán su sobrevivencia (Sastry y Rao, 2000), en caso contrario, la neurona morirá. Lo anterior sugiere que al principio del desarrollo hay una sobrepoblación de neuronas y que éstas compiten por los factores tróficos.

El proceso apoptótico también se ha descrito en condiciones patológicas del adulto, ya que se ha sugerido su participación en enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer, de Parkinson y de Huntington; entre otras (Nijhawan *et al.*, 2000). Aunque la muerte neuronal es casi siempre un evento tardío en las distintas enfermedades neurodegenerativas, ya que normalmente es precedida por la disfunción neuronal, la pérdida de las sinapsis ha resultado en una disminución en la neurodegeneración, al menos en ciertos modelos (Bredensen *et al.*, 2006).

Existen evidencias directas de la activación de caspasas durante la progresión de algunas enfermedades neurodegenerativas, entre éstas está el hecho de que el uso de inhibidores de las caspasas previene de la neurodegeneración en algunos modelos animales (Friedlander *et al.*, 1997; Ona *et al.*, 1999). Otra evidencia, es la identificación, por medio de anticuerpos, de algunos sustratos de las caspasas ya procesados, como lo son las proteínas de citoesqueleto. Esto se ha utilizado en la identificación de estas proteínas fragmentadas tanto en los somas como en los procesos de neuronas que están degenerando, en un modelo de la enfermedad de Alzheimer. (Yang *et al.*, 1998).

También se ha observado que la sobreexpresión de Bcl-2, un componente antiapoptótico de la vía, protege a las neuronas de la muerte apoptótica inducida por peróxido de hidrógeno (Kane *et al.*, 1993), y también se ha reportado que incrementa la expectativa de vida y retrasa la aparición de síntomas en un modelo de ratones transgénicos de Esclerosis Lateral Amiotrófica (ALS) (Kostic *et al.*, 1997). Por otro lado, la minociclina, un inhibidor de la liberación mitocondrial del citocromo c, tiene un efecto neuroprotector en modelos animales de distintas enfermedades neurodegenerativas, como

la de Huntington y la de Parkinson, así como la ALS (Friedlander, 2003).

De lo anterior, se puede deducir que la apoptosis en el sistema nervioso juega un papel muy importante tanto en su fisiología normal, durante del desarrollo, como en sus diferentes patologías, sobre todo en el caso de las enfermedades neurodegenerativas, por lo que resulta indispensable comprender a fondo sus mecanismos.

1.3 Apoptosis y estrés oxidante

El estrés oxidante se ha definido como la pérdida del balance que existe entre los agentes pro oxidantes y antioxidantes de una célula, provocando así un daño por la acumulación de especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*, ROS), que incluye el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo (OH^\cdot), el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peroxinitrito ($ONOO^-$) y el oxígeno en singulete, entre otras (Tabla 1) (Sies 1985; Halliwell, *et al.*, 2006).

Tabla 1. Especies Reactivas de Oxígeno (ERO)

<i>Radicales libres</i>	<i>No radicales</i>
Superóxido, $O_2^{\cdot-}$	Peróxido de hidrógeno, H_2O_2
Hidroxilo, OH^\cdot	Acido hipocloroso, $HOCl$
Hidroperoxilo, HO_2^\cdot	Ozono, O_3
Carbonato, $CO_3^{\cdot-}$	Oxígeno en singulete, $O_2^1\Delta_g$
Peroxilo, RO_2^\cdot	Peroxinitrito, $ONOO^-$
Dióxido de carbono, $CO_2^{\cdot-}$	Peroxinitrato, O_2NOO^-
Oxígeno en singulete, $O_2^1\Sigma_g^+$	Acido peroxinitroso, $ONOOH$

Tabla 1: Las ERO incluyen a los radicales libres (especies de oxígeno que tienen desapareado uno o más electrones) y no radicales, que son altamente reactivas. Modificado de Halliwell, *et al.*, 2006.

El estado redox de una célula está mantenido en parte por la participación de una gran variedad de agentes antioxidantes endógenos, tanto enzimáticos como no enzimáticos. Entre los antioxidantes no enzimáticos se encuentran los agentes hidrofílicos como el glutatión (GSH), ácido úrico, ascorbato, etc., y los agentes hidrofóbicos como el α -tocoferol, ubiquinol, β -caroteno, etc. Entre los antioxidantes enzimáticos se encuentran las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT), las cuales cooperativamente degradan el anión superóxido convirtiéndolo en agua.

Las ROS fueron consideradas por mucho tiempo instrumentos de defensa y agentes dañinos que al acumularse producían alteraciones celulares y podrían además contribuir al envejecimiento celular; sin embargo, evidencias recientes apuntan a que éstas tienen además papeles específicos en la fisiología normal de las células.

Tradicionalmente se había propuesto que el estrés oxidante se asocia exclusivamente con la muerte necrótica, sin embargo, ahora se sabe que puede estar involucrado tanto en la muerte apoptótica como en la necrótica, lo cual podría depender del estímulo utilizado, así como el tiempo, la concentración y/o el tipo de ROS (Higuchi, 2004). Las ROS pueden actuar dañando directamente a los componentes esenciales para mantener la integridad celular y la homeostasis como son los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos, o como también se ha descrito, pueden inducir la expresión de genes que conllevan a la muerte de la célula (Brandes *et al.*, 2003; Stadman *et al.*, 2003).

Asimismo, se ha sugerido recientemente que la generación de ROS, constituye un estímulo tanto inductor como ejecutor e incluso regulador de la muerte apoptótica actuando como señales tempranas, esto apoyado por las evidencias que muestran que los antioxidantes pueden prevenir la muerte celular (Valencia y Morán 2001, Valencia y Morán 2004). En este sentido, se sabe que el peróxido de hidrógeno participa en la neurotoxicidad inducida por glutamato (See *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2005). El anión superóxido puede ser el responsable de la muerte apoptótica inducida por privación de factores tróficos en neuronas simpáticas (Satoh *et al.*, 1998), así como la muerte en neuronas de hipocampo incubadas con xantina oxidasa (Guo *et al.*, 1999). El oxígeno en singulete se ha involucrado en la muerte neuronal vía la activación de caspasa-3 (Valencia y Moran, 2004) y también en la apoptosis de células no neuronales, mediada por Bid y algunos miembros de la familia de las MAPK (Zhuang, *et al.*, 1998), así como por PKC (Zhuang, *et al.*, 2001).

Además, se ha propuesto que cuando se induce estrés oxidante, ASK1 se disocia de la tioredoxina (Trx), permitiendo así su desfosforilación en Ser-967 y su subsecuente activación (Ichijo *et al.*, 1997). Una vez activa la vía de ASK1 se promueve la muerte apoptótica dependiente JNK y p38 (Goldman *et al.*, 2004).

Por otro lado, estudios recientes mostraron que los canales aniónicos regulados por volumen (VRAC) y activados durante la apoptosis (Okada *et al.*, 2001), pueden ser regulados por ROS, particularmente por H₂O₂ (Shimizu *et al.*, 2004; Varela *et al.*, 2004).

En el caso del sistema nervioso existen evidencias de estos episodios oxidantes tanto en condiciones patológicas (enfermedades de Alzheimer y Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, síndrome de Down, entre otras) como fisiológicas, incluyendo el desarrollo (Halliwell, 1992; Nijhawan *et al.*, 2000; Valencia y Morán, 2001).

Todos los organismos producen ROS como subproducto del metabolismo aeróbico normal, particularmente durante la respiración mitocondrial. Existen otras fuentes de ROS como la xantina oxidasa, citocromo P450 y particularmente la NOX (Sauer *et al.*, 2001) cuya función exclusiva es producir anión superóxido.

1.4 NADPH oxidasa

La NADPH oxidasa (NOX) es una enzima que transfiere electrones del NADPH al oxígeno molecular produciendo anión superóxido, y se describió originalmente en neutrófilos (Babior *et al.*, 2002) donde es una fuente importante de anión superóxido durante la “descarga oxidativa” en respuesta de mediadores inflamatorios o microorganismos. Cuando hay defectos en la función de la NOX se puede generar una inmunodeficiencia muy severa, como los individuos que sufren la enfermedad de Granulomatosis Crónica (CGD), que al tener mutaciones deletéreas en uno o más componentes del complejo, son muy susceptibles a infecciones por hongos y/o bacterias (Heyworth *et al.*, 2003).

Este complejo, está compuesto por 2 subunidades transmembranales (gp91phox o NOX2 y p22phox), que juntas se les denomina citocromo b₅₅₈, y por 3 reguladores citosólicos (p67phox, p47phox y p40phox). Se sabe que además requiere de una GTPasa, Rac2, para su activación (Clark *et al.*, 2004, Bedard y Krause 2007).

NOX2 (gp91phox, por su peso molecular de 91KDa) es la subunidad catalítica de la enzima, tiene seis α -hélices transmembranales donde se encuentran cuatro residuos de histidina que sirven para la unión de dos grupos hemo, además de un dominio citosólico

donde se encuentran los sitios de unión a NADPH y FAD (Lambeth, 2004; Nauseef, 2008). El transporte de electrones va del NADPH al FAD, y de éste al grupo hemo en la parte más interna de la membrana y posteriormente al grupo hemo de la más externa, para finalmente reducir al oxígeno molecular formando así anión superóxido (Cross y Segal, 2004).

El otro componente del citocromo b_{558} , p22phox (peso molecular de 22kDa), no tiene actividad enzimática; sin embargo, la estabilidad tanto de éste como de la NOX2, requiere la formación de heterodímeros ya que se ha observado que la ausencia de cualquiera de estas dos proteínas resulta en la ausencia de ambas (Nauseef, 2008).

Para la activación de la enzima, se requiere que el complejo citoplásmico se una al citocromo b_{558} . Esta interacción se previene en el estado de reposo de la enzima gracias a la conformación auto-inhibidora de p47phox, la cual requiere ser fosforilada para que puedan ser expuestos los dominios de interacción de p47phox con NOX2 (SH3) y p67phox, así como con fosfolípidos de la membrana (dominio PX) (Nauseef, 2004). Por lo anterior, ésta se trasloca a la membrana formando así el complejo activo con NOX2 (gp91phox), la subunidad catalítica (Groemping *et al.*, 2003; Nauseef, 2008).

Se cree que esta fosforilación la lleva a cabo principalmente la proteína cinasa C (PKC), por lo que se le involucra en la regulación de la actividad de NOX a través de las isoformas β , δ y ζ (Fontayne *et al.*, 2002). Sin embargo, se ha descrito que otras cinasas también pueden fosforilar a p47phox, entre ellas se encuentran la MAPK p38, PKB/akt, PAK y la cinasa de caseína 2 (Clark *et al.*, 2004; Groemping y Rittinger, 2005).

Por otro lado, p67phox, a diferencia de p47phox que no tiene ninguna actividad enzimática por sí misma, regula el paso de electrones del NADPH al FAD, siendo así un elemento esencial para la activación del complejo enzimático (Nissimoto *et al.*, 1999), para ello, tiene que ser traslocado a la membrana formando el complejo con p47phox y p40phox.

Rac2 es el tercer componente citosólico que es esencial para la actividad del complejo. En estado inactivo Rac-GDP se encuentra en el citosol unido a RhoGDI. Para activarse necesita que RhoGDI se fosforile liberando así a Rac-GTP (DerMardirossian *et al.*,

2004). La traslocación de Rac-GTP a la membrana es independiente de la traslocación del complejo p47phox-p67phox-p40phox. Una vez en la membrana, Rac2 contribuye a la actividad de la oxidasa interactuando con p67phox, NOX2 o ambos (Sarfstein, *et al.*, 2004, Nauseef, 2008).

1.5 Familia NOX

Recientemente se han identificado proteínas homólogas a NOX2, denominadas NOX1 a NOX5, en una gran variedad de tipos celulares, así como otras dos proteínas DUOX1 y DUOX2, las cuales además tienen un dominio homólogo a peroxidasa (Cheng *et al.*, 2001; Lambeth, 2004; Bedard y Krause 2007). Todas estas proteínas son producto de diferentes genes, como se especificará posteriormente. Estos homólogos contienen un dominio de flavocitocromo en el extremo C-terminal, el cual tiene sitios de unión a FAD y NADPH. Además, en el extremo N-terminal tienen seis α -hélices transmembranales las cuales contienen dos histidinas como sitios de unión a grupos hemo. Entre éstas, NOX1, NOX3 y NOX4 son las más parecidas a NOX2. NOX5, DUOX1 y 2, además tienen un dominio de unión a Ca^{2+} en el extremo N-terminal, el cual regula la actividad de la oxidasa (Lambeth, 2004, Nauseef, 2008). Aunque NOX2 requiere de p22phox, no todos los miembros de la familia NOX forman heterodímeros con éste, sin embargo, p22phox sí es requerido para la estabilización de NOX1, NOX3 y NOX4.

Se han encontrado homólogos para las subunidades citosólicas p47phox y p67phox, NOXO1 (organizador de NOX) y NOXA1 (activador de NOX) respectivamente. Se sabe que éstos participan en la activación de NOX1 y NOX3. Hasta el momento, no se han encontrado homólogos para p22phox ni para p40phox (Lambeth *et al.*, 2007).

NOX1 fue el primer homólogo de NOX2 (gp91-phox) que se identificó. Originalmente fue nombrado mox1 y descrito como una oxidasa mitogénica. Se expresa de manera constitutiva principalmente en el epitelio del colon, aunque también se ha encontrado en células vasculares de músculo liso, células endoteliales, útero, placenta, entre otras, así como en varias líneas celulares incluyendo Caco-2, DLD-1 y HT-29. Además, también se sabe que su expresión puede ser inducida por diversos estímulos

incluyendo PDGF, prostaglandinas y angiotensina II, así como la expresión de Ras entre otros (Bedard y Krause, 2007). Tiene un papel importante en el crecimiento y transformación de las células, además de la angiogénesis, por lo que se le ha relacionado con crecimiento tumoral y cáncer (Arbiser *et al.*, 2002). También se le ha relacionado en la regulación de la presión arterial. Tiene aproximadamente un 60% de identidad con NOX2 y al igual que ésta, se encuentra en el cromosoma X y la proteína es de alrededor de 55-60 kDa.

NOX3 parece tener una distribución más restringida, aunque se ha encontrado en distintos tejidos fetales como riñón y bazo, en el adulto parece encontrarse únicamente en el oído interno, en particular se ha detectado en las otoconias donde se sabe que es esencial en la morfogénesis ya que ratones deficientes en esta NOX presentan disfunción vestibular, caracterizada por trastornos motores, de coordinación, orientación y comportamiento (Paffenholz *et al.*, 2004). Se encuentra en el humano en el cromosoma 6 y tiene una identidad de aproximadamente 56% con NOX2.

NOX4, originalmente llamada Renox (por RENal OXidasa) se expresa mayoritariamente en el riñón, células de músculo liso, células endoteliales, entre otras. En reportes previos, se ha sugerido que podría tener la función de detectar los niveles de oxígeno en el riñón así como de regular la síntesis de la eritropoietina (Geiszt *et al.*, 2000; Shiose *et al.*, 2001), además de ser la responsable de la producción de ROS en osteoclastos, participando en la reabsorción ósea. (Yang *et al.*, 2001). Estudios recientes también involucran a NOX4 en la producción de ROS mediada por la vía de la insulina (Mahadev *et al.*, 2004). Se encuentra en el cromosoma 11 y tiene ~39% de identidad con NOX2, por lo que es la evolutivamente más distante. La proteína es de 65kDa aproximadamente (Bedard y Krause, 2007).

NOX5 se encuentra en el cromosoma 15 del humano y su proteína es de alrededor de 85kDa, el dominio homólogo a NOX2 tiene ~27% de identidad. Se expresa principalmente en los testículos, bazo, ganglios linfáticos, páncreas, placenta, entre otros. Se ha sugerido que NOX5 puede tener un papel en la proliferación celular de la línea de cáncer de próstata, DU 145 (Brar *et al.*, 2003), así como en la capacitación de los

espermatozoides o en la reacción acrosomal (Baker y Aitken, 2004), ya que se ha encontrado mRNA en espermatozoides en paquíteno (Banfi *et al.*, 2001). También se ha sugerido que NOX5 no se expresa en murinos (Bedard y Krause, 2007).

DUOX1 y DUOX2, originalmente llamadas oxidasas de la tiroides, donde se expresan principalmente y se sabe que son la fuente de peróxido de hidrógeno, siendo DUOX2 esencial para la síntesis de la tiroxina por medio de la iodación de la tiroglobulina, ya que se ha observado que mutaciones en ésta causan hipotiroidismo (Moreno *et al.*, 2002). También se ha detectado DUOX1 en la glándula tiroides, pero se desconoce qué función específica tiene. Por otro lado, también se les ha descrito en el epitelio aéreo del pulmón y en la próstata, así como a lo largo del tracto gastrointestinal. Se cree que ambas enzimas juegan un papel importante en la modificación de proteínas de matriz extracelular así como de otro tipo de moléculas por medio de la producción de ROS (Edens *et al.*, 2001; Lambeth, 2004). Ambos genes se encuentran en el cromosoma 15 y ambas proteínas son de alrededor de 190kDa.

Cada uno de los diferentes homólogos de NOX se ha asociado a distintas funciones como parte de un proceso de señalización intracelular según el tipo celular en el que se expresen, además del contexto en el que se encuentren. Por ejemplo, existe evidencia de la participación de las NOX en la inhibición de fosfatasa así como la activación de cinasas (como las MAPKs), además de participar en la regulación de la expresión génica, ya sea por sistemas de segundos mensajeros sensibles al estado redox de la célula o a través de factores de transcripción (como NF κ B) (Clark y Valente 2004, Bedard y Krause 2007), por lo que pueden participar en procesos celulares tan distintos como la proliferación (Mander *et al.* 2006), diferenciación y apoptosis (Nikolova *et al.* 2005, Lambeth, 2004).

1.6 NOX en el sistema nervioso

La presencia de algunos componentes de la familia NOX se ha descrito recientemente en varios tipos de células del sistema nervioso (SN) (neuronas, astrocitos y microglia) de diferentes regiones (Tammariello *et al.*, 2000; Dvorakova *et al.*, 1999);

incluyendo a las neuronas corticales (Noh y Koh, 2000; Hwang *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2002), las neuronas del hipocampo (Rowan *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2005; Tejada-Simon *et al.*, 2005; Kishida *et al.*, 2005), las neuronas granulares del cerebelo (Coyoy *et al.*, 2008, Guemez-Gamboa y Morán, 2009) y las neuronas de Purkinje del cerebelo (Mizuki *et al.*, 1998; Serrano *et al.*, 2003), sugiriendo así un papel importante de esta enzima tanto en la fisiología como en la patología del SN (Sorce y Krause, 2009).

Aunque durante algún tiempo se pensó que las neuronas no expresaban ninguna NOX, ahora se sabe que expresan NOX2 (mRNA y proteína; Tammariello *et al.*, 2000; Tejada-Simon *et al.*, 2005; Coyoy *et al.*, 2008), NOX4 (mRNA y proteína; Vallet *et al.*, 2005; Coyoy *et al.*, 2008) y NOX1 (mRNA; Ibi *et al.*, 2006; Coyoy *et al.*, 2008). También se sabe que NOX2 se expresa en niveles relativamente altos en la microglía, las células con función inmune en el sistema nervioso responsables de los procesos inflamatorios que se dan en el mismo, por lo que su activación también ha sido ligada a distintas patologías del SNC (Green *et al.*, 2001). Por otro lado, recientemente también se han asociado a las ROS producidas por una NOX en la proliferación de la microglía (Mander *et al.*, 2006).

Asimismo, se ha reportado que existen NOX en otras células gliales, como en los astrocitos. En este sentido, existen numerosos reportes sugiriendo que la NOX2 de estas células es la responsable de la muerte de las neuronas vecinas bajo distintas condiciones de estrés (Abramov, 2004; Abramov y Dunchen, 2005). Sin embargo no hay ningún reporte en el que se mencione la expresión de NOX en otras células gliales, como los oligodendrocitos.

En el sistema nervioso, como en el resto de los tejidos, las ROS producidas por la familia NOX sirven como moléculas de señalización y están involucradas en distintos procesos, incluyendo la muerte neuronal (Sorce y Krause 2009). Las ROS generadas por las NOX han sido ligadas a la muerte neuronal en distintos modelos, tanto en células en cultivo, como *in vivo*, en modelos de neurodegeneración, como se revisará más adelante.

Por otro lado, también se sabe que las NOX participan en la fisiología normal del sistema nervioso, ya que éstas han sido implicadas tanto en la diferenciación de las neuronas (Ibi *et al.*, 2006) como en la regulación de la señalización neuronal, ya que se

sugiere que existe una relación estrecha entre NOX2 y la señalización mediada por el receptor NMDA. Esto se ha observado en ratones deficientes en NOX2, los cuales presentan un decremento moderado de la potenciación a largo plazo (LTP) así como una disminución en su capacidad de aprendizaje (Kishida *et al.*, 2005; Kishida *et al.*, 2006). En este sentido, también se ha reportado que la estimulación de los receptores tipo NMDA lleva a una producción de ROS mediada por NOX, la cual es necesaria para la señalización de los mismos (Shelat *et al.*, 2008).

1.7 Muerte neuronal mediada por NOX

Se ha propuesto a la NOX como la posible responsable de la producción de ROS involucrada en la muerte en distintos cultivos neuronales. Por ejemplo, en la muerte de neuronas corticales inducida por BDNF (Kim *et al.*, 2002; Hwang *et al.*, 2002) y por zinc (Noh y Koh, 2000). De igual manera, se ha descrito que la NOX podría tener un papel importante en la apoptosis de células embrionarias del estriado contribuyendo, al menos en parte, a la generación de ROS. Asimismo, en un estudio reciente se sugiere que esta enzima podría ser la fuente de ROS involucrada en la muerte inducida por glutamato de las SH-SY5Y, una línea celular de neuroblastoma (Nikolova *et al.*, 2005).

Uno de los primeros reportes que sugieren el papel de NOX en la muerte apoptótica neuronal es el de Tammariello *et al.*, donde se muestra que en neuronas simpáticas la privación de NGF induce muerte debido a la producción de ROS vía una NOX. Lo anterior lo demuestra por medio de dos aproximaciones experimentales, la utilización de un inhibidor farmacológico de la enzima, el DPI y por medio de una inhibición genética de la misma, ratones deficientes en NOX2. En ambos casos se advierte una reducción significativa en el número de células apoptóticas después de la privación de NGF, con respecto al control (Tammariello *et al.*, 2000). Los ratones deficientes en NOX2 tienen una inserción del gen de la ionomicina en el exón 3 de la subunidad catalítica por lo que no producen proteína funcional, lo que mimetiza la enfermedad de granulomatosis crónica, en humanos (Pollock *et al.*, 1995).

Por otro lado, se ha sugerido la participación de la NOX en la muerte de neuronas

en isquemia, donde en modelos de rata y ratón se ha observado un incremento de NOX2 y p22phox, a nivel de mRNA (Kusaka et al., 2004; Park et al., 2004), así como una reducción en la lesión después de la isquemia en los ratones deficientes en esta enzima (Walder *et al.*, 1997). También, se ha observado que la apocinina, un inhibidor de NOX, previene de eventos apoptóticos en un modelo de isquemia/reperfusión *in vivo* (Wang *et al.*, 2006). En este sentido, nuestro grupo ha reunido suficientes evidencias experimentales que sugieren que la actividad de NOX es necesaria para la muerte apoptótica de las NGC (Coyoy et al., 2008).

Además, como se mencionó anteriormente se ha involucrado a las NOX en la muerte neuronal en distintos trastornos neurológicos. A continuación, se presenta el capítulo "Oxidative stress and apoptotic neuronal cell death: the role of the NADPH oxidase complex" publicado en el libro "New perspectives on the brain cell damage, neurodegeneration and neuroprotective strategies" Research Signpost, Kerala, India, donde se detalla la participación de las NOXs en distintos modelos experimentales, tanto *in vivo* como *in vitro*, de enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer y la de Parkinson, teniendo como causa posible la producción de ROS vía la activación de estas enzimas.

ANTECEDENTES

Las neuronas granulares de cerebelo (NGC) constituyen alrededor del 80% de esta estructura y una gran proporción es eliminada durante el desarrollo del cerebelo. Estas neuronas son generadas posnatalmente en la capa germinal externa, donde se diferencian y migran a la capa granular, en la cual reciben aferencias glutamatérgicas. Se sugiere que estas aferencias actúan como señal trófica promoviendo la diferenciación y sobrevivencia de estas neuronas.

Los cultivos primarios de NGC son un modelo adecuado para el estudio de la apoptosis en el SN. Se ha demostrado que las NGC en cultivo que no reciben estimulación despolarizante inician un proceso degenerativo a partir de los 5 DIV. Sin embargo, las NGC pueden mantenerse en cultivo si reciben estímulos capaces de producir una despolarización en la membrana neuronal, como altas concentraciones de potasio (25 mM KCl: K25) (Gallo *et al.* 1987, Morán y Patel, 1989) o en presencia de un agonista de los receptores a glutamato, el N-metil-D-aspartato (NMDA) (Morán y Patel, 1989). Estas dos condiciones inducen un incremento en la concentración de calcio intracelular, lo que ayuda a promover su sobrevivencia y diferenciación.

Se ha sugerido que esta dependencia de despolarización podría reflejar la influencia trófica recibida por las NGC a través de una población glutamatérgica de las fibras musgosas durante el desarrollo posnatal del cerebelo (Balázs *et al.*, 1988). Cuando estas células se transfieren, después de 7-8 días *in vitro* (DIV), a un medio idéntico con KCl 5 mM (K5), mueren con características apoptóticas, incluyendo la activación de caspasas, translocación de fosfatidilserina, condensación nuclear y liberación de citocromo c (Moran, *et al.*, 1999, Valencia y Morán, 2001, Atlante, *et al.*, 2003, Caballero-Benítez y Morán, 2003). Existen otras condiciones experimentales muy utilizadas para inducir apoptosis en este modelo como la ST, un inhibidor general de proteínas cinasas (Taylor *et al.*, 1997; Caballero-Benítez y Morán, 2003).

Aunque ambos estímulos producen muerte apoptótica en NGC, los mecanismos moleculares parecen ser diferentes: por ejemplo, el K5 involucra un cambio en los niveles

de calcio intracelular (Morán *et al.*, 1999; Valencia y Morán, 2001), mientras que la acción de la ST es independiente de calcio y activa un grupo distinto de caspasas (Caballero-Benitez y Morán, 2003).

Se ha demostrado en algunas preparaciones en cultivo que cuando las neuronas se privan de un estímulo trófico y se induce muerte apoptótica, se genera una condición prooxidante. Si esta condición se inhibe con antioxidantes, la muerte se evita total o parcialmente, sugiriendo la participación de las ROS en este proceso (Atlante *et al.*, 1998; Valencia y Morán, 2001). Además, se ha propuesto al anión superóxido como una de las ROS involucradas en la muerte de las NGC (Atlante *et al.*, 1998; Valencia y Morán, 2004).

Por otro lado, se tienen evidencias en diferentes cultivos neuronales que una fracción considerable de ROS formada durante la muerte proviene de una NOX y que esta enzima participaría activamente en una fase temprana de la muerte neuronal (Noh y Koh, 2000; Tammariello *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2002; Hwang *et al.*, 2002).

Estudios previos de nuestro laboratorio han sugerido que una NOX podría participar en la muerte apoptótica de las NGC. Así, hemos observado que la presencia de inhibidores de esta enzima, como el difeniliodonio (DPI) o el AEBSF, reduce significativamente tanto la actividad de la caspasa-3 como la muerte apoptótica inducida por K5. Estos inhibidores también reducen la producción de ROS asociada a este estímulo apoptótico (Coyoy *et al.*, 2008).

Por otro lado, se ha reportado que al inhibir el decremento del volumen celular, AVD, en la fase inicial de la apoptosis, se disminuye la muerte (Benson *et al.*, 1996; Bortner y Cidlowski, 1998). Esta modificación del volumen celular durante la muerte apoptótica parece estar mediada por la extrusión de osmolitos como el K^+ y Cl^- (Bortner *et al.*, 1997; Morán *et al.*, 2000). En este sentido, se ha demostrado que bloqueadores de los flujos de Cl^- y K^+ inhiben de manera significativa la muerte de NGC inducida por K5 y ST, sugiriendo la participación de los flujos de K^+ y Cl^- en la apoptosis y la regulación de volumen de las NGC (Franco-Cea *et al.*, 2004; Hernández-Enríquez, 2010). Recientemente se ha propuesto que podría existir una relación entre el estrés oxidante generado por la

activación de una NOX y los flujos iónicos de Cl⁻ asociados con el AVD (Shimizu *et al.*, 2004; Varela *et al.*, 2004; Reinehr y Häussinger, 2007; Becker *et al.*, 2007).

Como se mencionó anteriormente, p38 es una de las MAPKs relacionadas con el proceso de apoptosis, particularmente en NGC (Ramiro-Cortés y Morán, 2009). Uno de los componentes principales de la activación de esta vía es ASK1, la cual activa directamente a MAPKK responsable de la activación de p38, promoviendo su actividad proapoptótica en respuesta a estrés oxidante (Matzukawa *et al.*, 2004), por lo que podría existir una relación entre las ROS generadas por la actividad de NOX y la activación de la vía de p38. En sentido contrario, recientemente se reportó que p38 induce la activación de una NOX en astrocitos, al ser tratados con lipopolisacáridos (Yoo *et al.*, 2008). Por lo anterior, sería importante determinar si la NOX se activa antes o después de la activación de las MAPKs, específicamente de p38.

A partir de estos antecedentes surgen varias preguntas. Primero, cuál es el homólogo de NOX involucrado en la muerte apoptótica de las NGC inducida por K5 y ST, posteriormente si existe una relación directa entre las ROS generadas por la actividad de NOX con los flujos iónicos y el AVD, y la activación de MAPKs observada en esta preparación. Asimismo, resultaría interesante conocer la secuencia y el curso temporal de estos eventos, lo cual contribuiría de forma importante a conocer con más detalle los mecanismos involucrados en este tipo de muerte.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Conocer la participación de los distintos homólogos de NOX durante la muerte apoptótica de NGC inducida por K5 y ST.

Objetivos particulares

- Caracterizar la expresión de los homólogos de NOX en las NGC.
- Definir el papel de la activación de NOX en la producción de ROS indispensable para la muerte apoptótica inducida por K5 y ST.
- Determinar la participación de las NOX2 en la muerte apoptótica de las NGC inducida por K5 y ST.
- Determinar la participación de otros homólogos de NOX, distintos a NOX2, en la muerte apoptótica de las NGC inducida por K5 y ST.
- Establecer la relación entre los ROS producidos por la activación de NOX y la disminución del volumen inducida por K5 y ST.
- Evaluar la correlación temporal entre la activación de NOX y los flujos iónicos.
- Determinar si el estrés oxidante y la activación de NOX se presenta antes o después de la activación de la vía de las MAPK.

HIPÓTESIS

Un homólogo particular de NOX constituye la fuente de ROS indispensables para la inducción de distintos procesos como AVD y activación de la vía MAPK que conducen a la muerte apoptótica de las NGC inducida por K5 y ST.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las NGC mueren apoptóticamente en respuesta a la privación de potasio (K5) y la aplicación de ST. Durante la apoptosis inducida por estos estímulos, ocurre un incremento en los niveles basales de ROS en tiempos tempranos, previos a la activación de la maquinaria apoptótica. Al ser inhibida la generación de ROS con antioxidantes, se previene la muerte inducida por ambos estímulos. Sin embargo, tanto la fuente de ROS como el mecanismo por el cual éstos median la apoptosis inducida por K5 y ST aún no está bien definido.

Existen suficientes evidencias de que la actividad de NOX es indispensable para la muerte apoptótica de las NGC. Además, sabemos que la familia NOX cuenta con varios homólogos. Así, para poder entender de una forma más detallada los mecanismos de muerte apoptótica resulta elemental identificar el o los homólogos de NOX responsables de la producción de ROS durante la muerte apoptótica de las NGC.

Por otro lado, recientemente se ha reportado que durante la apoptosis ocurre un encogimiento celular llamado AVD el cual se ve reducido por el bloqueo de los flujos de K^+ y Cl^- . En este sentido, se ha involucrado a las ROS en la activación de flujos iónicos bajo ciertas condiciones experimentales y se ha propuesto que este estrés oxidante podría estar generado por una NOX. Así, podría existir una relación entre la actividad de la enzima y los flujos iónicos asociados al AVD, que finalmente desencadene la muerte apoptótica de estas neuronas.

Por lo tanto, en este estudio nos preguntamos, por una parte, qué homólogo de NOX participa en la muerte apoptótica de estas células inducida tanto por K5 como por ST, y por otra que mecanismo podría regular vía la producción de ROS. En este sentido, por los antecedentes previamente mencionados, se evaluará si las ROS producidas por la actividad de una o más NOX regulan el decremento en el volumen, uno de los mecanismos de muerte apoptótica de estas células. De ser así, es posible que las ROS producidas por la activación de una NOX puedan estar regulando los flujos iónicos responsables del AVD y por lo tanto la muerte de las NGC inducida por K5 y ST.

Finalmente, como se mencionó las MAPK, específicamente p38 participan en la muerte apoptótica de estas células y además la activación de esta vía parece ser sensible a ROS. Así, un posible mecanismo involucrado en la apoptosis de estas neuronas podría consistir en una interacción entre las ROS producidas por una NOX y algún componente de la vía de señalización de MAPK.

El conocer e integrar esta información permitirá entender de forma más precisa los mecanismos moleculares involucrados en este tipo de muerte.

mecanismos de muerte apoptótica de estas células. De ser así, es posible que las ROS producidas por la activación de una NOX puedan estar regulando los flujos iónicos responsables del AVD y por lo tanto la muerte de las NGC inducida por K5 y ST.

Finalmente, como se mencionó las MAPK, específicamente p38 participan en la muerte apoptótica de estas células y además la activación de esta vía parece ser sensible a ROS. Así, un posible mecanismo involucrado en la apoptosis de estas neuronas podría consistir en una interacción entre las ROS producidas por una NOX y algún componente de la vía de señalización de MAPK.

El conocer e integrar esta información permitirá entender de forma más precisa los mecanismos moleculares involucrados en este tipo de muerte.

HIPÓTESIS

Un homólogo particular de NOX constituye la fuente de ROS indispensables para la inducción de distintos procesos como AVD y activación de la vía MAPK que conducen a la muerte apoptótica de las NGC inducida por K5 y ST.

OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

- Conocer la participación de los distintos homólogos de NOX durante la muerte apoptótica de NGC inducida por K5 y ST.

5.2. Objetivos particulares

- Caracterizar la expresión de los homólogos de NOX en las NGC.
- Definir el papel de la activación de NOX en la producción de ROS indispensable para la muerte apoptótica inducida por K5 y ST.
- Determinar la participación de las NOX2 en la muerte apoptótica de las NGC inducida por K5 y ST.
- Determinar la participación de otros homólogos de NOX, distintos a NOX2, en la muerte apoptótica de las NGC inducida por K5 y ST.
- Establecer la relación entre los ROS producidos por la activación de NOX y la disminución del volumen inducida por K5 y ST.
- Evaluar la correlación temporal entre la activación de NOX y los flujos iónicos.
- Determinar si el estrés oxidante y la activación de NOX se presenta antes o después de la activación de la vía de las MAPK.

METODOLOGÍA

En esta sección se describirán de manera muy general los protocolos y técnicas utilizadas en este trabajo, ya que una descripción detallada se presenta en cada uno de los artículos incluidos en la sección de resultados y los apéndices.

Materiales

El suero fetal bovino y la penicilina/estreptomicina fueron adquiridos de GIBCO (Grand Island, NY, USA). Hoechst 33258 y calceína-AM fueron de Invitrogen, Molecular Probes (Eugene, OR, USA). Poli-L-lisina (peso molecular > 300,000), tripsina, DNAsa, ioduro de propidio, citocina-D-arabino-furoanosida, dihidroetidina, xantina, xantina oxidasa, DPI, AEBSEF, NADPH y DTT fueron de Sigma (St Louis, MO, USA). Reactivos usados para los geles de poliacrilamida (PAGE) fueron de Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Los anticuerpos contra gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y las membranas para electroforesis (PVDF) fueron de Millipore (Bredford, MA, USA). Los anticuerpos caspase-3 fueron de Santa Cruz Company (Santa Cruz, CA, USA). La apocinina y el MnTMPyP fueron de Calbiochem. Los sustratos de caspasa 3 fueron de Peptides Intl. (Louisville, KY, USA). Todos los demás reactivos fueron de grado puro disponibles en fuentes regulares de comercio.

Animales

Los ratones deficientes en NOX2 y NOX3 se obtuvieron de Jakson Laboratories y los ratones control (cepa C57Bl6) se compraron en Harlam. Los ratones deficientes en NOX1 y en NOX4 se utilizaron únicamente durante la estancia en el laboratorio del Dr. Krause, Universidad de Ginebra, Suiza.

Cultivos de Neuronas Granulares de Cerebelo

Los cultivos primarios de NGC se obtuvieron de acuerdo a lo descrito originalmente por Morán y Patel (1989). Brevemente, se obtiene una suspensión de neuronas disociadas de cerebelo de ratones C57BL6 deficientes en NOX y silvestres de 6-

7 días postnatales. Las neuronas se siembran a una densidad de 2.65×10^5 células/cm² en platos de cultivo tratados con Poli-L-lisina (5 µg/ml). El medio de cultivo es basal Eagle suplementado con 10% de suero fetal bovino, glutamina 2 mM, KCl 25 mM, penicilina 50 U/ml y estreptomicina 50 µg/ml, este medio es referido en el texto como K25. Los cultivos se incubaron a 37°C en un atmósfera húmeda con CO₂ al 5% y aire al 95% por un periodo de 7-8 días *in vitro* (DIV). Para prevenir el crecimiento de células no neurales se adiciona citosina arabinosa (10 µM) 24h después de poner el cultivo. En algunos casos, se utilizaron ratas Wistar de 7 días posnatales y se hizo el cultivo siguiendo este mismo protocolo.

Inducción de muerte neuronal

Las NGC se sembraron en un medio K25 durante 7 DIV, después de este tiempo las células fueron transferidas a un medio igual al K25, excepto que este medio carece de suero y la concentración de KCl es de 5 mM, este medio es referido en el texto como K5. También se utilizó ST como inductor de apoptosis, la cual es referida en el texto como ST. En ambos estímulos se induce la muerte de NGC a las 24 h después del cambio de medio (Valencia y Morán, 2001, Caballero-Benítez y Morán, 2003). También se indujo la muerte con el estímulo prooxidante de xantina/xantina oxidasa (XXO), donde las células mueren apoptóticamente después de 6 h. (Valencia y Morán, 2004). Además, se utilizaron al mismo tiempo que los estímulos apoptóticos, los inhibidores de NOX, DPI (520 nM), apocinina (APO) (3 mM) y AEBSF (80 µM), así como los antioxidantes camferol (Kmp) (20 µM) y MnTPyP (Mn) (50 µM). En algunos casos también fueron utilizados bloqueadores de canales iónicos, tanto para canales de K⁺ (Cs⁺ 10 mM, TEA⁺ 10 mM, 4AP 5 mM), como para los de Cl⁻ (DIDS 500 µM).

Viabilidad celular

La viabilidad celular se determinó por el ensayo de calceína/ioduro de propidio. La calceína-AM es una molécula permeable y sólo en células viables es fragmentada por esterasas para formar calceína, un compuesto fluorescente, que es retenido en el

citoplasma de las células viables. Esto se complementa con la tinción con ioduro de propidio (IP) para identificar células muertas.

Actividad de caspasas

La actividad de caspasa 3 se determinó por el uso de sustrato fluorogénico acoplado a metilcuomarina (Ac-DEVD-MCA), la actividad se midió en un espectrofluorómetro obteniendo así la producción de fluorescencia generada por la fragmentación del sustrato, los resultados son expresados como intensidad de fluorescencia/hora/mg proteína.

Detección de especies reactivas de oxígeno

Se detectó por medio del ensayo con dihidroetidina (DHE). Las NGC de 7-8 DIV se incubaron con 3.2 mM de DHE durante 20 min en el medio de cultivo a 37°C. Después de remover el medio se lavaron con PBS y se fijaron con formaldehído (4%) durante 7 min, luego de otro lavado se tomaron fotografías en un microscopio invertido de epifluorescencia (Nikon Diaphot TMD; NikonCorp., Japan) utilizando el objetivo de fluorescencia 20x y un filtro Nikon de rodamina (Ex 546, Em 590 nm). La generación de anión superóxido se determinó como porcentaje de células positivas a DHE con respecto al número de células totales, con el uso de microscopio de fluorescencia.

Actividad de NADPH oxidasa

Se midió utilizando la técnica descrita por Shpungin en 1989. Para detectar la actividad de la enzima se cuantificó la reducción del citocromo c (cit c) por el $O_2^{\cdot-}$ producido por la misma, en un espectrofotómetro a 550 nm. La reacción se llevo a cabo en presencia del homogenizado de las células y de la mezcla de reacción (amortiguador salino suplementado con cit c 0.1 mM, FAD 10 μ M y SDS 5 mM), y se inició al agregar 10 mM de NADPH, leyéndose durante 3 min. Los resultados de la actividad se expresan como la diferencia en la absorbancia por hora por mg de proteína.

Inmunoblot

Para determinar la presencia y cambios en los niveles de proteína de las diferentes NOX se realizaron ensayos tipo Western blot. Homogenados de los cultivos de cada condición se sometieron a electroforesis en un SDS-PAGE. Las proteínas separadas se transfirieron a una membrana de PVDF. Las membranas fueron bloqueadas durante 1 h con leche libre de grasa al 5% (p/vol) en PBS con 0.1% (vol/vol) de Tween 20, se incubaron con anticuerpos comerciales contra las proteínas de interés y finalmente se incubaron con anticuerpos secundarios acoplados a fosfatasa alcalina, los cuales se detectan por quimioluminiscencia.

Evaluación de la condensación nuclear

La condensación nuclear de las NGC, fue evaluada por medio del colorante fluorescente Hoechst 32258. Las NGC de 6-8 DIV fueron fijadas con formaldehído (4%) durante 7 min, se lavaron con buffer de fosfatos (PBS), se incubaron con Hoechst (0.1%) durante 20 min y después de lavarse con PBS se tomaron fotografías en un microscopio invertido de epifluorescencia (Nikon Diaphot TMD; Nikon Corp., Japan), utilizando un objetivo de fluorescencia 20x y un filtro Nikon UV-2A.

RT-PCR

Se realizaron ensayos de RT-PCR para determinar los niveles de RNAm con el RNA extraído de los cultivos celulares. Se determinó la presencia y los niveles de los RNAm de las NOX empleando secuencias de oligonucleótidos específicas. Las secuencias se encuentran debidamente especificadas en los métodos del artículo 1 de la sección de resultados.

Estadística

Los resultados se analizaron con un análisis de varianza de diseño aleatorio (ANOVA) de una serie de experimentos independientes. La significancia utilizada fue de $p < 0.05$. El número de ensayos se indica en los pies de figura.

RESULTADOS

Los resultados de este trabajo se dividen en tres secciones. La primera (7.1) muestra los datos sobre la identificación del homólogo de NOX implicado en la muerte apoptótica de las NGC inducida por K5 y ST, ésta consiste en 3 sub secciones. La primera parte (7.1.1) contiene un artículo publicado en el que se explica el papel diferencial de NOX2 según el estímulo de muerte apoptótica (*Guemez-Gamboa, A. y Morán, J. 2009. NOX2 mediates apoptotic death induced by staurosporine but not by potassium deprivation in cerebellar granule neurons. J Neurosci Res. 87(11):2531-40*). Una segunda parte (7.1.2) incluye los resultados obtenidos durante la estancia en el laboratorio del Dr. Karl-Heinz Krause, en la Universidad de Ginebra, Suiza; donde se utilizaron cultivos de NGC de animales deficientes en NOX1 y NOX4. Por último, un complemento donde las NGC de animales deficientes en NOX3 se cultivaron crónicamente en K5 (7.1.3).

En la segunda sección (7.2), se muestran los resultados relacionados con el papel del estrés oxidante mediado por la activación de NOX en la regulación del AVD y los flujos iónicos durante la muerte apoptótica de NGC. Estos resultados están incluidos en un manuscrito en preparación (apéndice I) (*Hernández-Enríquez B, Guemez-Gamboa A, y Morán J. ROS generation is related to ionic fluxes and apoptotic volume decrease of cultured granule neurons: role of NOX enzymes*).

La última sección (7.3) incluye resultados que proponen a la MAPK, p38, como una posible vía de activación de NOX2 en la muerte de las NGC. Estos son parte de un artículo en preparación el cual se encuentra como apéndice II (*Ramiro-Cortés Y, Guemez-Gamboa A y Morán J. p38 acts differentially on the ROS-mediated apoptosis induced by potassium deprivation or staurosporine in cerebellar granule neurons*).

La actividad de NOX es indispensable para la muerte apoptótica de neuronas granulares de cerebelo inducida por bajo potasio y estaurosporina.

Debido a que en estudios previos se ha sugerido la participación de NOX2 en la muerte apoptótica de neuronas privadas de señales tróficas (Tammariello et al., 2000) y que trabajos previos de nuestro grupo han probado la presencia de este complejo enzimático en las NGC de rata, así como su posible participación en la muerte apoptótica de las mismas (Coyoy et al., 2008), se decidió utilizar ratones deficientes en NOX2 para evaluar la participación esta enzima en la muerte apoptótica de las NGC.

Para lo anterior se hicieron cultivos neuronales tanto de ratones silvestres (NGC WT) como de ratones deficientes en NOX2 (NGC KO), los cuales se mantuvieron en un medio despolarizante (K25) y después de 7 días *in vitro* (DIV) se les trató con 0.5 μ M ST o se les hizo un cambio de medio a uno con K5. Estos resultados se describen ampliamente en el apartado 7.1.1. Brevemente, en el caso de K5 no se encontraron diferencias significativas en la viabilidad (fig. 1, 7.1.1) y la condensación nuclear (fig. 3, 7.1.1) después de 24 h de tratamiento entre las NGC de ratones silvestres y las de NOX2 KO. Sin embargo en el tratamiento con ST, en las NGC NOX2 KO se previene tanto la muerte como la condensación nuclear, mientras que las NGC WT mueren como se describió anteriormente.

En congruencia con estos datos, también observamos que tanto la actividad de caspasa-3 (fig. 2, 7.1.1.) como la fragmentación del DNA (fig. suplementaria 7.1.1), dos marcadores adicionales de apoptosis, se redujeron significativamente en las NGC NOX2 KO tratados con ST, pero no con K5, apoyando la idea de que la NOX2 parece participar en la muerte apoptótica de las NGC inducida por ST, pero no por K5.

Por otro lado, las NGC tanto de ratones NOX2 KO como de ratones silvestres mostraron un aumento en la producción de ROS después de 4-5 h de ser transferidas a K5, pero no al ser tratadas con ST, como sí ocurre en las NGC WT. Este pico de producción de ROS coincide con la activación de la NOX inducida por K5 y ST en las NGC WT. De nuevo, en el caso de las NGC KO, sólo se observa actividad de NOX en las

neuronas tratadas con K5, pero no en las tratadas con ST (fig 4, 7.1.1), sugiriendo de nuevo la participación de NOX2 en el caso de la muerte apoptótica inducida por ST y de una NOX distinta a NOX2 en el caso de K5.

Para corroborar lo anterior, se evaluó el efecto de DPI y AEBSEF, dos inhibidores generales de la actividad de NOX, en la viabilidad después de 24 h de estímulo apoptótico (fig 5, 7.1.1) y en la actividad de caspasa-3 después de 8 h (fig 6, 7.1.1). Bajo estas condiciones encontramos que los inhibidores de NOX previnieron la muerte y la activación de caspasa-3 inducida por K5. Adicionalmente, los inhibidores disminuyeron la producción de ROS (fig 7, 7.1.1), sugiriendo la participación de una NOX en la muerte apoptótica de NGC inducida por la privación de potasio. En el caso de la inducción de la muerte por ST, bajo estas mismas condiciones no se observó una protección adicional de la muerte (fig 5, 7.1.1), ni una mayor disminución de la producción de ROS (fig 7, 7.1.1). Esto apoya de nuevo la posibilidad de que NOX2 sea la NOX responsable de la muerte apoptótica de las NGC inducida por ST.

Finalmente, como los resultados sugieren la participación de otro miembro de NOX en la muerte apoptótica de las NGC inducida por K5, se decidió evaluar la presencia de otros miembros de la familia NOX en estas células. En este sentido se encontró que NOX1 y NOX4 también están presentes en las NGC tanto a nivel de ARN mensajero como de proteína (fig 8, 7.1.1). Adicionalmente, no encontramos diferencias significativas en los niveles de NOX1 y NOX4 entre las NGC NOX2 KO y las de ratones silvestres sugiriendo que no hay una compensación, al menos en términos de su expresión, de otras NOX en los animales NOX2 KO.

Guemez-Gamboa, A. y Morán, J. 2009. NOX2 mediates apoptotic death induced by staurosporine but not by potassium deprivation in cerebellar granule neurons. *J Neurosci Res.* 87(11):2531-40.

Resumen

Se ha sugerido que la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), constituye un estímulo inductor y regulador de la apoptosis. Sin embargo, no queda claro cuál es la fuente de estas ROS. Se ha propuesto a la NOX como una posibilidad, ya que se ha demostrado en cultivos neuronales que una fracción de ROS formada en la muerte proviene de una NOX y que ésta participa en una fase temprana de la muerte neuronal.

Empleando como modelo el cultivo de NGC de ratones y como inductores apoptóticos la privación de KCl extracelular (K5) y la aplicación de la ST, se analizó la participación de esta enzima en la apoptosis de NGC de ratones deficientes en NOX2. Primero encontramos que en el caso de K5 las NGC de ratones deficientes en NOX2 (NGC ko) mueren de manera similar a las NGC de ratones silvestres (NGC wt), ya que su actividad de caspasas condensación nuclear y reducción de la viabilidad son similares, sin embargo, en el caso de la ST si hay diferencias significativas entre ellas, ya que en las NGC ko existe un menor número de núcleos condensados y una reducción de la actividad de la caspasa-3 comparada con las NGC wt.

También se observó que en ambas NGC se induce la activación de NOX y la producción de ROS y que con el uso de un inhibidor de esta enzima, DPI, disminuyen. Además, con el DPI, también disminuyen la activación de caspasa 3 y la muerte neuronal de las NGC de ambos ratones, inducida por K5.

Estos resultados sugieren que NOX2 es indispensable para la apoptosis de las NGC de ratón inducida por la ST; sin embargo, en el caso de K5 parece requerirse una NOX diferente.

NOX1, NOX3 y NOX4 no participan en la muerte apoptótica de neuronas granulares de cerebelo.

Los resultados descritos a continuación se realizaron en una estancia de investigación en el laboratorio del Dr. Karl-Heinz Krause en la Universidad de Ginebra, ya que no existen ratones deficientes de NOX1 ni de NOX4 disponibles de manera comercial

Al igual que en el caso de los ratones deficientes de NOX2, se hicieron cultivos neuronales tanto de ratones silvestres (WT) como de ratones deficientes en NOX1 (NOX1 KO) y NOX4 (NOX4 KO), los cuales se mantuvieron en un medio despolarizante (K25) por 7 DIV; posteriormente se les trató con 0.5 μ M ST o se les hizo un cambio de medio a uno con K5.

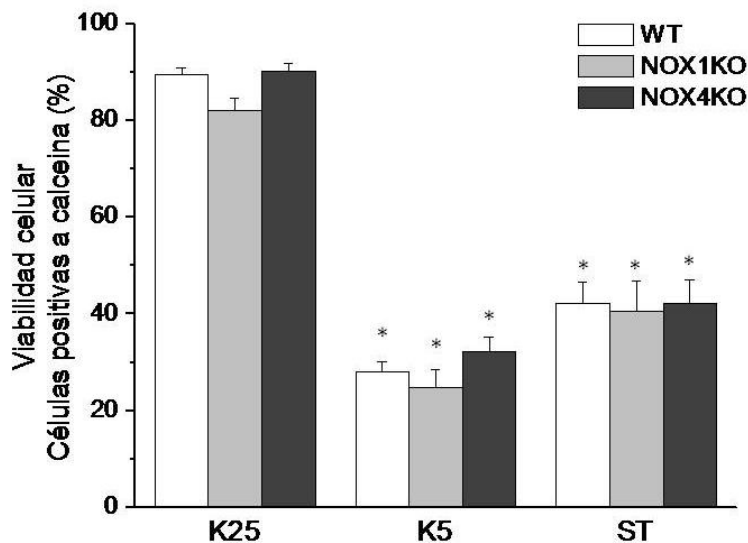


Figura 3: Efecto del K5 y la ST en la viabilidad de las NGC WT y KO. Se utilizó calceína-IP para observar la viabilidad celular a las 24 horas de tratamiento con K5 y ST en ambas NGC. Se tomaron fotografías, se contaron las células fluorescentes y se hizo una relación con el número total de células. No existen diferencias entre ambas NGC, tanto en el caso de las NGC NOX1KO como en el caso de las NGC NOX4 KO. Las barras son la media de 3 experimentos independientes \pm S.E. * $p \leq 0.05$ a K25.

Después de 24 h del tratamiento con K5 o ST se determinó la viabilidad de las NGC NOX 1 KO. No se encontraron diferencias significativas entre las NGC silvestres y las NGC de ratones deficientes en NOX1 (fig 3), sugiriendo que NOX1 no participa en la

muerte apoptótica de NGC inducida por ninguno de los dos estímulos. En el caso de las NGC NOX4KO tampoco se encontraron diferencias significativas con sus respectivos controles para ninguno de los tratamientos utilizados (fig 3). Esto reafirma la idea de que NOX2 es indispensable en la muerte inducida por ST.

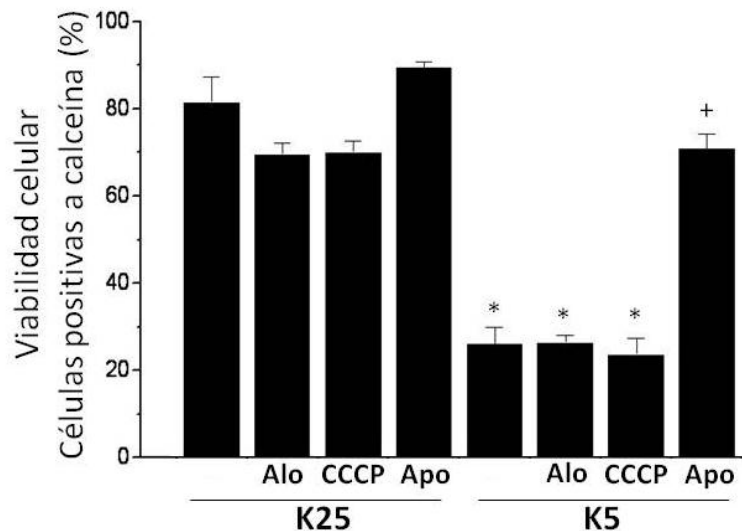


Figura 4: Efecto de distintos inhibidores en la viabilidad de las NGC tratadas con K5. Se utilizó calceína-IP para observar la viabilidad celular a las 24 horas de tratamiento con K5 con o sin los distintos inhibidores, 1 μ M de CCCP, 100 μ M de alopurinol (Alo) y 1 mM de apocinina (Apo). También se administraron los inhibidores en condiciones control (K25). Las barras son la media de 3 experimentos independientes \pm S.E. * $p \leq 0.05$ a K25. + $p \leq 0.05$ a K5.

Por otro lado, se trató a las NGC con diferentes inhibidores de otras fuentes de ROS para evaluar si las NOX son la única fuente de ROS en la muerte apoptótica de las NGC. Para esto, se utilizó 1 μ M de CCCP para inhibir la fosforilación oxidativa de la mitocondria y 100 mM de alopurinol, un inhibidor de la xantina oxidasa. La NOX se inhibió con 1 mM de apocinina. Ninguno de los inhibidores afectó la viabilidad en K25. Después de 24h de tratamiento con K5 encontramos que ni la inhibición de la mitocondria por CCCP ni de la xantina oxidasa por alopurinol protegió a las NGC de la muerte inducida por K5 (fig. 4). En contraste, la apocinina si disminuyó la muerte apoptótica, sugiriendo la importancia de un miembro de la familia NOX, distinto a NOX1, NOX2 y NOX4, en la muerte apoptótica de NGC inducida por K5.

En este sentido, mediante ensayos de RT-PCR se encontró una única banda del

tamaño esperado para NOX3 en las NGC de ratón silvestre, cultivadas por 7 DIV en K25 (fig. 5). Como control positivo se utilizó el ARN obtenido del oído interno de ratones silvestres y como control de carga se amplificaron todos los ARN mensajeros tanto de las NGC como del oído interno con oligonucleótidos específicos para GAPDH por 20 ciclos. Los experimentos se repitieron 3 veces y no se observaron cambios entre ninguno de los tratamientos.

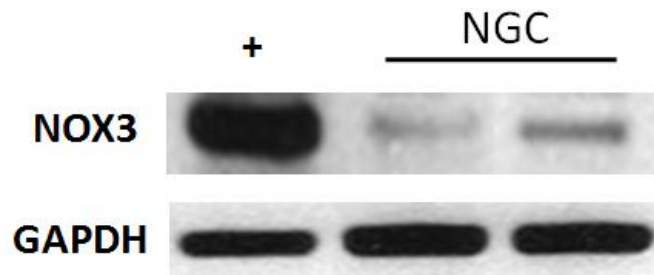


Figura 5: Presencia de NOX3 en las NGC de ratón. Por medio de la técnica de RT-PCR se logró identificar el ARN mensajero para NOX3. Como control positivo se utilizó oído interno de ratón. Como control de carga se utilizaron oligonucleótidos diseñados para GAPDH.

Posteriormente, se hicieron cultivos de NGC provenientes de animales deficientes en NOX3 para determinar si este homólogo tiene un papel en la muerte apoptótica de NGC inducida por K5 y ST. Al igual que en los casos mencionados anteriormente, donde se utilizaron ratones deficientes, se hicieron cultivos neuronales tanto de ratones silvestres (WT) como de ratones deficientes en NOX3 (NOX3 KO), los cuales se mantuvieron en un medio despolarizante (K25) por 7 DIV y posteriormente se les hizo un cambio de medio a uno con K5 o se les trató con 0.5 μ M ST.

A continuación, se determinó la viabilidad de las NGC NOX3 KO 24 h después del tratamiento con K5 o ST. No se encontraron diferencias significativas entre las NGC silvestres y las NGC de ratones deficientes en NOX3 (fig. 6), indicando así que NOX3 no participa en la muerte apoptótica de NGC inducida por K5 o ST.

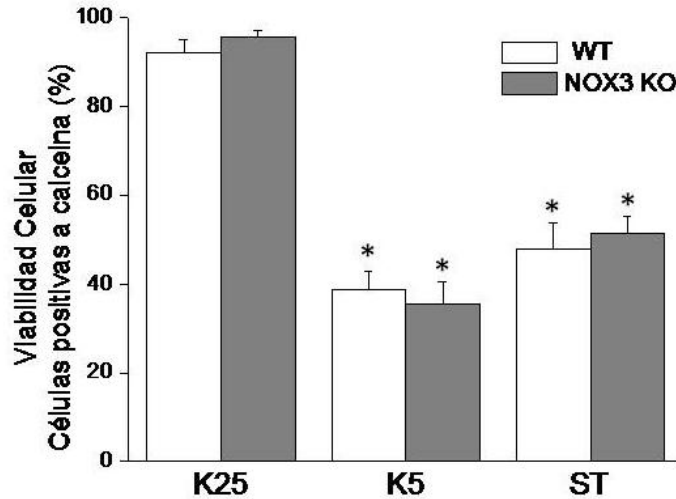


Figura 6: Papel de NOX3 en la muerte apoptótica de las NGC inducida por K5 y ST. Se utilizó calceína-IP para observar la viabilidad celular a las 24 h de tratamiento con K5 y ST en ambas NGC. Se tomaron fotografías, se contaron las células fluorescentes y se hizo una relación con el número total de células. No existen diferencias significativas entre NGC WT y NOX3 KO. Las barras son la media de 3 experimentos independientes \pm S.E. * $p \leq 0.05$ al K25 correspondiente.

En conclusión NOX1, NOX2, NOX3 y NOX4 parecen no participar en la muerte apoptótica de las NGC inducida por K5. NOX2 tiene un papel importante en la muerte de las NGC inducida por ST, corroborado por el hecho de que es la única NOX que al no estar presente previene la muerte apoptótica inducida por ST; sin embargo, no se ha determinado cual de las NOX es la que participa en la muerte inducida por K5, aunque hasta ahora, las evidencias apuntan a que si es un miembro de esta familia.

NOX3 participa en la muerte apoptótica de las neuronas granulares de cerebelo cultivadas en un medio con bajo potasio crónico.

Como se mencionó anteriormente, las NGC en cultivo ha sido un modelo muy utilizado para estudiar una gran variedad de procesos y eventos neuronales, incluyendo los mecanismos moleculares y celulares de la muerte apoptótica del sistema nervioso. Las NGC sobreviven en cultivo si se despolarizan crónicamente

con altas concentraciones de potasio (K25) (Gallo *et al.* 1987) o si se mantienen en presencia de un agonista de los receptores a glutamato, como el N-metil-D-aspartato (NMDA) (Balázs *et al.*, 1988; Morán y Patel, 1989). Sin embargo, si no reciben esta estimulación despolarizante inician un proceso degenerativo a partir de los 4-5 DIV (Gallo *et al.* 1987; Alavez *et al.*, 2003).

Para conocer la participación de NOX 3 en este proceso se cultivaron NGC de ratones silvestres (NGC WT) y de ratones deficientes en NOX3 (NGC NOX3 KO) en un medio con concentraciones fisiológicas de potasio (K5 o K10) y se comparó la viabilidad con NGC crecidas en un medio con condiciones despolarizantes (K25 o K10+NMDA). Bajo estas condiciones observamos, en coincidencia con reportes previos (Alavez *et al.*, 2003), que durante los primeros 4 DIV tanto las NGC cultivadas en K5 como las cultivadas en K25 se mantienen viables. Así mismo, las células crecidas en K10 y las tratadas con NMDA también mantienen su viabilidad después de 4 DIV. Esto se observa de igual manera en las NGC WT y las NGC NOX3 KO. Los resultados indicaron que a los 4 DIV, las NGC no son dependientes del estímulo despolarizante para sobrevivir.

A partir de los 7 DIV las células provenientes de ratones silvestres que crecen bajo condiciones no despolarizantes inician un proceso degenerativo que se ve reflejado en una pérdida de la viabilidad celular medida por calceína/IP. Este proceso degenerativo no se observa en las células cultivadas en K25 demostrando una dependencia de la despolarización a partir de este momento. Después, a los 10 y 14 DIV las células mueren progresivamente hasta alcanzar alrededor de un 70% de pérdida en la viabilidad celular.

Sin embargo y de manera interesante, las NGC de ratones deficientes en NOX3 no presentan esta disminución de la viabilidad a ningún DIV evaluado (4, 7, 10 y 14 DIV) en condiciones no despolarizantes de K5 (Fig. 7), mostrando la misma viabilidad que en condiciones despolarizantes (K25), sugiriendo así que NOX3 podría estar involucrada en la pérdida de la viabilidad que se observa al no tener una condición despolarizante.

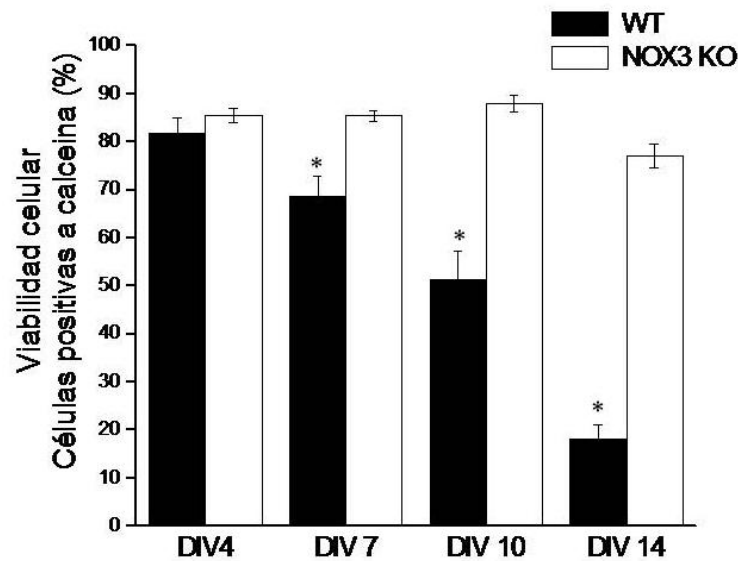
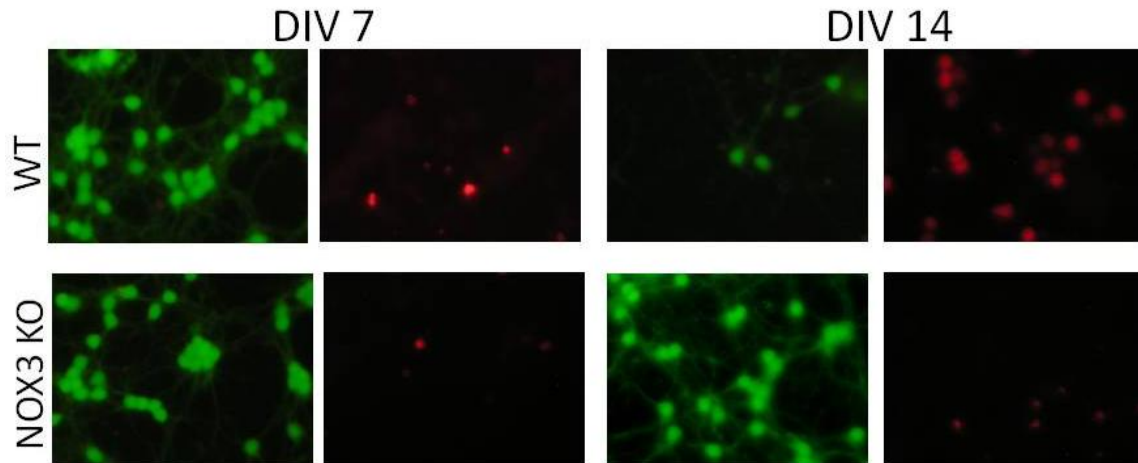


Figura 7. NOX3 participa en la muerte inducida por K5 crónico en NGC. Las NGC de ratones NOX3 KO y silvestres fueron cultivadas en un medio con K5 por los DIV que se indican en la figura. Se utilizó calceína-IP para observar la viabilidad celular a los DIV señalados en ambas NGC. Se tomaron fotografías, se contaron las células fluorescentes y se hizo una relación con el número total de células. Las barras son la media de 5 experimentos independientes \pm S.E. * $p \leq 0.05$ al NOX3 KO en el DIV correspondiente.

Por otro lado las células cultivadas en K25 presentan una viabilidad similar a lo largo de todos los DIV observados, tanto en las NGC NOX3 KO como en las silvestres. Esto coincide con reportes previos donde se demuestra que estas células pueden sobrevivir hasta tres semanas en cultivo (Gallo *et al.*, 1987).

En este sentido, debido a que las NOX son principalmente productoras de especies reactivas de oxígeno, decidimos evaluar la generación de ROS en estas células cultivadas

en bajo potasio a lo largo del tiempo. En la figura 8 se muestra que hay un aumento en la generación de ROS de las NGC silvestres alrededor del DIV 10, lo cual correlaciona con la disminución de la viabilidad a casi el 50%. Sin embargo en NGC NOX3 KO, la producción de ROS se mantiene en el mismo nivel basal en todos los DIV evaluados, sugiriendo que la participación de NOX3 en la muerte inducida por K5 crónico puede ser vía la producción de especies reactivas de oxígeno.

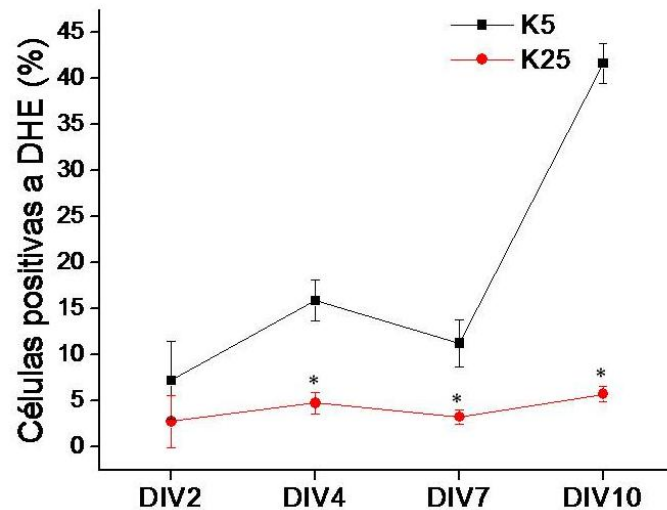


Figura 8. Producción de ROS inducidas por K5 crónico en NGC. Las neuronas de ratones NOX3 KO y silvestres fueron cultivadas en un medio con bajo potasio (K5) por los DIV que se indican en la figura. La producción de ROS fue determinada por el número de células positivas a DHE. Se tomaron fotografías, se contaron las células fluorescentes y se hizo una relación con el número total de células. Los datos son la media de 5 experimentos independientes \pm S.E. * $p \leq 0.05$ al silvestre en el DIV correspondiente.

Como se mencionó anteriormente, la estimulación del receptor a glutamato tipo NMDA, como las concentraciones elevadas de KCl, promueve también la supervivencia, diferenciación y maduración de las NGC en cultivo. Por lo que se decidió analizar la participación de NOX3 en otra condición despolarizante que también induce sobrevivencia de las NGC, el tratamiento con NMDA (150 μ M). Para lo anterior, se realizaron cultivos de NGC sembradas en K10, tanto silvestres como NOX3 KO a los cuales se les agregó NMDA después de 1 DIV.

Las NGC NOX3 KO tratadas con NMDA sobreviven en buen estado hasta los 10 DIV, a partir de este día inician un proceso de degeneración similar a la que se observa

en los silvestres, indicando que NOX3 no tiene un papel en la supervivencia de las NGC inducida por el tratamiento con NMDA. Esto concuerda con reportes previos que sugieren a NOX2 como la responsable de la producción de ROS inducidas por la estimulación del receptor NMDA.

Papel de NOX en la regulación del decremento del volumen apoptótico y los flujos iónicos durante la apoptosis de neuronas granulares de cerebelo.

La actividad de NOX y la consecuente generación de ROS es un evento temprano en el programa de muerte apoptótica. Para evaluar la participación de los homólogos de NOX en este proceso, se decidió examinar un evento cercano a las 4-5 h que pudiera estar regulado por las ROS producidas por la activación de esta enzima.

Previamente, trabajos de nuestro grupo han mostrado que existe un decremento del volumen apoptótico (AVD) en NGC al ser tratadas con K5 y ST, el cual se puede prevenir con el uso de bloqueadores de canales de K^+ y Cl^- (Hernández-Enríquez et al., 2010). Además, encontramos que K5 y ST inducen AVD en tiempos tempranos (5h) análogamente al tiempo en que se generan ROS, por lo que en esta sección evaluamos el papel de NOX en la regulación del AVD y los flujos iónicos durante la muerte apoptótica de NGC inducida por ambos tratamientos.

Para evaluar si las ROS generadas por la activación de NOX están involucradas en la inducción del AVD probamos el efecto tanto de antioxidantes como de inhibidores de NOX en el volumen celular de NGC tratadas con K5 o ST. Bajo estas condiciones observamos que todos los antioxidantes e inhibidores de NOX probados inhibieron significativamente el AVD producido por K5 y ST. (Hernández-Enríquez *et al.*, en preparación) (fig. 2 y 4, apéndice I). También se realizaron cultivos de animales deficientes en NOX2 y se les evaluó el decremento del volumen celular después del tratamiento con K5 y ST. Los resultados obtenidos coinciden con los datos mostrados anteriormente: en NGC NOX2 KO tratadas con ST se inhibió marcadamente el AVD, mientras que en las CGN tratadas con K5 no se observaron diferencias con respecto a las

NGC silvestres (fig. 4, apéndice I); confirmando así el papel de NOX2 en la muerte apoptótica de las NGC inducida por ST, pero no para el caso de K5 donde otra NOX podría estar involucrada.

Para determinar si el estrés oxidante por sí mismo podía producir AVD en NGC, se trató a las células con una condición prooxidante mediante el uso de xantina (100 μ M) y xantina oxidasa (45 mU/ml) (XaXO), el cual se sabe que induce ROS y muerte apoptótica (Valencia y Morán, 2004). Los resultados indican que efectivamente las ROS por sí mismas inducen AVD ya que las NGC tratadas con XaXO presentan un decremento significativo del volumen alrededor de las 3 h de tratamiento, el cual continúa hasta al menos las 5 h (fig. 3A, apéndice I).

Dado que los flujos de Cl^- y K^+ parecen tener un papel importante en la progresión de la muerte, además de estar asociados estrechamente con el AVD inducido por los tratamientos con K5 y ST, se decidió evaluar la participación de estos flujos iónicos en la actividad de NOX y la subsecuente producción de ROS. Para lo anterior, se observó si el bloqueo de canales de Cl^- y K^+ tenía un efecto en las ROS generadas por la activación de NOX inducida después del tratamiento con K5 y ST. Se utilizó 10 mM de Cs^+ , 10 mM de TEA⁺ y 5 mM de 4AP como bloqueadores de canales de K^+ y 500 μ M de DIDS como bloqueador de canales de Cl^- . Bajo estas condiciones, observamos que en las NGC tratadas con K5, el bloqueo de canales de K^+ o Cl^- reduce la generación de ROS (fig. 9A), mientras que en el caso de ST la producción de ROS es inhibida únicamente al bloquear los canales de Cl^- con DIDS (fig. 9B).

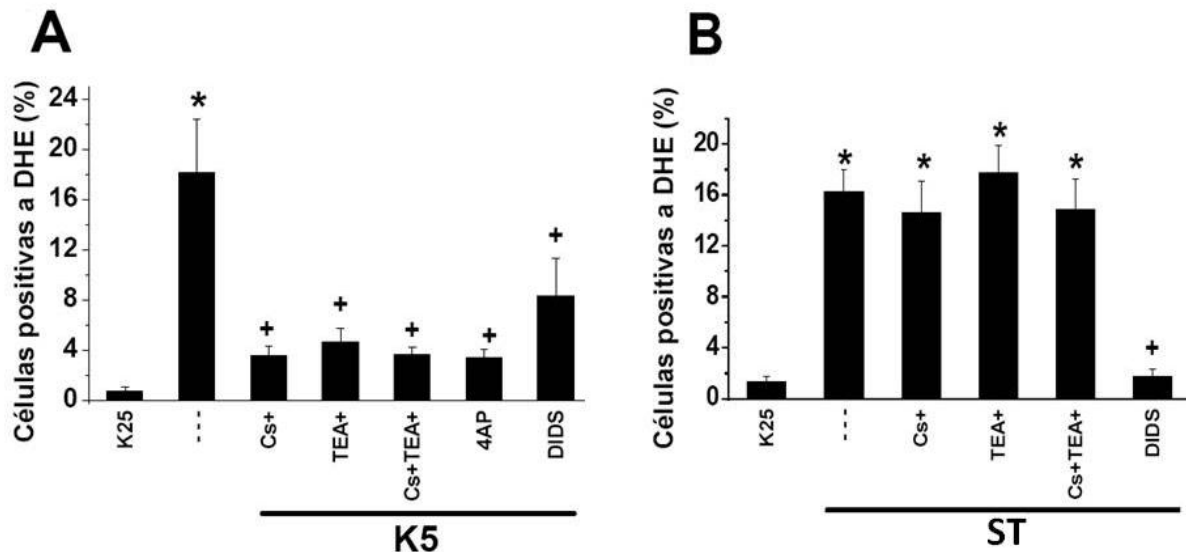


Figura 9. Papel del bloqueo de canales de K^+ ó Cl^- en la generación de ROS inducida por K5 y ST. La producción de ROS se evaluó por tinción de dihidroetidio (DHE). El Cs^+ , TEA^+ y $4AP$ se utilizaron como bloqueadores de canales de K^+ y el DIDS como bloqueador de los canales de Cl^- , se evaluó la producción de ROS después de 4 h del tratamiento con K5 (A) y 5 h con ST (B). Las gráficas muestra la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes, * representa diferencias significativas con respecto al control, + representa diferencias significativas de su control respectivo sin bloqueadores de canales de K^+ ó Cl^- , $p \leq 0.05$.

Para determinar si estas ROS provienen de una NOX decidimos probar el efecto de los bloqueadores iónicos en la actividad de la enzima. Encontramos que el bloqueo de los flujos iónicos de K^+ y Cl^- reduce la actividad de NOX inducida por K5 (fig. 10A) y, al igual que en la generación de ROS, solo el DIDS redujo la actividad de NOX inducida por ST (fig. 10B). Estos resultados sugieren que los flujos iónicos pueden ser reguladores del aumento de las ROS producidas por la actividad de NOX. Sin embargo es evidente que existen diferencias en la regulación iónica dependiendo el estímulo dado.

Debido a que existe un tiempo crítico en el programa de muerte apoptótica y que tanto el AVD y los ROS se presentan alrededor de este tiempo crítico, decidimos evaluar si éste también es un tiempo decisivo en el caso del bloqueo de los flujos iónicos. Con esta finalidad, se diseñaron experimentos donde las neuronas se trataron con K5 y ST durante diferentes tiempos y posteriormente se añadió Cs^+ para el caso de K5 y DIDS para ST.

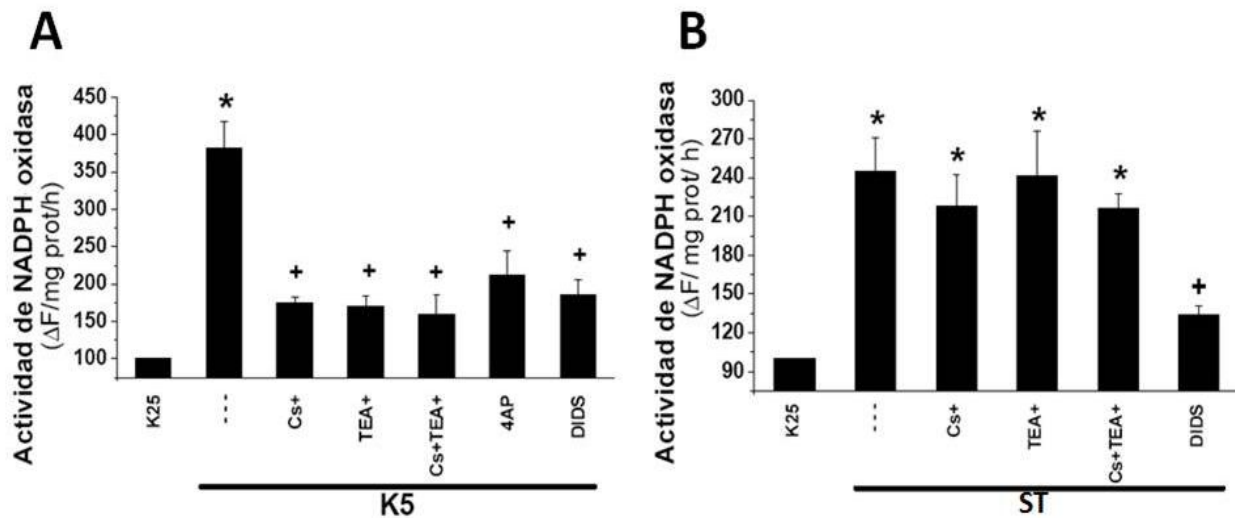


Figura 10. Papel del bloqueo de canales de K^+ ó Cl^- en la actividad de la NOX inducida por K5 y ST. El Cs^+ , TEA^+ y 4AP se utilizaron como bloqueadores de canales de K^+ y el DIDS como bloqueador de los canales de Cl^- , se evaluó la actividad de NOX inducida por K5 (A) y ST (B). Las gráficas muestra la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes, * representa diferencias con respecto al control, + representa diferencia de su control respectivo sin bloqueadores de canales de K^+ ó Cl^- , $p \leq 0.05$.

Se evaluó la generación de ROS, el volumen celular y la muerte de las neuronas a las 5, 11 y 24 horas después del estímulo apoptótico. En estas condiciones encontramos que tanto el Cs^+ como el DIDS añadidos simultáneamente al estímulo (0 h) o después de las primeras 3 h de tratamiento son igualmente eficientes para inhibir la muerte de NGC inducida por K5 o ST (fig. 11A, B), la generación de ROS (fig. 11C, D) y el encogimiento celular (fig. 6 apéndice I). Sin embargo, si el Cs^+ o el DIDS se añaden después de 4 h, el efecto inhibitor ejercido sobre el AVD, la generación de ROS y la muerte disminuyen significativamente. Se obtuvieron resultados similares con el tratamiento con TEA^+ en el caso de K5 (datos no mostrados).

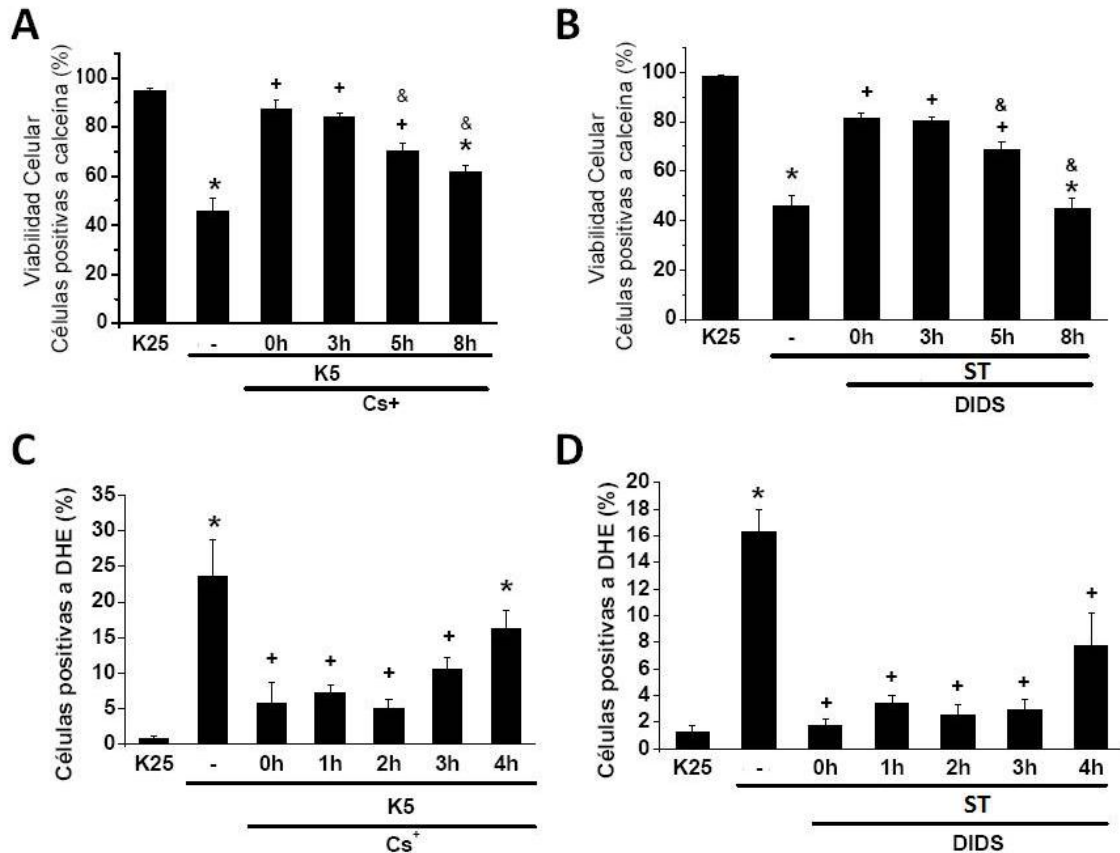


Figura 11. Efecto de la inhibición de canales iónicos en la muerte de NGC. Viabilidad celular de neuronas tratadas con K5 (A) y ST (B). Después de 0 h, 3 h, 5 h y 8 h del cambio de medio se añadió el bloqueador iónico Cs⁺ (A) o DIDS (B) y después de 24 horas del tratamiento apoptótico se midió la viabilidad con la tinción por calceína. Efecto del Cs⁺ (C) y el DIDS (D), en la generación de ROS producidas por el tratamiento con K5 (C) o ST (D). Después de 0 h, 2 h, 3 h y 4 h de tratamiento se añadió el bloqueador iónico y se midió la generación de ROS a las 4.5 h (C) y 5 h (D) con la tinción de dihidroetidio (DHE). Los datos representan el promedio de los valores obtenidos en las diferentes condiciones (±SEM) de 3-6 experimentos independientes. *p<0.05 y K25; +p<0.05 y K5 o Sts; &p<0.05 y 0 h.

Estos resultados sugieren la participación temprana de los flujos iónicos en la muerte y la existencia de un tiempo crítico para la inhibición de la muerte, el cual corresponde al tiempo de aparición de estos procesos, generación de ROS y AVD. Para complementar estos resultados, se evaluó la participación de flujos iónicos en la muerte y AVD en NGC que fueron sometidas a la condición prooxidante de XaXO en presencia de los bloqueadores de los canales iónicos. Encontramos que los ROS parecen estar regulando el AVD vía canales de Cl⁻ principalmente, ya que ninguno de los diferentes bloqueadores de canales de K⁺ empleados (Cs⁺, TEA⁺ y 4AP) inhibieron la muerte ni el

AVD producido por XaXO en NGC (fig. 7, apéndice I). Sin embargo, los bloqueadores de canales de Cl⁻ (DIDS o SITS) inhibieron tanto la muerte como el AVD de las neuronas tratadas con XaXO (fig. 7, apéndice I). Esto es similar a lo observado con ST donde sólo los canales de Cl⁻ tienen un papel importante en el AVD y la muerte apoptótica.

Estos resultados, junto con los obtenidos previamente en esta sección, indican una estrecha relación entre el AVD, la generación de ROS por la activación de una NOX y los flujos iónicos en la muerte apoptótica de NGC. En general se propone a los flujos iónicos como un evento previo a la activación de NOX y la subsecuente producción de ROS, pero también se sugiere que estos flujos iónicos pueden ser incrementados como consecuencia de la generación de ROS debido a la actividad de NOX. Sugiriendo así, un sistema de retroalimentación que pudiera asegurar la muerte apoptótica de estas neuronas.

Papel de p38 en la activación de NOX durante la muerte apoptótica de las neuronas granulares de cerebelo.

Se ha reportado que las MAPKs, incluyendo p38, participan en la muerte apoptótica en diferentes modelos celulares. Por otro lado, se sabe que la activación de estas cinasas puede estar regulada por ROS y que p38 puede activarse por mediación de la activación de una NOX. En este sentido, sabemos que p38 se activa a tiempos tempranos después del tratamiento con K5 y ST (fig. 1, apéndice II) y participa en la apoptosis de las NGC, ya que al utilizar un inhibidor de su activación, SB203580 (SB) 10µM, se previene la muerte, la activación de la caspasa 3 y la condensación nuclear inducidos tanto por K5 como por ST (fig. 2, apéndice II).

Para dilucidar si la activación de p38 se encuentra antes o después de la producción de ROS generadas por la activación de NOX por ambos estímulos, utilizamos el inhibidor de p38, SB, simultáneamente con el estímulo apoptótico. Cuando las células fueron tratadas con K5 y SB, observamos que la generación de ROS no disminuyó con respecto al K5 solo (fig. 12A), sin embargo al ser tratadas con ST y SB la generación de ROS inducida por ST disminuyó (fig. 12B). Para determinar si la activación de NOX es la

fueron tratadas con ST en ausencia y presencia de SB. Observamos que la actividad de NOX inducida por ST es dependiente de p38, ya que en presencia de SB disminuye significativamente (fig. 12C).

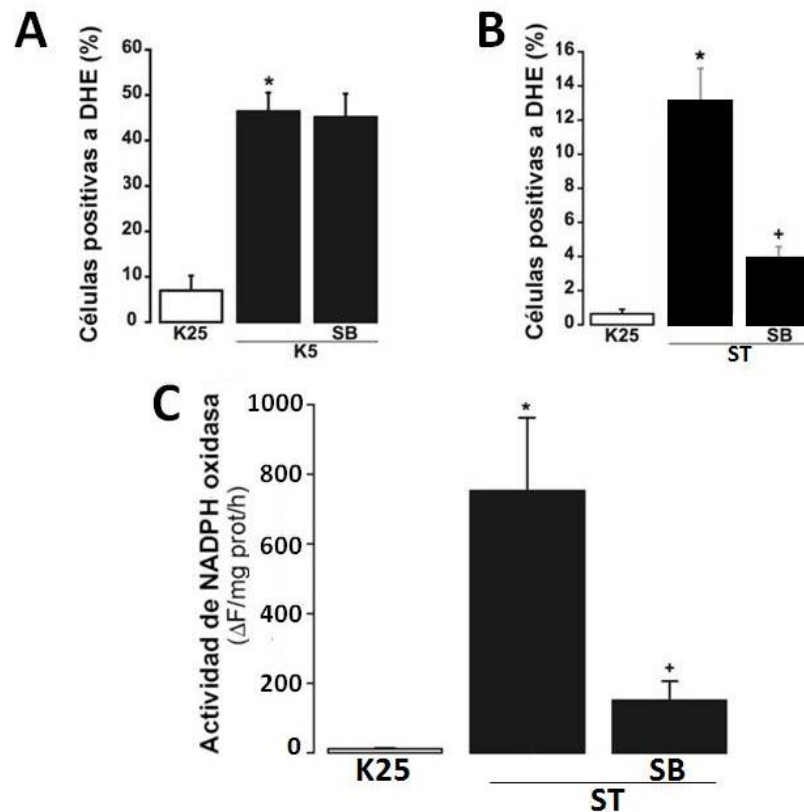


Figura 12. Efecto de p38 en la generación de ROS inducida por K5 y ST. Las NGC mantenidas en K25 por 7 DIV fueron transferidas a un medio K5 (A) o tratadas con Sts 0.5 μ M (B) por 4.5 h y 5 h respectivamente en ausencia y presencia 10 μ M SB203580 (SB) y la producción de ROS fue determinada por el número de células positivas a DHE. La actividad de la NOX fue medida espectrofotométricamente como oxidación del citocromo c después de 5 h con ST (C). Los resultados son las medias \pm S.E. de 5-10 experimentos independientes, * p <0.05 vs K25, + p <0.05 vs K5.

Debido a que p38 se activa en los primeros minutos después del tratamiento apoptótico se decidió evaluar si esta activación temprana era suficiente para la progresión de la muerte apoptótica de las NGC. Para esto se agregó el inhibidor de p38, SB, a distintos tiempos después del tratamiento con K5 o ST. La figura 13 muestra como existe un tiempo crítico para la progresión de la muerte apoptótica el cual concuerda con

el tiempo en el que se activa NOX ya que el SB protege a las células de la muerte apoptótica sólo si se agrega antes que se observe la activación de NOX, es decir entre las 0 y las 4 horas. Posteriormente, después de las 6, 8 y 12 horas de tratamiento el SB ya no tiene ningún efecto sobre la viabilidad celular.

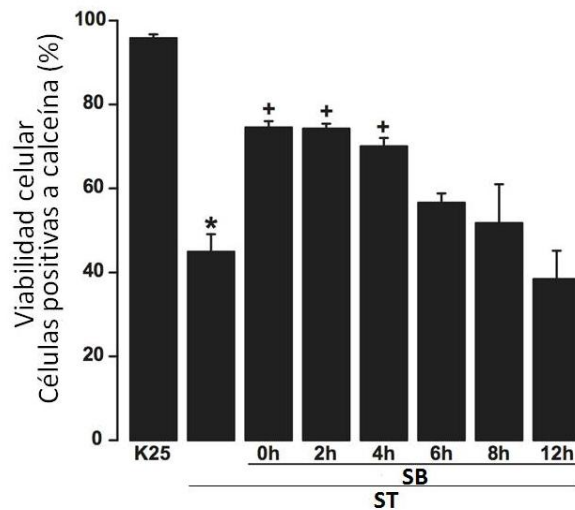


Figura 13. Efecto de la inhibición de la activación de p38 en la muerte de NGC. Viabilidad celular de neuronas tratadas con ST. Después de 0 h, 3 h, 5 h y 8 h del cambio de medio se añadió el inhibidor de la activación de p38 (SB) y después de 24 horas del tratamiento apoptótico se midió la viabilidad con la tinción por calceína. Los resultados son las medias \pm S.E. de 4-6 experimentos independientes, * $p < 0.05$ a K25, + $p < 0.05$ a ST.

Lo anterior sugiere que la activación de p38 es indispensable solamente alrededor de las 4 h, ya que aunque ésta cinasa se haya activado de manera temprana, alrededor de los 45 min, todavía no es suficiente para que las neuronas mueran apoptóticamente. Sin embargo, después de este tiempo (4 h), es probable que p38 haya activado el siguiente componente de la vía de señalización que promoverá la muerte apoptótica. Basados en los cursos temporales y en nuestros resultados anteriores, pensamos que ese siguiente punto podría ser la activación de una NOX.

DISCUSIÓN

Se sabe que para que las NGC maduren y sobrevivan en cultivo deben mantenerse en un medio con concentraciones despolarizantes de potasio (K25) (Morán y Patel, 1989) y cuando éstas son transferidas a un medio con potasio bajo (K5) o se tratan con ST, las células mueren después de 24 h (Gallo, *et al.*, 1987, Morán, *et al.*, 1999) con características apoptóticas (Morán, *et al.*, 1999, Caballero-Benítez y Morán, 2003, Valencia y Morán, 2001, Atlante, *et al.*, 2003). En estudios previos encontramos que la muerte inducida por estas condiciones involucra la generación de ROS, (Valencia y Morán, 2001). En este trabajo corroboramos que la generación de anión superóxido inducida por K5 y ST es transitoria y tiene un máximo a las 4-5 h después del estímulo. Se ha propuesto que el incremento de ROS está involucrado en la activación de la muerte apoptótica, puesto que la administración temprana de antioxidantes previene de la muerte apoptótica inducida por K5 (Valencia y Morán, 2001, Atlante, *et al.*, 2003).

Por otro lado, existen antecedentes que señalan a una NOX como participante en la muerte apoptótica de otros cultivos neuronales (Noh y Koh, 2000; Kim *et al.*, 2002; Hwang *et al.*, 2002). En neuronas simpáticas del ganglio cervical superior en cultivo de ratones deficientes en NOX2, se ha demostrado la participación de esta enzima en la muerte apoptótica de estas neuronas al ser privadas de un estímulo trófico (NGF) (Tammariello *et al.*, 2000). Así como en modelos *in vivo* donde se sabe que al no haber una NOX funcional se reduce el daño por isquemia (Walder *et al.*, 1997).

En este estudio encontramos que la generación de ROS observada podría estar relacionada con la activación de NOX. Esto último se basa en el hecho de que su activación correlaciona con la producción de ROS observada y que los inhibidores generales de esta enzima reducen la muerte neuronal, así como otros parámetros apoptóticos, activación de caspasa 3, condensación nuclear.

Como una primera aproximación a contestar la pregunta de cuál es la NOX que está participando en la apoptosis de las NGC, se decidió evaluar a NOX2. Esto debido a que estudios previos en el laboratorio habían encontrado que al menos 4 de las 5 subunidades de esta NOX están presentes en las NGC: gp91-phox (NOX2), la subunidad

catalítica, y p22-phox, p47-phox y p67-phox, subunidades accesorias (Coyoy *et al.*, 2008). Además de que ya había sido reportada participación de NOX2 en la apoptosis neuronal (Tammariello *et al.*, 2000).

Para ello se emplearon ratones deficientes en NOX2 que están muy bien caracterizados debido a que son el modelo de estudio de una enfermedad humana hereditaria llamada granulomatosis crónica, donde los pacientes están inmuno suprimidos por la falta de actividad de NOX2 en macrófagos (Pollock *et al.*, 1995).

Una observación interesante de este trabajo, basada en los experimentos con ratones deficientes en NOX2, es la posibilidad de que NOX2 tiene un papel central en la muerte inducida por ST, ya que la actividad de caspasa-3, fragmentación de DNA y condensación nuclear inducidas por este tratamiento sufren una reducción significativa en las NGC deficientes en NOX2 con respecto a las NGC silvestres. La cual fue corroborada posteriormente al utilizar NGC de ratones deficientes en NOX1, NOX3 y NOX4, ya que la deficiencia en ninguna de estas NOX reduce la muerte inducida por ST, siendo éste un efecto específico de la ausencia de NOX2.

Por otro lado, en el caso de K5 no se ve una participación aparente de NOX2, ya que en las NGC de ratones deficientes de esta enzima se sigue observando una producción de ROS a tiempos cortos lo que correlaciona con la activación de una NOX, apuntando a una posible participación de otras NOX. Si este es el caso, entonces podemos proponer que un mismo tipo celular puede morir de forma apoptótica utilizando mecanismos diferentes dependiendo del tipo de estímulo recibido.

La falta de coincidencia de los resultados de K5 con los antecedentes donde la muerte por privación de un estímulo trófico está mediada por NOX2 puede tener distintas explicaciones. El sistema nervioso periférico podría comportarse diferente que el sistema nervioso central en sus requerimientos para llevar a cabo una muerte apoptótica exitosa. Por ejemplo, en modelos de animales deficientes tanto en caspasa 3 como 9, ocurre un desarrollo anormal del cerebro pero un desarrollo normal en la médula espinal (Oppenheim *et al.*, 2001). Así, aunque existen antecedentes de la participación de una NOX en la muerte de neuronas del SNC, en ninguno de estos

trabajos se ha utilizado una inhibición específica para cierto homólogo de NOX sino que se han utilizado inhibidores generales (Noh y Koh, 2000; Kim *et al.*, 2002; Hwang *et al.*, 2002).

El efecto significativo de los inhibidores de NOX en la viabilidad, generación de ROS y actividad de caspasa 3 en neuronas silvestres y deficientes en NOX2 indican la participación de otros homólogos distintos de NOX2 que son inhibidos por los diferentes inhibidores de NOX utilizados. En este sentido, se sabe que existen al menos 6 homólogos de NOX, NOX1 a 5 y DUOX1 y 2 (Lambeth, 2004; Bedard y Krause, 2008). Por lo que otra explicación podría ser que en las neuronas simpáticas sólo exista NOX2 mientras que en el SNC, más específicamente en las NGC existan otros miembros de la familia NOX, lo que concuerda con la distribución diferencial de estos homólogos según el tipo celular y la etapa del desarrollo (Cheng *et al.*, 2001; Bokoch y Knaus, 2003; Lambeth, 2004).

En este caso específico, el modelo de apoptosis de NGC por K5 es en el desarrollo, durante el cual la mayoría de los tejidos expresan las diferentes isoformas (Cheng *et al.*, 2001).

Lo anterior concuerda con lo observado en este trabajo, donde si bien se descarta la participación de NOX2 en la muerte apoptótica de las NGC inducida por K5, las evidencias con los inhibidores apuntan a una posible participación de otras NOX. Por otro lado, con base en los resultados de este trabajo es difícil descartar definitivamente la participación de NOX2 en la muerte apoptótica de las NGC, ya que podría ser que en condiciones normales NOX2 esté involucrada en el proceso de muerte, pero que al no estar presente pudiera ser compensada por otra NOX. En línea con estos resultados, en este estudio detectamos la presencia de otros miembros de la familia, NOX1, NOX3 y NOX4. Para conocer la participación de estos homólogos en la muerte apoptótica de estas neuronas es necesario inhibirlos específicamente, lo que se hizo utilizando ratones deficientes para cada uno de estos homólogos. De lo anterior se concluyó que ni NOX1, NOX3 ni NOX4 participan en la muerte inducida por K5 ni ST ya que las células de ratones deficientes en NOX1, NOX3 y NOX4 mueren de igual manera que las NGC

silvestres al ser tratadas con ambos estímulos apoptóticos.

Por esta razón, se evaluaron otras posibles fuentes de ROS en estas células bajo condiciones de K5 y encontramos que, a diferencia de la NOX, ni la xantina oxidasa ni la mitocondria parecen generar ROS que estén involucrados en la muerte de NGC inducida por K5. En este sentido, existen otros miembros de la familia NOX, las dual oxidasas o DUOX las cuales pueden estar presentes en las NGC y tener un papel en la muerte de estas células inducida por K5 o podría ser también una serie de compensaciones que se dan en los ratones deficientes al no estar presente todos los homólogos de NOX.

Finalmente, es pertinente aclarar que la inhibición de la mayoría de los parámetros evaluados no es completa, lo que sugiere la participación de vías intracelulares independientes de NOX y de estrés oxidante en los mecanismos de la muerte apoptótica de estas neuronas.

Por otro lado, se ha demostrado que las NGC que no reciben estimulación despolarizante inician un proceso degenerativo a partir de los 5 DIV (Gallo *et al.* 1987). En este caso, al no recibir esta estimulación despolarizante, las células tampoco maduran. En este trabajo encontramos que las NGC de ratones deficientes en NOX3 son resistentes a esta degeneración ya que su viabilidad se mantiene a lo largo de 14 DIV aún cuando las células son mantenidas en un medio con K5. De manera diferente, las NGC de ratones silvestres, sí mueren alrededor de los 7 DIV y continúan con este proceso de muerte hasta los 14 DIV cuando ya sólo observamos que alrededor de un 20% de las células es viable.

De lo anterior, concluimos que NOX3 participa en la muerte de las NGC inducida por la falta de estímulo despolarizante. En este sentido, también observamos que la participación de NOX3 en este proceso puede deberse a la producción de ROS por esta enzima. En NGC silvestres observamos que a lo largo del tiempo se observa una producción de ROS basal que aumenta sólo hasta el DIV 10, cuando se incrementa de manera significativa. Este aumento en la producción de ROS no se observa en el caso de las NGC NOX3 KO en ninguno de los tiempos evaluados, sugiriendo así que las NGC antes de morir producen una gran cantidad de ROS vía NOX3. Este podría ser una dato

relevante para el desarrollo posnatal del cerebelo de los ratones. En este sentido, los ratones deficientes de NOX3 presentan un desequilibrio debido a la falta de otoconias, las cuales se ha demostrado que no se forman al no estar presente NOX3 durante el desarrollo (Paffenholz *et al.*, 2004). Esta disfunción vestibular está caracterizada por trastornos motores, de coordinación, orientación y comportamiento. Sin embargo, estas alteraciones también podrían deberse a algún tipo de malformación en el cerebelo, para confirmar esta hipótesis se tendrían que hacer estudios *in vivo* durante el desarrollo posnatal del cerebelo a ratones deficientes en NOX3.

8.2 NOX participa en la regulación del decremento del volumen apoptótico y los flujos iónicos durante la apoptosis de neuronas granulares de cerebelo.

Se ha observado que el decremento del volumen celular es una característica apoptótica que podría representar un evento temprano en el programa de muerte (Bortner y Cidlowski, 1998; Maeno *et al.*, 2000). Un estudio previo de nuestro grupo demuestra que existe un decremento del volumen en NGC al ser tratadas con K5 y ST (Hernández-Enríquez y Morán, 2010), el cual se inicia en tiempos tempranos, alrededor de 5h, correlacionando con el tiempo de activación de NOX y la generación de ROS.

Se ha sugerido que las especies reactivas del oxígeno (ROS) pueden actuar como señales para la iniciación y ejecución del programa de muerte apoptótica neuronal. Como se mostró en la sección anterior, ocurre una generación temprana de ROS debida a la activación de NOX durante el proceso apoptótico en NGC (Coyoy *et al.*, 2008; Guemez-Gamboa y Morán, 2009). Además se sabe que la inducción de estrés oxidante produce muerte con características apoptóticas en estas células (Valencia y Morán 2004). Sin embargo, el detalle del mecanismo de acción de las ROS en la apoptosis se desconoce.

Debido a la falta de información acerca de los eventos proapoptóticos iniciadores, en particular los eventos señaladores alrededor de la activación de NOX y la producción de estrés oxidante, decidimos evaluar la posible relación entre estos procesos y el AVD, ya que ambos coinciden en el tiempo. En este estudio observamos que tanto

los antioxidantes como la inhibición de la actividad de NOX redujeron el AVD de NGC tratadas con K5 y ST, sugiriendo la participación de una NOX en la inducción del decremento del volumen celular.

Como se mencionó anteriormente, las NGC deficientes de NOX2 son resistentes a la muerte inducida por ST, pero no por K5, lo que concuerda con lo observado en el AVD inducido por ST pero no por K5, donde los inhibidores de NOX sí lo previenen, sugiriendo la participación de una NOX diferente a NOX2.

Por otra parte, se ha sugerido que durante la apoptosis se produce una activación de canales de K^+ relacionados con el volumen celular, ya que se ha observado que el bloqueo de algunas de estas corrientes inhibe la muerte celular. En este sentido, se ha sugerido que la salida de K^+ de la célula podría ser un mecanismo iónico permisivo para la progresión de la apoptosis (Yu *et al.*, 1999; Krick *et al.*, 2001; Lang *et al.*, 2003; Wei *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2006). También existen evidencias que indican la participación de los flujos Cl^- durante este proceso (Maeno *et al.*, 2000; Dezaki *et al.*, 2000; Small *et al.*, 2002). Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado la participación tanto de flujos de K^+ como de Cl^- en la apoptosis de las NGC, ya que los bloqueadores de canales iónicos inhiben la muerte inducida por K5 y ST (Franco-Cea *et al.*, 2004; Hernández-Enríquez y Morán 2010).

Para determinar con mayor precisión los mecanismos involucrados, se aplicaron bloqueadores de canales iónicos y se observó que éstos inhiben la generación de ROS y la actividad de NOX en NGC tratadas con K5 o ST. Sin embargo, los mecanismos específicos que intervienen en la muerte apoptótica inducida por ST parecen ser diferentes a los inducidos por K5 ya que, como se reportó previamente (Hernández-Enríquez *et al.*, 2010), en el caso de ST los bloqueadores de canales de K^+ no inhiben la muerte, el AVD ni generación de ROS mediada por la actividad de NOX. No obstante, el uso de bloqueadores de canales de Cl^- sí ejerce un efecto inhibitorio de la actividad de NOX y la generación de ROS en NGC inducidos por ST, lo que concuerda con la prevención de la muerte y del AVD. En el caso de K5 tanto los flujos de K^+ como de Cl^- participan en la activación de NOX, la subsecuente generación de ROS, el AVD y la

muerte apoptótica.

En este sentido, se ha sugerido que la actividad de NOX puede ser regulada por la actividad de canales de Cl⁻ sensibles a volumen en neutrófilos (Ahluwalia, J. 2008). Al parecer la actividad de las NOX genera una despolarización en la membrana de la célula, la cual inhibe su actividad. Este trabajo sugiere que los flujos de Cl⁻ podrían contrarrestar esta despolarización manteniendo así a la enzima activa. Igualmente los flujos de K⁺, podrían estar participando en mantener la actividad de NOX, aunque se ha sugerido que contribuyen de menor manera en contrarrestar esta despolarización que los flujos de Cl⁻.

En general, estos datos sugieren que los flujos iónicos pueden ser un evento previo a la activación de NOX y la generación de ROS, pero también indican que estos flujos iónicos pueden ser consecuencia de la actividad de NOX y la subsecuente producción de ROS. En este sentido, en trabajos previos se ha propuesto que los mecanismos de regulación de volumen podrían estar actuando al inicio del proceso de muerte (Bortner y Cidlowski, 1996; Maeno *et al.*, 2000), antes del episodio oxidante cuando aún no se observa AVD. Sin embargo, cuando ocurre la generación de ROS y la actividad de NOX, se promueve un aumento en los flujos iónicos que ya no pudiera ser contrarrestado por el funcionamiento de los mecanismos reguladores de volumen (Bortner y Cidlowski, 1996; Reinehr *et al.*, 2003), iniciándose así el decremento del volumen celular. Otra posibilidad sería una acción directa de las ROS alterando el mecanismo de regulación de volumen e iniciando el AVD. Esto concuerda con la observación de que una condición prooxidante (XaXO) produce muerte celular y AVD en estas células.

En otras preparaciones, se ha sugerido que el estrés oxidante y el estrés osmótico están estrechamente relacionados ya que, el encogimiento celular osmótico genera ROS (Reinehr *et al.*, 2003) y por otro lado, el estrés oxidante induce encogimiento celular debido a la apertura de canales de K⁺ (Saha *et al.*, 1993; Hallbrucker *et al.*, 1994; Diaz-Elizondo *et al.*, 2006), sin embargo no se menciona la fuente de este estrés oxidante.

Existen diferentes trabajos que proponen una posible relación entre la generación de ROS, la actividad de NOX, los flujos de Cl⁻ y el AVD en la muerte de distintas preparaciones celulares (Shimizu *et al.*, 2004; Varela *et al.*, 2004; Reinehr y Haussinger,

2007; Becker *et al.*, 2007). En uno se muestra que las ROS generadas por la actividad de NOX están involucradas directamente en la activación de canales rectificadores de Cl⁻ sensibles a volumen (VSOR) durante la apoptosis y el AVD de células epiteliales humanas (Shimizu *et al.*, 2004).

De lo anterior, se puede sugerir que en NGC después del tratamiento apoptótico se producen flujos iónicos tempranos que participan en la activación de NOX y producción de estrés oxidante, lo cual a su vez induce un incremento en los flujos iónicos facilitando así la disminución del volumen celular.

Esta posibilidad se apoya en los resultados donde se observa que la muerte apoptótica y el AVD se inhiben al bloquear los flujos iónicos dentro de las primeras horas, pero no después del tiempo en que la NOX se activa y se generan las ROS. Esto indicaría que la generación de ROS vía la actividad de NOX es un punto determinante para el desencadenamiento de la maquinaria apoptótica, entre ellos el incremento en la activación de flujos iónicos y el AVD.

En conjunto, estos datos sugieren que existe una relación entre el estrés oxidante generado por la activación de NOX, los flujos iónicos y AVD lo cual podría constituir un sistema de retroalimentación que aseguraría el progreso de la muerte apoptótica.

8.3 p38 participa en la activación de NOX durante la muerte apoptótica de neuronas granulares de cerebelo en cultivo.

Como se mencionó anteriormente, p38 es una MAPK involucrada en el proceso de apoptosis en diferentes preparaciones. Se ha observado que la muerte celular inducida por K5 y ST en NGC se previno por la inhibición de la activación de p38, lo que concuerda con el hecho de que en ambas condiciones p38 se activa (Ramiro-Cortés *et al.*, en preparación), como se había reportado previamente en diferentes modelos de muerte (Yamagishi *et al.*, 2003; Porras *et al.*, 2004; D'Alimonte *et al.*, 2007). Además sugerimos que p38 participa en la muerte apoptótica pues previene la actividad de caspasa 3 y la condensación nuclear inducida por K5 y ST (Ramiro-Cortés *et al.*, en preparación).

También en nuestro grupo hemos demostrado que JNK, otra MAPK se activa en respuesta a estrés oxidante en el caso del estímulo de K5, sin embargo no en el caso de ST, donde a pesar de existir una producción de ROS, ésta no activa a JNK (Ramiro-Cortés y Morán, 2009), sugiriendo una activación diferencial de las MAPK según el estímulo apoptótico.

En este trabajo tratamos de dilucidar si p38 se activa antes o después del estrés oxidante producido por la actividad de NOX inducida tanto por K5 como por ST. Antecedentes han mostrado que la generación de estrés oxidante puede inducir la activación de p38, promoviendo así la apoptosis en diferentes modelos celulares (Zhuang *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2003; Gómez-Lázaro *et al.*, 2007), asimismo, se ha demostrado que la activación de p38 puede ser prevenida por el uso de antioxidantes (Hong *et al.*, 2009).

En NGC tratadas con K5 observamos que las ROS se generan río arriba de la activación de p38, pues la inhibición de esta activación no disminuye las ROS producidas por K5, sin embargo resultados preliminares muestran que el uso de antioxidantes disminuye la activación de p38 (Ramiro-Cortés *et al.*, en preparación), sugiriendo que el estrés oxidante podría promover la activación de p38 en NGC tratadas con K5.

Por el contrario, se observó que la inhibición de p38 sí disminuye el estrés oxidante inducido por ST, sugiriendo a p38 como un posible regulador de la generación de ROS. En este sentido, recientemente se ha reportado que p38 induce la activación de NOX en astrocitos cuando son tratados con lipopolisacáridos (Yoo *et al.*, 2008), lo que apoya los resultados donde se muestra que la inhibición de p38 previene la activación de NOX inducida por ST.

Esto se apoya, a su vez, en los resultados que muestran que la actividad de p38 tiene un tiempo crítico para la muerte, el cual coincide con la activación de la NOX y la subsecuente producción de ROS. Es decir, aunque p38 se active después del estímulo por ST a partir de los 45 min, esta actividad no es suficiente para que se lleve a cabo la apoptosis. Sin embargo si p38 se inhibe después de este tiempo, alrededor de las 5h, cuando también se sabe que permanece activa, las neuronas ya no se pueden rescatar de la muerte, sugiriendo que p38 activa un componente esencial para la progresión de la

muerte apoptótica de las NGC inducida por ST, el cual podría ser la actividad de NOX debido a que coincide en el tiempo y en este trabajo mostramos que la inhibición de p38 también inhibe la actividad de NOX.

Todos los resultados descritos en este trabajo apoyan la idea de que aunque tanto el K5 como la ST inducen la muerte apoptótica de las NGC, lo hacen por diferentes mecanismos, sin embargo, comparten puntos clave, como la generación de ROS vía la activación de NOX.

En este sentido, los homólogos de NOX participan en la muerte apoptótica de NGC de manera diferencial según el estímulo. En cualquier caso, las NOX parecen regular mecanismos intracelulares fundamentales para la progresión de la muerte apoptótica de estas neuronas.

CONCLUSIONES

- NOX2 participa en la muerte apoptótica de las NGC inducida por ST, pero no en la inducida por K5.
- El uso de inhibidores de NOX disminuye tanto la muerte neuronal como la activación de caspasa-3 inducida por K5, sugiriendo la participación de otros homólogos de NOX en este proceso.
- NOX2 es el homólogo indispensable para la apoptosis inducida por ST, ya que NOX1, NOX3 y NOX4 no participan en la muerte apoptótica de las NGC inducida por K5 ni por ST.
- NOX3 participa en la muerte de las NGC que son cultivadas crónicamente en un medio con condiciones no despolarizantes (bajo potasio).
- La generación de ROS vía la actividad de NOX es importante para la progresión de la muerte apoptótica de las NGC, ya que regulan procesos importantes como el AVD.
- La actividad de NOX está regulada a su vez por los flujos iónicos que también promueven la disminución de volumen, sugiriendo un ciclo de retroalimentación entre éstos y el estrés oxidante producido por NOX para asegurar la muerte neuronal.
- p38 participa en la activación de NOX regulando de esta forma la generación de ROS inducida por ST y por lo tanto la muerte apoptótica en estas neuronas.
- Los homólogos de NOX participan en la muerte apoptótica de NGC de manera diferencial según el estímulo, pero en ambos casos regulan mecanismos intracelulares fundamentales para la progresión de la muerte apoptótica de estas neuronas.

REFERENCIAS

1. Abramov AY, Canevari L, Duchen MR. 2004. Beta-amyloid peptides induce mitochondrial dysfunction and oxidative stress in astrocytes and death of neurons through activation of NADPH oxidase. *J. Neurosci.*, 24: 565-575.
2. Abramov AY, Duchen, MR. 2005. The role of an astrocytic NADPH oxidase in the neurotoxicity of amyloid beta peptides. *Phil. Trans. Soc. B.*, 360: 2309-2314.
3. Ahluwalia J. 2008 Chloride channels activated by swell can regulate the NADPH oxidase generated membrane depolarization in activated human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun.* 365:328-33.
4. Alavez S, Pedroza D, Morán J. 2003. Mechanisms of cell death by deprivation of depolarizing conditions during cerebellar granule neurons maturation. *Neurochem Int.* 43:581-590.
5. Arbiser JL, Petros J, Klafter R, Govindajaran B, McLaughlin ER, Brown LF, Cohen C, Moses M, Kilroy S, Arnold RS, Lambeth JD. 2002, Reactive oxygen generated by Nox1 triggers the angiogenic switch. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99: 715-720.
6. Atabay C, Cagnoli E, Ikonovic M, Manev H. 1996. Removal of serum from primary cultures of cerebellar granule neurons induced oxidative stress and DNA fragmentation: protection with antioxidants and glutamate receptor antagonist. *J. Neurosci Res.* 43:465-475.
7. Atlante A, Gagliardi S, Marra E, Calissano P. 1998. Neuronal apoptosis in rats is accompanied by rapid impairment of cellular respiration and is prevented by scavengers of reactive oxygen species. *Neurosci Lett*, 245: 127-130.
8. Babior BM, Lambeth JD, Nauseef W. 2002. The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys*, 397: 342-244.
9. Baker MA, Aitken RJ. 2004. The importance of redox regulated pathways in sperm cell biology. *Mol Cell Endocrinol.* 216: 47-54
10. Banfi B, Molnar G, Maturana A, Steger K, Hegedus B, Demareux N, Krause KH. 2001. A Ca²⁺-activated NADPH oxidase in testis, spleen and lymph nodes. *J. Biol. Chem.* 276: 37594-37601.
11. Bedard K, Krause KH. 2007. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev* 87:245-313.
12. Becker S, Reinehr, R. 2007. Hydrophobic bile salts induce hepatocyte shrinkage via NADPH oxidase activation. *Cell Physiol Biochem.* 19: 89-98.
13. Benson RSP, Heer, S. 1996. Characterization of cell volume loss in CEM-C7A cell during dexamethasone-induced apoptosis. *Am. J. Physiol.* 39: 1190-1203.
14. Bortner CD, Hughes FM Jr. 1997. A primary role for K⁺ and Na⁺ efflux in the activation of apoptosis. *J Biol Chem.* 272: 32436-32442.
15. Bortner CD, Cidlowski JA. 1998. A necessary role for cell shrinkage in apoptosis. *Biochemical Pharmacology.* 56:1549-1559.
16. Brandes, RP. 2003. Role of NADPH oxidases in the control of vascular gene expression. *Antiox. Redox Signal.* 5: 803-811.
17. Brar SS, Corbin Z, Kennedy TP, Hemendinger R, Thornton L, Bommarius B, Arnold RS, Whorton AR, Sturrock AB, Huecksteadt TP, Quinn MT, Krenitsky K, Ardie KG, Lambeth JD, Hoidal JR. 2003. Nox 5 NAD(P)H oxidase regulates growth and apoptosis in DU145 prostate cancer cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol*, 285:C353-C369.
18. Bredesen DE, Rao RE, Mehelen P. 2006. Cell death in the nervous system. *Nature.* 443: 796-802.
19. Burek MJ, Openheim RW. 1996. Programmed cell death in the developing nervous system. *Brain Pathol.* 6:427-446.
20. Caballero-Benítez A, Morán J. 2003. Caspase activation pathways induced by staurosporine and low potassium: Role of caspase-2. *J. Neurosci. Res.* 71 :383-396.
21. Castilho R, Manus W, Nicholls D. 1999. Oxidative stress, mitochondrial function and acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *J. Neurochem*, 72:1394-1401.
22. Clark RA, Epperson TK, Valente AJ. 2004. Mechanisms of activation of NADPH oxidases. *Jpn. J. Infect. Dis.* 57:S22-S23.
23. Chang L, Karin M. 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature.* 410:37-40.
24. Cheng G, Cao Z, Xu X, van Meir EG, Lambeth JD. 2001. Homologs of gp91 phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4 and Nox5. *Gene*, 269: 131-140.
25. Choi SH, Lee DY, Kim SU, Jin BK. 2005. Thrombin-induced oxidative stress contributes to the death of hippocampal neurons in vivo: role of microglial NADPH oxidase. *J. Neurosci.*, 25: 4082-4090.

26. Coyoy A, Valencia A, Guemez-Gamboa A, Moran J. 2008. Role of NADPH oxidase in the apoptotic death of cultured cerebellar granule neurons. *Free Radic Biol Med.* 45: 1056-1064.
27. Cross AR, Segal AW. 2004. The NADPH oxidase of professional phagocytes prototype of the NOX electron transport chain systems. *Biochim Biophys Acta.* 1657:1–22.
28. D'Alimonte I, Ballerini P, Nargi E, Buccella S, Giuliani P, Di Iorio P. 2007. Staurosporine-induced apoptosis in astrocytes is prevented by A1 adenosine receptor activation. *Neurosci Lett.* 418:66-71.
29. Danial NN, Korsmeyer SJ. 2004. Cell death: critical control points. *Cell.* 116:205-19.
30. Díaz-Elizondo J, Chiong M. 2006. Reactive oxygen species inhibit hyposmotic stress-dependent volume regulation in cultured rat cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 350:1076-1081.
31. DerMardirossian C, Schnelzer A, Bokoch GM. 2004. Phosphorylation of RhoGDI by Pak1 mediates dissociation of Rac GTPase. *Mol Cell* 15:117–127.
32. Desouki MM, Kulawiec M, Bansal S, Das GM, Singh KK. 2005. Cross talk between mitochondria and superoxide generating NADPH oxidase in breast and ovarian tumors. *Cancer Biol Ther.* 4: 1367-73.
33. Dezaki K, Maeno E. 2000. Fluorescent measurements of intracellular Cl concentration during cell apoptosis. *Jpn J. Physiol.* 50:897-906.
34. Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. 1997. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 388:300–304.
35. Dvorakova, M., Hohler, B., Richter, E., Burrirt, J.B., Kummer, W. 1999. Rat sensory neurons contain cytochrome b558 large subunit immunoreactivity. *Neuroreport*, 10: 2615-2617.
36. Edens WA, Sharling L, Cheng G, Shapira R, Kinkade JM, Lee T, Edens HA, Tang X, Sullards C, Flaherty DB. 2001. Tyrosin cross-linking of extracellular matrix is catalyzed by Duox, a multidomain oxidase/peroxidase with homology to the phagocyte oxidase subunit gp91phox. *J. Cell. Biol.* 154:879-891.
37. Facchinetti F, Dawson VL, Dawson TM. 1998. Free radicals as mediators of neuronal injury. *Cell Mol. Neurobiol.* 18:667-82.
38. Fontayne A, My-Chan Dang P, Gougerot-Pocidallo M, Benna J. 2002. Phosphorylation of p47phox sites by PKC α , β II, and ζ : effect on binding to p22phox and on NADPH oxidase activation. *Biochem.* 41:7743-7750.
39. Franco-Cea A, Valencia A, Morán J. 2004. Role of ionic fluxes in the apoptotic cell death of cultured cerebellum granule neurons. *Neurochem Res.* 29:227-238.
40. Friedlander RM, Brown RH, Gagliardini V, Wang J, Yuan J. 1997. Inhibition of ICE slows ALS in mice. *Nature* 388: 31.
41. Friedlander RM. 2003. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *N. Engl. J. Med.* 348:1365–1375.
42. Gallo V, Kingsbury A, Balázs R, Jorgensen OS. 1987. The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J. Neurosci.* 7: 2203-2213.
43. Geiszt M, Kopp JB, Varnai P, Leto TL. 2000. Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 8010-8014.
44. Geiszt M, Leto TL. 2004. The Nox family of NAD(P)H oxidases: Host defense and beyond. *J. Biol. Chem.*, 279: 51715.
45. Gerhardt E, Kügler S, Leist M, Beier C, Berliochi L, Volbracht C, Weller M, Bähr M, Nicotera P, Schulz JB. 2001. Cascade of caspase activation in potassium-deprived cerebellar granule neurons: targets for treatment with peptide and protein inhibitors of apoptosis. *Mol Cell Neurosci*, 17: 717-731.
46. Goldman EH, Chen L, Fu H. 2004. Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 by reactive oxygen species through dephosphorylation at serine 967 and 14-3-3 dissociation. *J Biol Chem.* 279:10442-10449.
47. Gomez-Lazaro M, Galindo MF, Melero-Fernandez de Mera RM, Fernandez-Gomez FJ, Concannon CG, Segura MF. 2007. Reactive oxygen species and p38 mitogen-activated protein kinase activate Bax to induce mitochondrial cytochrome c release and apoptosis in response to malonate. *Mol Pharmacol.* 71:736-743.
48. Guemez-Gamboa A, Moran J. 2009. NOX2 mediates apoptotic death induced by staurosporine but not by potassium deprivation in cerebellar granule neurons. *J Neurosci Res.* 87:2531-2540.
49. Guo Q, Sebastian L, Sopher BL, Miller MW, Ware CB, Martin GM, Mattson MP. 1999. Increased vulnerability of hippocampal neurons from presenilin-1 mutant knock-in mice to amyloid beta-peptide toxicity: central roles of superoxide production and caspase activation. *J. Neurochem.* 72: 1019-1029.
50. Green DR, Reed JC. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science.* 281:1309–1312.
51. Green DG, Beere HM. 2001. Mostly dead. *Nature.* 412: 133-134.
52. Groemping Y, Lapouge K, Smerdon SJ, Rittinger K. 2003. Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase. *Cell.* 113: 343-355.
53. Groemping Y, Rittinger K. 2005. Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *Biochem J.* 386: 401-416.

54. Hallbrucker C, vom Dahl S. 1994. Effects of urea on K⁺ fluxes and cell volume in perfused rat liver. *Pflugers Arch.* 428:552-560.
55. Halliwell B. 1992. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem.* 59:1609-1623.
56. Ham J, Babij C, Whitfield J, Pfarr CM, Lallemand D, Yaniv M, et al. A c-Jun dominant negative mutant protects sympathetic neurons against programmed cell death. *Neuron.* 1995 May;14(5):927-39.
57. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. 2000. *Nature* 407: 770–776.
58. Hernandez-Enríquez B, Arellano RO, Morán J. 2010. Role for ionic fluxes on cell death and apoptotic volume decrease in cultured cerebellar granule neurons. *Neurosciences.* En prensa.
59. Heyworth PG, Curnutte JT, Nauseef WM. 1991. Neutrophil NADPH oxidase assembly. Membrane translocation of p47-phox and p67-phox requires interaction between p47-phox and cytochrome b558. *J Clin Invest.* 87:352–356.
60. Higuchi Y. 2004. Glutathione depletion-induced chromosomal DNA fragmentation associated with apoptosis and necrosis. *J. Cell. Mol. Med.*, 8: 455-464.
61. Hong JT, Yen JH, Wang L, Lo YH, Chen ZT, Wu MJ. 2009. Regulation of heme oxygenase-1 expression and MAPK pathways in response to kaempferol and rhamnocitrin in PC12 cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 237:59-68.
62. Hwang JJ, Choi SY, Koh JY. 2002. The role of NADPH, neuronal nitric oxide synthase and poly(ADPribose) polymerase in oxidative neuronal death induced in cortical cultures by brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin 4/5. *J. Neurochem.* 82: 894-902.
63. Ibi M, Katsuyama M, Fan C, Iwata K, Nishinaka T, Yokoyama T, Yabe-Nishimura C. 2006. NOX1/NADPH oxidase negatively regulates nerve growth factor-induced neurite outgrowth. *Free Radic Biol Med.* 40: 1785-1795.
64. Ichijo H, Nishida E, Irie K, ten Dijke P, Saitoh M, Moriguchi T. 1997. Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science.* 275:90-94.
65. Johnson GL, Lapadat R. 2002. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science.* 298:1911-1912.
66. Kane DJ, Sarafian TA, Anton R, Hahn H, Gralla EB, Valentine JS, Ord T, Bredesen DE. 1993. Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science,* 262: 1274-1277.
67. Kim SH, Won SJ, Sohn S, Kwon HJ, Lee JY, Park JH, Gwag BJ. 2002. Brain-derived neurotrophic factor can act as a proneurotrophic factor through transcriptional and translational activation of NADPH oxidase. *J Cell Biol.* 159:821-31.
68. Kishida KT, Pao M, Holland SM, Klann E. 2005. NADPH oxidase is required for NMDA receptor-dependent activation of ERK in hippocampal area CA1. *J. Neurochem.* 94: 299-306.
69. Kostic V, Jackson-Lewis V, de Bilbao F, Dubois-Dauphin M, Przedborski S. 1997. Bcl-2: prolonging life in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science.* 277:559–562.
70. Kowaltowsky AJ y Vercesi AE. 1999. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 26:463-471.
71. Krause KH. 2004. Tissue distribution and putative physiological function of NOX family NADPH oxidases. *Jpn. J. Infect. Dis.* 57, S28-9.
72. Krick S, Platoschyn O. 2001. Activation of K⁺ channels induces apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 280:C970-979.
73. Krishna M, Narang H. 2008. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. *Cell Mol Life Sci.* 65:3525-44.
74. Kroemer G. 1998. The mitochondrion as an integrator/coordinator of cell death pathways. *Cell Death Differ.* 5:547.
75. Kroemer, G., Dallaporta B, Resche-Rigon, M. 1998. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu. Rev. Physiol.* 60:619-642.
76. Kuan CY, Yang DD, Samanta Roy DR, Davis RJ, Rakic P, Flavell RA. 1999. The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. *Neuron.* 22:667-76.
77. Lambeth JD. 2004. Nox enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature,* 4:181-189.
78. Lambeth, J.D., Kawahara, T., Diebold, B. 2007. Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression. *Free Rad Biol Med.* 43: 319-331.
79. Lang PA, Kaiser S. 2003. Role of Ca²⁺-activated K⁺ channels in human erythrocyte apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 285:C1553-1560.

80. Lee HJ, Ban JY, Seong YH. 2005. Blockade of 5-HT(3) receptor with MDL7222 and Y25130 reduces hydrogen peroxide-induced neurotoxicity in cultured rat cortical cells. *Life Sci.*, 78: 294-300.
81. Ma L, Zhou J. 2006. Dopamine promotes the survival of embryonic striatal cells: involvement of superoxide and endogenous NADPH oxidase. *Neurochem. Res.* 31:463-474.
82. Maeno E, Ishizaki Y. 2000. Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci* 97: 9487-92.
83. Mander PK, Jekabsons A, Brown GC. 2006. Microglia proliferation is regulated by hydrogen peroxide from NADPH oxidase. *J Immunol.* 176:1046-52
84. Matsukawa J, Matsuzawa A, Takeda K, Ichijo H. 2004. The ASK1-MAP kinase cascades in mammalian stress response. *J Biochem.* 136:261-265.
85. Martín-Romero FJ, García-Martín E, Gutierrez-Merino C. 2002. Inhibition of oxidative stress produced by plasma membrane NADH oxidase delays low-potassium-induced apoptosis of cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* 72: 705-715.
86. Martinou JC. 1999. Apoptosis. Key to the mitochondrial gate. *Nature.* 399:411-412.
87. Mizuki K, Kadomatsu K, Hata K, Ito T, Fan QW, Kage Y, Fukumaki Y, Sakaki Y, Takeshige K, Sumimoto, H. 1998, Functional modules and expression of mouse p40(phox) and p67(phox), SH3-domain-containing proteins involved in the phagocyte NADPH oxidase complex. *Eur J. Biochem*, 251: 573-582.
88. Morán J, Patel AJ. 1989a. Effect of potassium depolarization on phosphate-activated glutaminase activity in primary cultures of cerebellar and granule neurons and astroglial cells during development. *Dev Brain Res*, 46: 97-105.
89. Morán J, Itoh T, Reddy U, Chen M, Alnemri E, Pleasure D. 1999. Caspase-3 expression by cerebellar granule neurons is regulated by calcium and cyclic AMP. *J Neurochem*, 73:568-577.
90. Moran J, Hernandez-Pech E et al. 2000. Release of taurine in apoptotic cerebellar granule neurons in culture. *Eur J. Physiol.* 439: 270-77.
91. Moreno JC, Bikker H, Kempers MJ, van Trotsenburg AS, Baas F, de Vijlder JJ, Vulsma T, Ris-Staplers C. 2002. Inactivating mutations in the gene for thyroid oxidase 2 (THOX2) and congenital hypothyroidism. *N. Engl. J. Med.* 347: 95-102.
92. Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T, Yasuhiko Y. 2002. An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J. Biol. Chem.* 277 : 34287-34294.
93. Nardi N, Avidan G, Daily D, Zilkha-Falb R, Barzilai A. 1997. Biochemical and temporal analysis of events associated with apoptosis induced by lowering the extracellular potassium concentration in mouse cerebellar granule neurons. *J neurochem.* 68: 750-759.
94. Nauseef WM. 2004. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase. *Histochem Cell Biol* 122:277-291.
95. Nauseef WM. 2008. Nox enzymes in immune cells. *Semin Immunopathol.* 30:195-208.
96. Nicholls DG, Budd SL. 2000. Mitochondria and neuronal survival. *Physiol Rev.* 1: 315-360.
97. Nijhawan D, Honarpour N, Wang X. 2000. Apoptosis in neural development and disease. *Annu Rev Neurosci.* 23:73-87.
98. Nikolova S, Lee YS, Lee Y, Kim J. 2005. Rac1-NADPH oxidase-regulated generation of reactive oxygen species mediates glutamate-induced apoptosis in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Free Radic. Res.*, 39: 1295.
99. Nisimoto Y, Motalebi S, Han CH. 1999. The p67phox activation domain regulates electron flow from NADPH to flavin in flavocytochrome b558. *J Biol Chem* 274:22999-23005.
100. Noh K, Koh J. 2000. Induction and activation by zinc of NADPH oxidase in cultured cortical neurons and astrocytes. *J Neurosci.* 20:RC111.
101. Okada Y, Maeno E. 2001. Apoptosis, cell volume regulation and volume regulatory chloride channels. *Comp Biochem and Physiol.* Part A.130:377-383.
102. Ona VO, Li M, Vonsattel JP, Andrews LJ, Khan SQ, Chung WM, Frey AS, Menon AS, Li XJ, Stieg PE, Yuan J, Penney JB, Young AB, Cha JH, Friedlander RM. 1999. Inhibition of caspase-1 slows disease progression in a mouse model of Huntington's disease. *Nature* 399:263-267.
103. Oppenheim, R., Prevette, D., Tytell, M., Homma, S. 1990. Naturally occurring and induced neuronal death in the chick embryo in vivo requires protein and RNA synthesis: evidence for the role of cell death genes. *Dev Biol*, 138:104.
104. Paffenholz R, Bergstrom RA, Pasutto F, Wabnitz P, Munroe RJ, Jagla W, Heinzmann U, Marquardt A, Bareiss A, Laufs J. 2004. Vestibular defects in head-tilt mice result from mutations in Nox3, encoding a NADPH oxidase. *Genes Dev.* 18: 486-491.

105. Paravicini TM, Sobey CG. 2003. Cerebral vascular effects of reactive oxygen species: recent evidence for a role of NADPH-oxidase. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 11:855-859.
106. Pimienta G, Pascual J. 2007. Canonical and alternative MAPK signaling. *Cell Cycle.* 6:2628-32.
107. Pollock JD, Williams DA, Gifford MA, Li LL, Du X, Fisherman J, Orkin SH, Doerschuck CM, Dinauer MC. 1995. Mouse model of X-linked chronic granulomatous disease, an inherited defect in phagocyte superoxide production. *Nat Genet.* 9:202-209.
108. Porras A, Zuluaga S, Black E, Valladares A, Alvarez AM, Ambrosino C. 2004. p38 alpha mitogen-activated protein kinase sensitizes cells to apoptosis induced by different stimuli. *Mol Biol Cell.* 15:922-33.
109. Raman M, Chen W, Cobb MH. 2007. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene.* 26:3100-3112.
110. Reinehr R, Schliess F. 2003. Hyperosmolarity and CD95L trigger CD95/EGF receptor association and tyrosine phosphorylation of CD95 as prerequisites for CD95 membrane trafficking and DISC formation. *FASEB J.* 17:731-733.
111. Reinehr R, Haussinger D. 2007. CD95 activation in the liver: ion fluxes and oxidative signaling. *Arch Biochem Biophys.* 464: 124-131.
112. Rowan MJ, Klyubin I, Wang Q, Anwyl R. 2004. Mechanisms of the inhibitory effects of amyloid beta-protein on synaptic plasticity. *Exp. Gerontol.* 39, 1661-1667.
113. Saha N, R Schreiber. 1993. Endogenous hydroperoxide formation, cell volume and cellular K⁺ balance in perfused rat liver. *Biochem J.* 296:701-707.
114. Sakaguchi N, Inoue M, Ogihara Y. 1998. Reactive oxygen species and intracellular Ca²⁺, common signals for apoptosis induced by gallic acid. *Biochem Pharmacol.* 55: 1973-1981.
115. Sarfstein R, Gorzalczyk Y, Mizrahi A. 2004. Dual role of rac in the assembly of NADPH oxidase: tethering to the membrane and activation of p67phox. *J Biol Chem* 279:16007-16016.
116. Sastry PS, Rao KS. 2000. Apoptosis and the nervous system. *J. Neurochem.* 74:1-20.
117. Satoh T, Numakawa T, Abiru Y, Yamagata T, Ishikawa Y, Enokido Y, Hataatanaka H. 1998. Production of reactive oxygen species and release of L-glutamate during superoxide anion-induced cell death of cerebellar granule neurons. *J. Neurochem.* 70: 316-324.
118. Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J. 2001. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem.* 11:173-186.
119. See V, Loeffler JP. 2001. Oxidative stress induces neuronal death by recruiting a protease and phosphatase-gated mechanism. *J. Biol. Chem.*, 276: 35049-35059.
120. Serrano F, Kolluri NS, Wientjes, FB, Card JP, Klann E. 2003. NADPH oxidase immunoreactivity in the mouse brain. *Brain Res.*, 988: 193-198.
121. Seung LB, InHwa B, Yun SB, Hong-Duck U. 2006. Link between Mitochondria and NADPH Oxidase 1 Isozyme for the Sustained Production of Reactive Oxygen Species and Cell Death. *J Biol Chem.* 281:36228-36235.
122. Séverine B, Don W. Cleveland. 2008. Revisiting oxidative damage in ALS: microglia, Nox, and mutant SOD1. *J Clin Invest* 2: 474-478.
123. Shimizu T, Numata T. 2004. A role of reactive oxygen species in apoptotic activation of volume-sensitive Cl(-) channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 6770-6773.
124. Sies H. 1985. Oxidative stress: introductory remarks, H. Sies (Ed.), Academic Press, London.
125. Schulz JB, Weller M, Klockgether T. 1996. Potassium deprivation-induced apoptosis in cerebellar granule neurons: a sequential requirement for new mRNA and protein synthesis, ICE-like protease activity and reactive oxygen species. *J. Neurosci.* 16: 4696-4706.
126. Shiose A, Kuroda J, Tsuruya K, Hirai M, Hirakata H, Naito S, Hattori M, Sakaki Y, Sumimoto H. 2001. A novel superoxide-producing NAD(P)H oxidase in kidney. *J Biol. Chem.* 276: 1417-1423.
127. Shimizu T, Numata T. 2004. A role of reactive oxygen species in apoptotic activation of volume-sensitive Cl(-) channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:6770-6773.
128. Shpungin S, Dotan I, Abo A, Pick E. 1989. Activation of the superoxide forming NADPH oxidase in a cell-free system by sodium dodecyl sulphate: absolute lipid dependence of the solubilized enzyme. *J. Biol. Chem.* 264: 9195-9203.
129. Small DL, Tauskela J. 2002. Role for chloride but not potassium channels in apoptosis in primary rat cortical cultures. *Neurosci Lett.* 334: 95-98.
130. Sorce S, Krause KH. 2009. NOX enzymes in the central nervous system: from signaling to disease. *Antioxid Redox Signal.* 11:2481-2504.

131. Stadtman ER, Levine RL. 2003. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*, 25: 207-218.
132. Tammariello S, Quinn M, Estus S. 2000. NADPH contributes directly to oxidative stress and apoptosis in nerve growth factor-deprived sympathetic neurons. *J Neurosci*, 20:1-5.
133. Tejada-Simon MV, Serrano F, Villasana LE, Kanterewicz BI, Wu GY, Quinn MT, Clan E. 2005, *Mol. Cell. Neurosci.*, 29, 97.
134. Thornberry NA. 1994. Interleukin-1 beta converting enzyme. *Meth Enzymol.* 244:615-131.
135. Thornberry NA, Lazebnik Y. 1998. Caspases: enemies within. *Science*. 281: 1312-1316.
136. Valencia A, Morán J. 2001. Role of oxidative stress in the apoptotic cell death of cultured cerebellar granule neurons. *J. Neurosci. Res*, 64: 284-297.
137. Valencia A, Moran J. 2004. Reactive oxygen species induces different cell death mechanisms in cultured neurons. *Free Rad Biol Med.* 36: 1112-1125.
138. Vallet P, Charnay Y, Steger K, Ogier-Denis E, Kovari E, Hermann F, Michel JP, Szanto I. 2005. Neuronal expression of the NADPH oxidase Nox4, and its regulation in mouse experimental brain ischemia. *Neurosci.* 132:233-238.
139. Varela D, Simon F. 2004. NAD(P)H oxidase-derived H₂O₂ signals chloride channel activation in cell volume regulation and cell proliferation. *J Biol Chem.* 279: 13301-4.
140. Walder CE. 1997. Ischemic stroke injury is reduced in mice lacking a functional NADPH oxidase. *Am Heart Ass.* 28:2252-2263.
141. Wang JY, Shum AY, Ho YJ. 2003. Oxidative neurotoxicity in rat cerebral cortex neurons: synergistic effects of H₂O₂ and NO on apoptosis involving activation of p38 mitogen-activated protein kinase and caspase-3. *J Neurosci Res.* 72:508-519.
142. Wei L, Xiao AY. 2004. Effects of chloride and potassium channel blockers on apoptotic cell shrinkage and apoptosis in cortical neurons. *Pflugers Arch* 448: 325-34.
143. Yamagishi S, Matsumoto T, Yokomaku D, Hatanaka H, Shimoke K, Yamada M. 2003. Comparison of inhibitory effects of brain-derived neurotrophic factor and insulin-like growth factor on low potassium-induced apoptosis and activation of p38 MAPK and c-Jun in cultured cerebellar granule neurons. *Brain Res Mol Brain Res.* 119:184-91.
144. Yang F, Sun X, Beech W, Teter B, Wu S, Sigel J, Vinters HV, Frautschy SA, Cole GM. 1998. Antibody to caspase-cleaved actin detects apoptosis in differentiated neuroblastoma and plaque-associated neurons and microglia in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 152: 379-389.
145. Yang S, Madyastha P, Bingel S, Ries W, Key L. 2001. A new superoxide-generating oxidase in murine osteoclasts. *J Biol. Chem.* 276: 5452-5458.
146. Yoo BK, Choi JW, Shin CY, Jeon SJ, Park SJ, Cheong JH, et al. 2008. Activation of p38 MAPK induced peroxynitrite generation in LPS plus IFN-gamma-stimulated rat primary astrocytes via activation of iNOS and NADPH oxidase. *Neurochem Int.* 52:1188-1197.
147. Yu SP, Yeh C. 1999. NMDA receptor-mediated K⁺ efflux and neuronal apoptosis. *Science* 284:336-9.
148. Zhang HT, Wu J. 2006. Efflux of potassium ion is an important reason of HL-60 cells apoptosis induced by tachyplesin. *Acta Pharmacol Sin.* 27:1367-1374.
149. Zhuang S, Lynch MC, Kochevar IE. 1998. Activation of protein kinase C is required for protection of cells against apoptosis induced by singlet oxygen. *FEBS Lett.*, 437: 158-162.
150. Zhuang S, Demirs JT, Kochevar IE. 2000. p38 mitogen-activated protein kinase mediates bid cleavage, mitochondrial dysfunction, and caspase-3 activation during apoptosis induced by singlet oxygen but not by hydrogen peroxide. *J Biol Chem.* 275:25939-25948.
151. Zhuang S, Demirs JT, Kochevar IE. 2001. Protein kinase C inhibits singlet oxygen-induced apoptosis by decreasing caspase-8 activation. *Oncogene*, 20: 6764-6776.

ROS generation is related to ionic fluxes and apoptotic volume decrease of cultured granule neurons: role of NOX enzymes

Hernández-Enríquez Berenice^Δ, Guemez-Gamboa Alicia^Δ and Morán Julio*
División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, UNAM

^ΔThese authors equally contributed to this work.

Reactive oxygen species (ROS) are produced during apoptosis of cerebellar granule neurons (CGN) induced by low potassium (K5) or staurosporine (Sts). In addition, K5 and Sts activate NADPH oxidases (NOX). Recently, we described that K5 and Sts produce apoptotic volume decrease (AVD) starting at a similar time than ROS generation and NOX activity. In the present study we evaluated a possible relationship between ROS generation and ionic fluxes during AVD. We showed that K5- and Sts-induced AVD was inhibited by antioxidants and that direct ROS production induced AVD. Moreover, NOX inhibitors eliminated AVD induced by both K5 and Sts. However, Sts failed to induce AVD in CGN from NOX2 knockout mice. These findings suggest that K5- and Sts-induced AVD in CGN is largely mediated by ROS produced mainly by NOX. On the other hand, it is known that ionic fluxes are involved in AVD and in the progression of the apoptotic death of CGN. Here we found that the blockage of ionic fluxes inhibited ROS generation and NOX activity. These findings suggest that ROS generation and NOX activity could be involved in ionic fluxes activation that in turn could participate in the reactivation of NOX, leading to a self-amplifying cycle.

Keywords: apoptosis; low potassium; staurosporine; reactive oxygen species; ionic fluxes; NADPH oxidase

Introduction

Reactive oxygen species (ROS) may act as signaling molecules for the initiation and execution of apoptotic program in neuronal cell death. This is supported by evidences showing an early generation of ROS during apoptosis and that antioxidants prevent cell death of cultured neurons [1-5]. The exact mechanism of action involving ROS during neuronal death remains unclear. A source of ROS in mammalian cells is NADPH oxidase (NOX), originally identified in neutrophils. Recently, it was demonstrated that NADPH oxidase has several homologues expressed in a wide variety of non-phagocytic cells, termed NOX1 to 5 (for NADPH oxidase) [7, 8]. It has been suggested that NOX enzymes generate ROS that could be mediators of a large variety of physiological processes, including programmed cell death [6]. In this regard, some NOX homologues have been linked to ROS generation involved in neuronal cell death, including apoptotic death of cerebellar granule neurons (CGN) [9-15]. On the other hand, the apoptotic volume decrease (AVD) is an early-phase component of the apoptotic cell death. AVD is driven by an efflux of osmolyte mainly resulting from the activation

of a K⁺ and a volume-sensitive Cl⁻ conductance [16-20]. AVD and apoptotic death can be prevented by blocking either the K⁺ channels or the volume-sensitive Cl⁻ [18]. Previous studies of our group confirmed these observations in CGN by showing that both K⁺ and Cl⁻ channel blockers prevent AVD and cell death in CGN [24, 25]. Nevertheless, the relationship among ionic currents activation, AVD and apoptosis is still not well understood.

Several studies have shown that some of the K⁺ channels implicated in apoptosis as well as the volume-sensitive Cl⁻ channels can be activated by ROS [33, 39-44], suggesting that ion channels related to AVD could be substrates of ROS produced during apoptotic death. Recently, it was also shown that ROS are produced upon osmotic stress [26, 43, 45-52] and that ROS could be involved in cell shrinkage in various cell types [53, 54]. Some of these studies implicate NOX enzymes as the source of ROS [33, 39]. Interestingly, there are also evidences showing that not only NOX activation induce cell shrinkage but also that cell shrinkage can activate NOX enzymes [55]. Altogether, these evidences suggest a possible relation among ROS generation, NOX

enzymes, ionic fluxes and AVD. Here we report for the first time that K5- and Sts-induced ROS generated by NOX is related to AVD induction and that ionic fluxes are also linked to ROS generation by NOX activation. These results suggest a self-amplifying cycle between NOX-produced ROS and ionic fluxes, which could perpetuate AVD and assure apoptotic death.

Materials and Methods

Materials: Fetal calf serum and penicillin/streptomycin were from GIBCO (Grand Island, NY, USA). Dihydroethidine and calcein-AM were from Invitrogen, Molecular Probes (Eugene, OR, USA). Poly-L-lysine (molecular weight_{300,000}), xanthine, xanthine oxidase, trypsin, DNase, SOD, catalase, kaempferol, 3(4,5dimethylthiazol2yl)2,5diphenyltetrazolium bromide (MTT), propidium iodide (PI), cytosine-D-arabino-furoanoside (araC), 4-aminopyridine (4AP), cesium chloride (Cs⁺), tetraethylammonium chloride (TEA⁺), 4,4'-diisothiocyanato-stilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS), 4-acetamido-4'-isothiocyanato-stilbene-2,2'-disulfonic acid (SITS), dyphenileneiodonium (DPI) and 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride (AEBSF) and staurosporine (Sts) were from Sigma (St Louis, MO, USA). Ebselen was from Cayman Chemical (MI, USA). Apocynin and MnTMPyP were from Calbiochem, Merck. Others chemicals were of the purest grade available from regular commercial sources. The colonies of NOX2 (gp91phox) knockout (KO) mice on a C57BL6 background were purchased from The Jackson Laboratory (USA) and bred in our Institute.

Cerebellar Granule Neurons Cultures: All animal used for the experimentation described in the present study were treated in accordance with the accepted standards of animal care and with the procedures approved by the local Committee of Research and Ethics of the Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. The protocol used followed the Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience as well as guidelines released by the Mexican Institutes of Health Research and the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals. All efforts were made to minimize

animal suffering, and to reduce the number of animals used. CGN cultures were prepared as previously described [56]. Briefly, cell suspensions dissociated from 7-day-old rat cerebellum were plated at a density of 265 X10³ cells/cm² in plastic dishes or coverslips coated with poly-L-lysine (5 µg/ml) and were maintained for 7 days in vitro (DIV). Culture medium contained basal Eagle's medium supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum, 2 mM glutamine, 25 mM KCl, 50 U/ml penicillin and 50 mg/ml streptomycin. This medium is referred in text as K25 and is the control condition. The culture dishes were incubated at 37 °C in a humidified 5% CO₂/ 95% air atmosphere. To avoid non-neuronal cells, cytosine arabinoside (10 mM) was added 24 h after seeding. In some experiments we obtained CGN from NOX2^{-/-} (NOX2 KO) and wild type (wt) mice with the same protocol. CGN cultures contained approximately 95% neurons. Cell death was induced by treating cells with staurosporine (Sts) (0.5-1 µM) or by transferring cells to a medium containing 5 mM KCl (K5) [2, 13, 57-61]. In some experiments, antioxidants (20 µM kaempferol and 50 µM MnTMPyP), NOX inhibitors (520 nM DPI, 3-5 mM apocynin, 40-80 µM AEBSF) and ion channel blockers (10 mM Cs⁺, 10 mM TEA⁺, 5 mM 4AP, 500 µM DIDS, 500 µM SITS) were added simultaneously with K5, Sts or XXO, and they were present until the end of the experiment.

Induction of generation of reactive oxygen species: After 7-8 DIV, neurons were subjected to a protocol to induce reactive oxygen species (ROS) [61]. Superoxide anion (O₂⁻) formation was achieved by preincubating neurons with 100 µM xanthine for 2 h and then adding xanthine oxidase at a concentration of 45 mU/ml for two additional hours. In some experiments, neurons were treated simultaneously with antioxidants and ion channel blockers.

Cell viability: Neuronal viability was estimated by calcein and propidium iodide (PI) assay after 24 h of K5 and Sts treatments and after 6 h of XXO treatment. Calcein enters to viable cells and emits green fluorescence when it is cleaved by esterases and cannot longer permeable cell membranes. PI is not permeable to cell membranes and only dying cells are stained.

CGN were incubated with 2.5 μ M calcein-AM and 2 μ M PI for 10 min at 37°C, and then cultures were photographed in a fluorescence microscope using an excitation wavelength of 485-520 nm for calcein and 450-510 nm wavelengths for PI. Triplicates of a least three different pictures were analyzed for each condition. Results are expressed as the percentage of viable cells (calcein positive cells) from the total number of cells (calcein positive cells + PI positive cells) per field.

Measurement of ROS generation: ROS production was measured with dihydroethidine (DHE) dye [12, 13]. Neurons were cultured in a K25 medium for 7-8 DIV, and then treated with staurosporine (0.5 μ M) or transferred to K5 medium. After 4-5 hrs of treatment, neurons were incubated with DHE in the cultured medium at 37°C for 20 min. Following incubation, neurons were washed three times with PBS and then fixed in 4% fresh paraformaldehyde for 7 min. Neurons were examined with an epifluorescence microscope (Nikon Diaphot TMD; Nikon Corp., Japan) using a rhodamine filter (450 nm excitation and 510 nm emission wavelengths). Results are expressed as a relationship between DHE positive cells and total cells.

Cell size/volume assay: Cell size/volume was estimated from the maximum cross-sectional area of a cell, assuming that the cell swells and shrinks in a spherical manner [25]. First, CGN were photographed in Nomarsky microscopy (differential interference contrast, DIC) with a 63 x objective. Cross-sectional areas were measured using the AxioVision LE Rel. 4.5 program. Area values were normalized to controls and expressed as relative cell volume changes.

Measurement of NADPH oxidase activity: NADPH activity was estimated by the fluorogenic oxidation of DHE to ethidium (Eth), used as a measure of superoxide anion formation. Fluorescent detection of superoxide anion production in cells was performed by the method described by Satoh and coworkers (2005) [62]. Neurons were homogenized in buffer containing (in mM): 25 HEPES, 1 EDTA, 0.1 PMSF in 0.1 PBS. After centrifugation of homogenates at 15 000 rpm for 6 min at 4°C, the supernatants were separated. Cell

homogenates were incubated with DHE 0.02 mM, DNA 0.5 mg/mL, and NADPH. Eth-DNA fluorescence was measured during 30 min at an excitation wavelength of 480 nm and an emission of 610 nm by using a fluorescence microplate reader. Each analysis is performed by duplicated. NOX activity was expressed as the percentage of difference between DHE oxidation relative to control per hour per milligram protein.

Statistical analysis: Data in graphs are expressed as mean \pm SEM of more than three independent experiments. One-way ANOVAs were used followed by a Fisher's multiple comparison post-hoc test. Significant differences were considered when $p \leq 0.05$.

Results

ROS generation related to apoptotic volume decrease.

As previously reported [2, 12], when CGN cultured in a medium containing 25mM KCl for 7-8 DIV were treated with Sts or transferred to a medium with 5 mM KCl (K5) they showed an increase of ROS generation after 4-6 h of treatment (Fig. 1A,B). This peak of ROS production, detected as DHE fluorescence, was significantly decreased by antioxidants added simultaneously in both apoptotic treatments (Fig 1A,B). Antioxidants used were kaempferol (20 μ M) and MnTPyP (50 μ M). Also, both antioxidants were able to protect neurons from death after 24 h of K5 (Fig 1C) and Sts (Fig 1D) treatment. This confirms that oxidative stress plays a main role in K5- and Sts-induced death of CGN.

On the other hand, in a previous work [25] we showed that AVD in CGN treated with K5 or Sts appeared early in time (5 h) that was coincident with ROS generation [2, 12]. Therefore, we evaluated the role of ROS in AVD induced by K5 or Sts by testing the effect of two antioxidant agents, kaempferol (20 μ M) and MnTPyP (50 μ M). Under these conditions, we found that both antioxidants significantly inhibited AVD about 40% in CGN treated with K5 (Fig 2A,C) or by 95% in cells treated with Sts (Fig 2B,D). Similar results were obtained using the antioxidant agents catalase (125 U/ml) and ebselen (10 μ M) (data not shown).

The observed results suggest that ROS could contribute to AVD in CGN. To further investigate this possibility, we evaluated the effect of ROS production on cell volume of CGN. Figure 3 shows that cells incubated with 100 μ M xanthine and 45 mU/ml xanthine oxidase (XXO), a prooxidant condition leading to apoptotic death [61], increase ROS generation after 2 h of treatment as well as a reduction by 50% of cell viability after 6 h (Fig. 3A,B). Under these conditions we also observed a significant gradual reduction of cell volume from 2 h to 5 h of treatment (Fig. 3 C). Antioxidant agents simultaneously incubated with XXO, significantly decreased ROS production, cell death and cell shrinkage after 2 h (Fig 3) of 4 h of treatment (not shown). Altogether, these results suggest that ROS could trigger a decrease of cell volume.

NADPH oxidases participate in AVD of CGN.

In previous studies it was suggested that NADPH oxidase enzymes (NOX) could be involved in ROS generation induced by K5 and Sts in CGN [12, 13] by showing that NOX inhibitors such as AEBSF and DPI protected cells from apoptotic death by decreasing ROS production. Here, we confirmed these results and also we showed that apocynin, another NOX inhibitor, decreased ROS generation and death of CGN (Table 1). We evaluated whether NOX activity contributes to AVD during apoptotic death of CGN by using NOX inhibitors. As shown in figure 4, apocynin and AEBSF were able to reduce AVD induced by K5 (Fig 4A) and Sts (Fig 4B) after 11 h of treatment. Similar results were found with DPI (data not shown). We used NOX2 KO mice to further elucidate the role of NOX2 in AVD. Figure 4C shows a small reduction of AVD observed in CGN from NOX2 KO mice treated with K5 as compared to wild type CGN at all times tested. In contrast, we observed that Sts-induced AVD was completely inhibited in CGN from NOX2 KO mice (Fig. 4D) from 5 h. These results are in line with those previously reported [13] where NOX2 is essential for apoptotic cell death of CGN induced by Sts, but not by K5. Overall, these results suggest that ROS produced by NOX could mediate AVD induced by both K5 and Sts, and notably NOX2 could be related to AVD induced by Sts, but not K5.

Ionic fluxes associated with apoptotic volume decrease are related to ROS generation and NOX activity.

As previously shown [25], AVD seems to be related to K^+ and Cl^- fluxes, as ion channel blockers were effective in preventing AVD of CGN treated with K5 or Sts. In order to study the relationship between ionic fluxes and ROS generation, several K^+ and Cl^- channel blockers were tested in CGN treated with K5 and Sts. Under these conditions we found that all K^+ channel blockers used, Cs^+ , TEA⁺ and 4AP, as well as the Cl^- channel blocker, DIDS, prevented ROS generation induced by K5 treatment (Fig 5A). In contrast, when cells were treated with Sts, only DIDS was able to inhibit ROS generation (Fig. 5B).

As mentioned above NOX enzymes are responsible for ROS production induced by K5 and Sts. Thus, we studied the effect of ionic fluxes blockers on NOX activity induced by K5 and Sts treatments. Under these conditions we found that K^+ and Cl^- channel blockers markedly reduced NOX activity induced by K5 (Fig 5C). In Sts-treated neurons, the K^+ channel blockers were unable to reduce NOX activity. Only the Cl^- channel blocker inhibited NOX activity (Fig 5D). To further test the relationship between ROS and ionic fluxes we measured the effect of ion channel blockers on AVD and cell viability of CGN treated with the prooxidant condition XXO. As shown in figure 6, we observed that, similarly to Sts-treated neurons, only Cl^- channel blockers inhibited AVD (Fig. 6A) and cell death (Fig. 6B). No effect was observed with any of the K^+ channel blockers tested on AVD (Fig. 6A) and cell death (Fig 6 B). Similar results were obtained with other K^+ channel blocker, 4-AP (not shown). Under both apoptotic conditions, AVD first appear after 5–6 h, which is also the time of ROS production by NOX activity. Interestingly, this is the critical time for the reversibility of CGN apoptosis induced by K5 [2, 12]. To evaluate the role of K^+ and Cl^- currents during this early phase of apoptotic process, we evaluated the effect of Cs^+ and DIDS added at different times on the AVD, cell viability and ROS production of CGN treated with K5 and Sts. When both ion channel blockers were added at 0 or 3 h we observed a marked inhibition of the AVD and cell death induced by

apoptotic conditions (Fig. 7A-D). After 5 h, Cs⁺ and DIDS were failed to prevent AVD and cell death (Fig. 7A-D). Similar results were obtained for ROS production, only ion channel blockers added before 4-5 h were effective in decreasing ROS generation (Fig. 7E,F). These results show that once ROS are generated even if K⁺ and Cl⁻ fluxes are blocked, cells cannot be rescued from apoptotic death.

Discussion

It is known that in cultured CGN, K5 and Sts induce apoptosis [59, 60] and that apoptotic death of CGN involves ROS generation [2]. Also, we previously demonstrated that direct ROS induction produces neuronal death with apoptotic features in CGN similarly to that induced by K5 [61]. These and other evidences suggest that ROS could play a key role in the apoptotic death of CGN, probably acting as an early signal. Although oxidative stress has been proposed to play a central role in the initiation and execution of neuronal apoptosis [2], there is a lack of information about the precise mechanism of action of ROS. We recently demonstrated a role of a NADPH oxidase in ROS production during the apoptotic death of CGN [12] and it was also suggested a differential involvement of the NOX homologues depending on the apoptotic condition [63]. The mechanisms underlying AVD induced by K5 and Sts seem to be related to the NOX-derived ROS generation. This is supported by the observation that K5- and Sts-induced AVD was prevented by antioxidants and NOX inhibitors. Besides, NOX-induced ROS production correlates in time with the beginning of AVD, about 4-5 h after apoptotic treatment. Interestingly, in Sts- but not K5-treated cells no AVD was observed in NOX2 knock-out animals, which is in line with a previous study showing that NOX2 is the NOX homologue involved in Sts-induced apoptotic death of CGN. Altogether, these results suggest that ROS generation by NOX activity is upstream of K5 and Sts-induced AVD. In addition, in the present study we show that K⁺ and Cl⁻ channel blockers inhibited NOX-mediated ROS generation induced by K5, in contrast to Sts-induced NOX activity and ROS generation was blocked only by Cl⁻ channel blockers. These results are in

agreement with a previous study where we suggested that Cl⁻ fluxes, rather than K⁺, were involved in AVD and apoptosis induced by staurosporine [25]. In this regard, it has been suggested that volume sensitive Cl⁻ channels could mediate NOX activity in neutrophils [64]. It is suggested that NOX activity produces a depolarization that needs to be counteracted with Cl⁻ fluxes in order to maintain the enzyme active [64]. As ionic fluxes can be activated by ROS production and NOX activity can be regulated by ion fluxes, it is possible that a self-regulating cycle exist to guarantee apoptotic process. To further investigate this point we found that a prooxidant condition itself can induce AVD in CGN and that antioxidants were able to prevent this loss of cell volume. In addition, Cl⁻ channel, but not K⁺ channel blockers rescued CGN from death induced by XXO, confirming the role of ROS in the activation of Cl⁻ fluxes. Thus, these results suggest that, although K⁺ fluxes are involved in AVD, Cl⁻ fluxes are those related to AVD induced by ROS. It should be emphasized that AVD induced by Sts is mediated by NOX2 and Cl⁻ fluxes. In this regard, there are several evidences showing that NOX enzymes can be regulated positively by Cl⁻ fluxes [42, 43, 50, 55], and that ROS can regulate Cl⁻ channels [65]. There are experimental evidences suggesting that ionic fluxes are early activated after the apoptotic induction in NGC; however, the AVD is evident after 5 hours, a time that has been shown to be critical for the reversibility of apoptosis [2], and when NOX-mediated ROS production begins. AVD could therefore, initiate after the mechanisms of volume regulation could no longer maintain cell volume. This could be due to an increase in ionic fluxes as a consequence of the ROS produced and is supported by previous observations suggesting that ROS could regulate ionic fluxes [33]. Besides, this observation is supported by our results showing that apoptotic cell death and AVD could be inhibited only if ionic fluxes are blocked in the first hours after apoptotic induction. However, if ionic channel blockers are added after NOX-mediated ROS production

they no longer have a protecting effect on cell death or cell volume maintenance, suggesting that ROS generation by NOX activity could be important for the regulation of the apoptotic program, including AVD. In summary, we report here that NOX2 is necessary for AVD induced by staurosporine but not by K5 where a different NOX is acting as a source of the ROS production. On the other hand, only Cl⁻ fluxes are important for Sts-induced AVD whereas both, Cl⁻ and K⁺ fluxes are important for volume decrease induced by K5. These results support the idea that these apoptotic conditions have different initial mechanisms in apoptotic death.

These differences could be due to particular features of these two apoptotic pathways; however, our data suggest that regardless the fine mechanisms involved, NOX-mediated ROS generation could be involved in AVD and ionic fluxes. In addition, our results show that ionic fluxes related to AVD are also related to ROS generation and NOX activation, suggesting a self-amplifying cycle between NOX-produced oxidative stress and ionic fluxes, which perpetuates AVD and assures apoptotic death.

Acknowledgements: The authors are grateful to Guadalupe Dominguez for the excellent technical assistance. This work was supported by DGAPA-UNAM (IN223107 and IN218310) and CONACYT (79788) grants. BH-E and AG-G were supported by a CONACYT fellowship.

References

- [1] Pizarro, J. G.; Folch, J.; Vazquez De la Torre, A.; Verdager, E.; Junyent, F.; Jordan, J.; Pallas, M.; Camins, A. Oxidative stress-induced DNA damage and cell cycle regulation in B65 dopaminergic cell line. *Free Radic Res* **43**:985-994; 2009.
- [2] Valencia, A.; Moran, J. Role of oxidative stress in the apoptotic cell death of cultured cerebellar granule neurons. *J Neurosci Res* **64**:284-297; 2001.
- [3] Sponne, I.; Fifre, A.; Drouet, B.; Klein, C.; Koziel, V.; Pincon-Raymond, M.; Olivier, J. L.; Chambaz, J.; Pillot, T. Apoptotic neuronal cell death induced by the non-fibrillar amyloid-beta peptide proceeds through an early reactive oxygen species-dependent cytoskeleton perturbation. *The Journal of biological chemistry* **278**:3437-3445; 2003.
- [4] Naoi, M.; Maruyama, W.; Yi, H.; Inaba, K.; Akao, Y.; Shamoto-Nagai, M. Mitochondria in neurodegenerative disorders: regulation of the redox state and death signaling leading to neuronal death and survival. *J Neural Transm* **116**:1371-1381; 2009.
- [5] Woodman, R.; Lockette, W. Alpha-methyltyrosine inhibits formation of reactive oxygen species and diminishes apoptosis in PC12 cells. *Brain Res* **1296**:137-147; 2009.
- [6] Lambeth, J. D.; Kawahara, T.; Diebold, B. Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression. *Free Radic Biol Med* **43**:319-331; 2007.
- [7] Bedard, K.; Krause, K. H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* **87**:245-313; 2007.
- [8] Lambeth, J. D. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* **4**:181-189; 2004.
- [9] Anantharam, V.; Kaul, S.; Song, C.; Kanthasamy, A.; Kanthasamy, A. G. Pharmacological inhibition of neuronal NADPH oxidase protects against 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺)-induced oxidative stress and apoptosis in mesencephalic dopaminergic neuronal cells. *Neurotoxicology* **28**:988-997; 2007.
- [10] Tammariello, S. P.; Quinn, M. T.; Estus, S. NADPH oxidase contributes directly to oxidative stress and apoptosis in nerve growth factor-deprived sympathetic neurons. *J Neurosci* **20**:RC53; 2000.
- [11] Yamamoto, E.; Tamamaki, N.; Nakamura, T.; Kataoka, K.; Tokutomi, Y.; Dong, Y. F.; Fukuda, M.; Matsuba, S.; Ogawa, H.; Kim-Mitsuyama, S. Excess salt causes cerebral neuronal apoptosis and inflammation in stroke-prone hypertensive rats through angiotensin II-induced NADPH oxidase activation. *Stroke* **39**:3049-3056; 2008.
- [12] Coyoy, A.; Valencia, A.; Gumez-Gamboa, A.; Moran, J. Role of NADPH oxidase in the apoptotic death of cultured cerebellar granule neurons. *Free Radic Biol Med* **45**:1056-1064; 2008.
- [13] Gumez-Gamboa, A.; Moran, J. NOX2 mediates apoptotic death induced by staurosporine but not by potassium deprivation in cerebellar granule neurons. *J Neurosci Res* **87**:2531-2540; 2009.
- [14] Jang, H. J.; Hwang, S.; Cho, K. Y.; Kim do, K.; Chay, K. O.; Kim, J. K. Taxol induces oxidative neuronal cell death by enhancing the activity of NADPH oxidase in mouse cortical cultures. *Neurosci Lett* **443**:17-22; 2008.
- [15] Su, L.; Zhao, B.; Lv, X.; Wang, N.; Zhao, J.; Zhang, S.; Miao, J. Saffrole oxide induces neuronal apoptosis through inhibition of integrin beta4/SOD activity and elevation of ROS/NADPH oxidase activity. *Life Sci* **80**:999-1006; 2007.
- [16] Yu, S. P.; Yeh, C. H.; Sensi, S. L.; Gwag, B. J.; Canzoniero, L. M.; Farhangrazi, Z. S.; Ying, H. S.; Tian,

- M.; Dugan, L. L.; Choi, D. W. Mediation of neuronal apoptosis by enhancement of outward potassium current. *Science* **278**:114-117; 1997.
- [17] Gomez-Angelats, M.; Bortner, C. D.; Cidlowski, J. A. Cell volume regulation in immune cell apoptosis. *Cell Tissue Res* **301**:33-42; 2000.
- [18] Maeno, E.; Ishizaki, Y.; Kanaseki, T.; Hazama, A.; Okada, Y. Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**:9487-9492; 2000.
- [19] Krick, S.; Platoshyn, O.; Sweeney, M.; Kim, H.; Yuan, J. X. Activation of K⁺ channels induces apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **280**:C970-979; 2001.
- [20] Okada, Y.; Maeno, E. Apoptosis, cell volume regulation and volume-regulatory chloride channels. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **130**:377-383; 2001.
- [21] Gomez-Angelats, M.; Bortner, C. D.; Cidlowski, J. A. Protein kinase C (PKC) inhibits fas receptor-induced apoptosis through modulation of the loss of K⁺ and cell shrinkage. A role for PKC upstream of caspases. *The Journal of biological chemistry* **275**:19609-19619; 2000.
- [22] Koulich, E.; Nguyen, T.; Johnson, K.; Giardina, C.; D'Mello, S. NF-kappaB is involved in the survival of cerebellar granule neurons: association of IkappaBbeta [correction of Ikappabeta] phosphorylation with cell survival. *J Neurochem* **76**:1188-1198; 2001.
- [23] Thompson, G. J.; Langlais, C.; Cain, K.; Conley, E. C.; Cohen, G. M. Elevated extracellular [K⁺] inhibits death-receptor- and chemical-mediated apoptosis prior to caspase activation and cytochrome c release. *Biochem J* **357**:137-145; 2001.
- [24] Franco-Cea, A.; Valencia, A.; Sanchez-Armass, S.; Dominguez, G.; Moran, J. Role of ionic fluxes in the apoptotic cell death of cultured cerebellar granule neurons. *Neurochem Res* **29**:227-238; 2004.
- [25] Hernandez-Enriquez, B.; Arellano, R. O.; Moran, J. Role for ionic fluxes on cell death and apoptotic volume decrease in cultured cerebellar granule neurons. *Neuroscience*.
- [26] Reinehr, R.; Becker, S.; Braun, J.; Eberle, A.; Grether-Beck, S.; Haussinger, D. Endosomal acidification and activation of NADPH oxidase isoforms are upstream events in hyperosmolarity-induced hepatocyte apoptosis. *The Journal of biological chemistry* **281**:23150-23166; 2006.
- [27] Maeno, E.; Takahashi, N.; Okada, Y. Dysfunction of regulatory volume increase is a key component of apoptosis. *FEBS Lett* **580**:6513-6517; 2006.
- [28] Reinehr, R.; Haussinger, D. Hyperosmotic activation of the CD95 death receptor system. *Acta Physiol (Oxf)* **187**:199-203; 2006.
- [29] Reinehr, R.; Haussinger, D. Hyperosmotic activation of the CD95 system. *Methods Enzymol* **428**:145-160; 2007.
- [30] Reinehr, R.; Schliess, F.; Haussinger, D. Hyperosmolarity and CD95L trigger CD95/EGF receptor association and tyrosine phosphorylation of CD95 as prerequisites for CD95 membrane trafficking and DISC formation. *FASEB J* **17**:731-733; 2003.
- [31] Bortner, C. D.; Cidlowski, J. A. Absence of volume regulatory mechanisms contributes to the rapid activation of apoptosis in thymocytes. *Am J Physiol* **271**:C950-961; 1996.
- [32] Lang, F.; Ritter, M.; Gamper, N.; Huber, S.; Fillon, S.; Tanneur, V.; Lepplé-Wienhues, A.; Szabo, I.; Gulbins, E. Cell volume in the regulation of cell proliferation and apoptotic cell death. *Cell Physiol Biochem* **10**:417-428; 2000.
- [33] Reinehr, R.; Haussinger, D. CD95 activation in the liver: ion fluxes and oxidative signaling. *Arch Biochem Biophys* **462**:124-131; 2007.
- [34] Yu, S. P.; Yeh, C.; Strasser, U.; Tian, M.; Choi, D. W. NMDA receptor-mediated K⁺ efflux and neuronal apoptosis. *Science* **284**:336-339; 1999.
- [35] Yu, S. P.; Yeh, C. H.; Gottron, F.; Wang, X.; Grabb, M. C.; Choi, D. W. Role of the outward delayed rectifier K⁺ current in ceramide-induced caspase activation and apoptosis in cultured cortical neurons. *J Neurochem* **73**:933-941; 1999.
- [36] Dallaporta, B.; Hirsch, T.; Susin, S. A.; Zamzami, N.; Larochette, N.; Brenner, C.; Marzo, I.; Kroemer, G. Potassium leakage during the apoptotic degradation phase. *J Immunol* **160**:5605-5615; 1998.
- [37] Wang, L.; Li, T.; Lu, L. UV-induced corneal epithelial cell death by activation of potassium channels. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**:5095-5101; 2003.
- [38] Yu, S. P.; Farhangrazi, Z. S.; Ying, H. S.; Yeh, C. H.; Choi, D. W. Enhancement of outward potassium current may participate in beta-amyloid peptide-induced cortical neuronal death. *Neurobiol Dis* **5**:81-88; 1998.
- [39] L'Hoste, S.; Poet, M.; Durantou, C.; Belfodil, R.; e Barriere, H.; Rubera, I.; Tauc, M.; Poujeol, C.; Barhanin, J.; Poujeol, P. Role of TASK2 in the control of apoptotic volume decrease in proximal kidney cells. *The Journal of biological chemistry* **282**:36692-36703; 2007.
- [40] Gier, B.; Krippeit-Drews, P.; Sheiko, T.; Aguilar-Bryan, L.; Bryan, J.; Dufer, M.; Drews, G. Suppression of KATP channel activity protects murine pancreatic beta cells against oxidative stress. *J Clin Invest* **119**:3246-3256; 2009.
- [41] Sesti, F.; Liu, S.; Cai, S. Q. Oxidation of potassium channels by ROS: a general mechanism of aging and neurodegeneration? *Trends Cell Biol* **20**:45-51.
- [42] Shimizu, T.; Numata, T.; Okada, Y. A role of reactive oxygen species in apoptotic activation of volume-sensitive Cl⁻ channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:6770-6773; 2004.

- [43] Varela, D.; Simon, F.; Riveros, A.; Jorgensen, F.; Stutzin, A. NAD(P)H oxidase-derived H₂O₂ signals chloride channel activation in cell volume regulation and cell proliferation. *J Biol Chem* **279**:13301-13304; 2004.
- [44] Haskew-Layton, R. E.; Mongin, A. A.; Kimelberg, H. K. Hydrogen peroxide potentiates volume-sensitive excitatory amino acid release via a mechanism involving Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *The Journal of biological chemistry* **280**:3548-3554; 2005.
- [45] Lambert, I. H. Reactive oxygen species regulate swelling-induced taurine efflux in NIH3T3 mouse fibroblasts. *J Membr Biol* **192**:19-32; 2003.
- [46] Ortenblad, N.; Young, J. F.; Oksbjerg, N.; Nielsen, J. H.; Lambert, I. H. Reactive oxygen species are important mediators of taurine release from skeletal muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **284**:C1362-1373; 2003.
- [47] Friis, M. B.; Vorum, K. G.; Lambert, I. H. Volume-sensitive NADPH oxidase activity and taurine efflux in NIH3T3 mouse fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* **294**:C1552-1565; 2008.
- [48] Diaz-Elizondo, J.; Chiong, M.; Rojas-Rivera, D.; Olea-Azar, C.; Kwon, H. M.; Lavandero, S. Reactive oxygen species inhibit hyposmotic stress-dependent volume regulation in cultured rat cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **350**:1076-1081; 2006.
- [49] Martins, A. S.; Shkryl, V. M.; Nowycky, M. C.; Shirokova, N. Reactive oxygen species contribute to Ca²⁺ signals produced by osmotic stress in mouse skeletal muscle fibres. *The Journal of physiology* **586**:197-210; 2008.
- [50] Reinehr, R.; Gorg, B.; Becker, S.; Qvarthava, N.; Bidmon, H. J.; Selbach, O.; Haas, H. L.; Schliess, F.; Haussinger, D. Hypoosmotic swelling and ammonia increase oxidative stress by NADPH oxidase in cultured astrocytes and vital brain slices. *Glia* **55**:758-771; 2007.
- [51] Eisner, V.; Criollo, A.; Quiroga, C.; Olea-Azar, C.; Santibanez, J. F.; Troncoso, R.; Chiong, M.; Diaz-Araya, G.; Foncea, R.; Lavandero, S. Hyperosmotic stress-dependent NFκB activation is regulated by reactive oxygen species and IGF-1 in cultured cardiomyocytes. *FEBS Lett* **580**:4495-4500; 2006.
- [52] Aquilano, K.; Filomeni, G.; Di Renzo, L.; Vito, M.; Stefano, C.; Salimei, P. S.; Ciriolo, M. R.; Marfe, G. Reactive oxygen and nitrogen species are involved in sorbitol-induced apoptosis of human erithroleukaemia cells K562. *Free Radic Res* **41**:452-460; 2007.
- [53] Ringel, F.; Bieringer, F.; Baethmann, A.; Plesnila, N. Effect of oxidative stress on glial cell volume. *J Neurotrauma* **23**:1693-1704; 2006.
- [54] Lambert, I. H.; Klausen, T. K.; Bergdahl, A.; Hougaard, C.; Hoffmann, E. K. ROS activate KCl cotransport in nonadherent Ehrlich ascites cells but K⁺ and Cl⁻ channels in adherent Ehrlich Lettre and NIH3T3 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **297**:C198-206; 2009.
- [55] Becker, S.; Reinehr, R.; Graf, D.; vom Dahl, S.; Haussinger, D. Hydrophobic bile salts induce hepatocyte shrinkage via NADPH oxidase activation. *Cell Physiol Biochem* **19**:89-98; 2007.
- [56] Moran, J.; Patel, A. J. Effect of potassium depolarization on phosphate-activated glutaminase activity in primary cultures of cerebellar granule neurons and astroglial cells during development. *Brain Res Dev Brain Res* **46**:97-105; 1989.
- [57] Balazs, R.; Jorgensen, O. S.; Hack, N. N-methyl-D-aspartate promotes the survival of cerebellar granule cells in culture. *Neuroscience* **27**:437-451; 1988.
- [58] Gallo, V.; Kingsbury, A.; Balazs, R.; Jorgensen, O. S. The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J Neurosci* **7**:2203-2213; 1987.
- [59] Moran, J.; Itoh, T.; Reddy, U. R.; Chen, M.; Alnemri, E. S.; Pleasure, D. Caspase-3 expression by cerebellar granule neurons is regulated by calcium and cyclic AMP. *J Neurochem* **73**:568-577; 1999.
- [60] Caballero-Benitez, A.; Moran, J. Caspase activation pathways induced by staurosporine and low potassium: role of caspase-2. *J Neurosci Res* **71**:383-396; 2003.
- [61] Valencia, A.; Moran, J. Reactive oxygen species induce different cell death mechanisms in cultured neurons. *Free Radic Biol Med* **36**:1112-1125; 2004.
- [62] Satoh, M.; Fujimoto, S.; Haruna, Y.; Arakawa, S.; Horike, H.; Komai, N.; Sasaki, T.; Tsujioka, K.; Makino, H.; Kashihara, N. NAD(P)H oxidase and uncoupled nitric oxide synthase are major sources of glomerular superoxide in rats with experimental diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* **288**:F1144-1152; 2005.
- [63] Guemez-Gamboa, A.; Moran, J. NOX2 mediates apoptotic death induced by staurosporine but not by potassium deprivation in cerebellar granule neurons. *J Neurosci Res*; 2009.
- [64] Ahluwalia, J. Chloride channels activated by swell can regulate the NADPH oxidase generated membrane depolarisation in activated human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* **365**:328-333; 2008.
- [65] Meng, X.; Reeves, W. B. Effects of chloride channel inhibitors on H₂O₂-induced renal epithelial cell injury. *Am J Physiol Renal Physiol* **278**:F83-90; 2000.
- [66] Okada, Y.; Maeno, E.; Shimizu, T.; Dezaki, K.; Wang, J.; Morishima, S. Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD). *The Journal of physiology* **532**:3-16; 2001.
- [67] Fariselli, P.; Olmea, O.; Valencia, A.; Casadio, R. Prediction of contact maps with neural networks and correlated mutations. *Protein Eng* **14**:835-843; 2001.

FIGURES

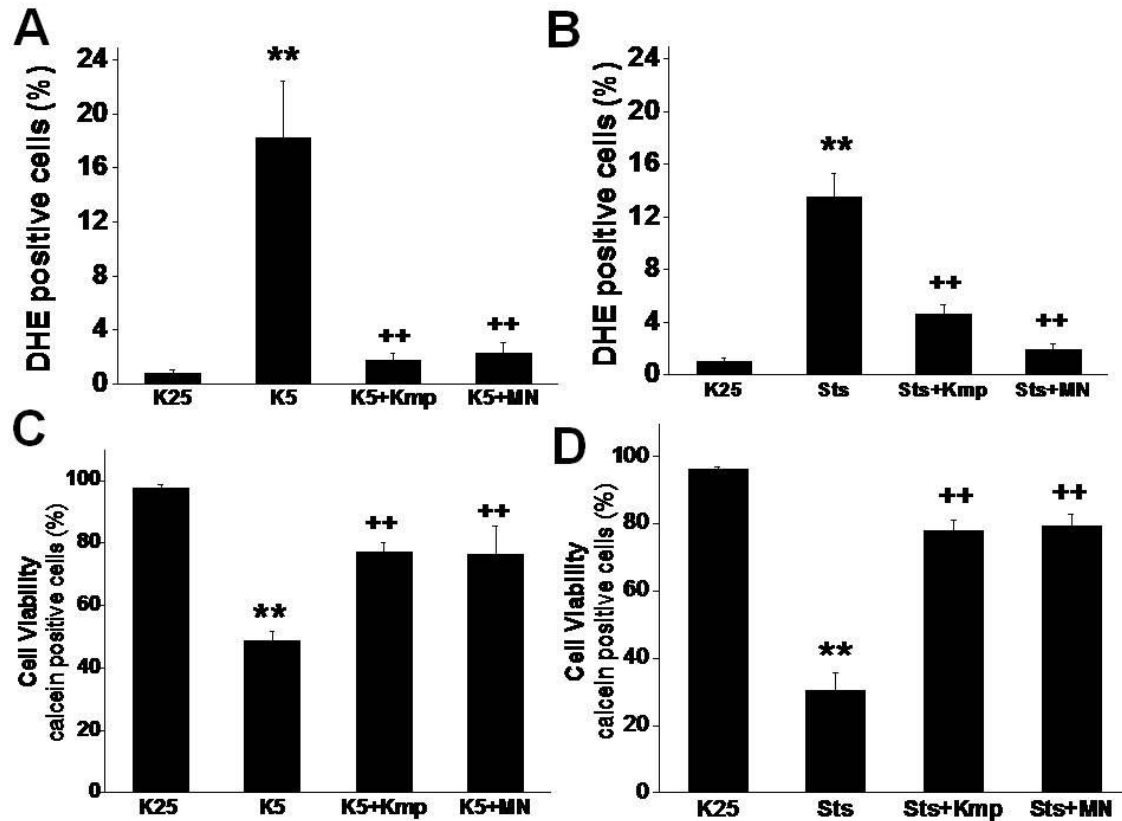


Figure 1. Antioxidants inhibit K5 or Sts-induced ROS generation and cell death. Cells were cultured for 7 DIV and then transferred to K5 (A) or treated with 0.5 μ M Sts (B) for 4.5 or 5 h respectively in the presence or absence of kaempferol (Kmp; 20 μ M) or MNTPyP (MN; 50 μ M). ROS generation was assayed using dihydroethidine and fluorescence microscopy as detailed in Material and Methods. Cell viability was determined by calcein assay 24h after K5 (C) or Sts (D) treatments with or without antioxidants, as indicated in Materials and Methods. Bars are mean \pm SD of 4-5 independent experiments. Significant difference from K25 (**), K5 or Sts (**) is indicated ($p \leq 0.05$).

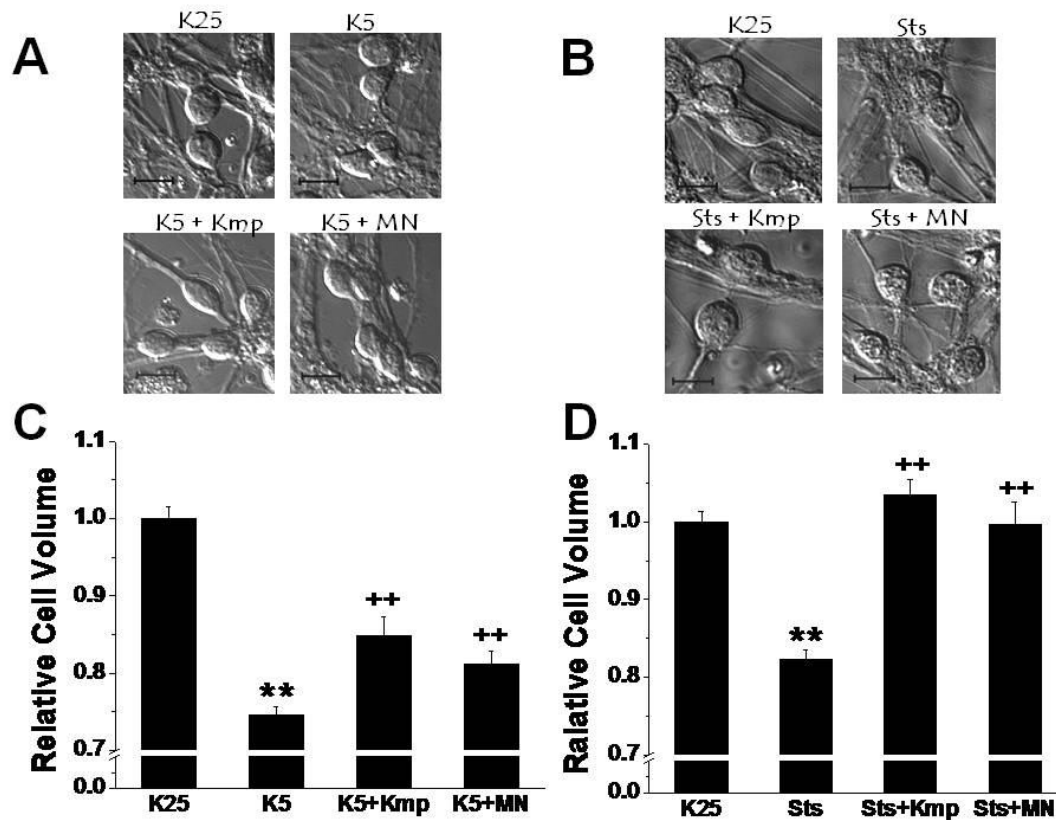


Figure 2. ROS generation contributes to apoptotic volume decrease induced by K5 or Sts on CGN. Cell morphology was evaluated by differential interference contrast (DIC) microscopy under control conditions (K25) after 11h of K5 (**A**) or Sts (**B**) treatment in presence or absence of 20 μ M kaempferol (Kmp) or 50 μ M MNTPyP (MN). Scale bar=10 μ m. Apoptotic volume decrease of GCN treated with K5 (**C**) or Sts (**D**) plus antioxidant agents was estimated from the maximum cross-sectional area of the cells as a measurement of relative cell volume as detailed in Methods. Bars are mean \pm SD of 4-7 independent experiments. Significant difference from K25 (**), K5 or Sts (++) is indicated ($p\leq 0.05$).

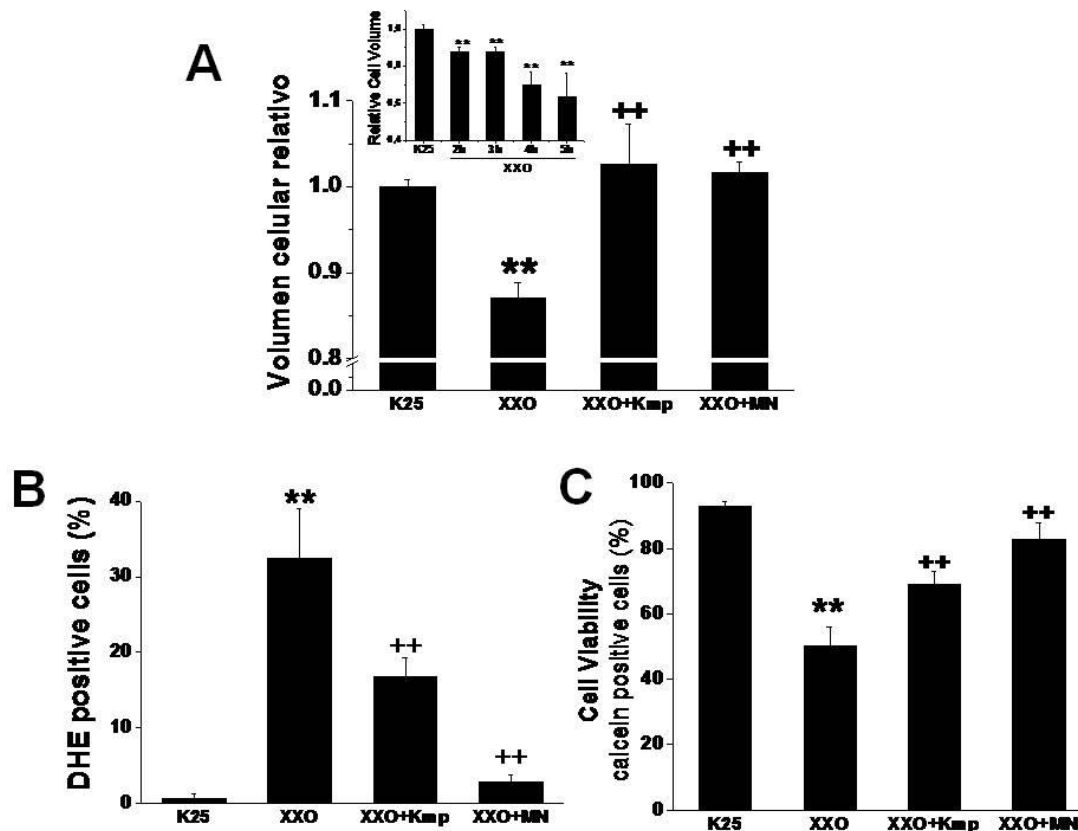


Figure 3. Xanthine/xanthine oxidase induced AVD could be prevented by antioxidants. Neurons cultured for 7 DIV were treated with xanthine/xanthine oxidase (XXO) (100 μ M and 45mU/ml, respectively) as detailed in Material and Methods in the presence or absence of 20 μ M kaempferol (Kmp) or 50 μ M MNTPyP (MN). **(A)** Apoptotic volume decrease (AVD) of CGN treated with XXO in presence or absence of the antioxidants Kmp (20 μ M) or MN (50 μ M) was estimated at the times indicated, as detailed in Material and Methods. **(B)** ROS generation was detected in CGN treated with XXO for 2h in the presence or absence of antioxidants using dihydroethidine and fluorescence microscopy. **(C)** Cell viability was measured by calcein assay after 6h of treatment. Bars are mean \pm SD of 3-6 independent experiments. Significant difference from K25 (**), XXO (***) is indicated ($p \leq 0.05$).

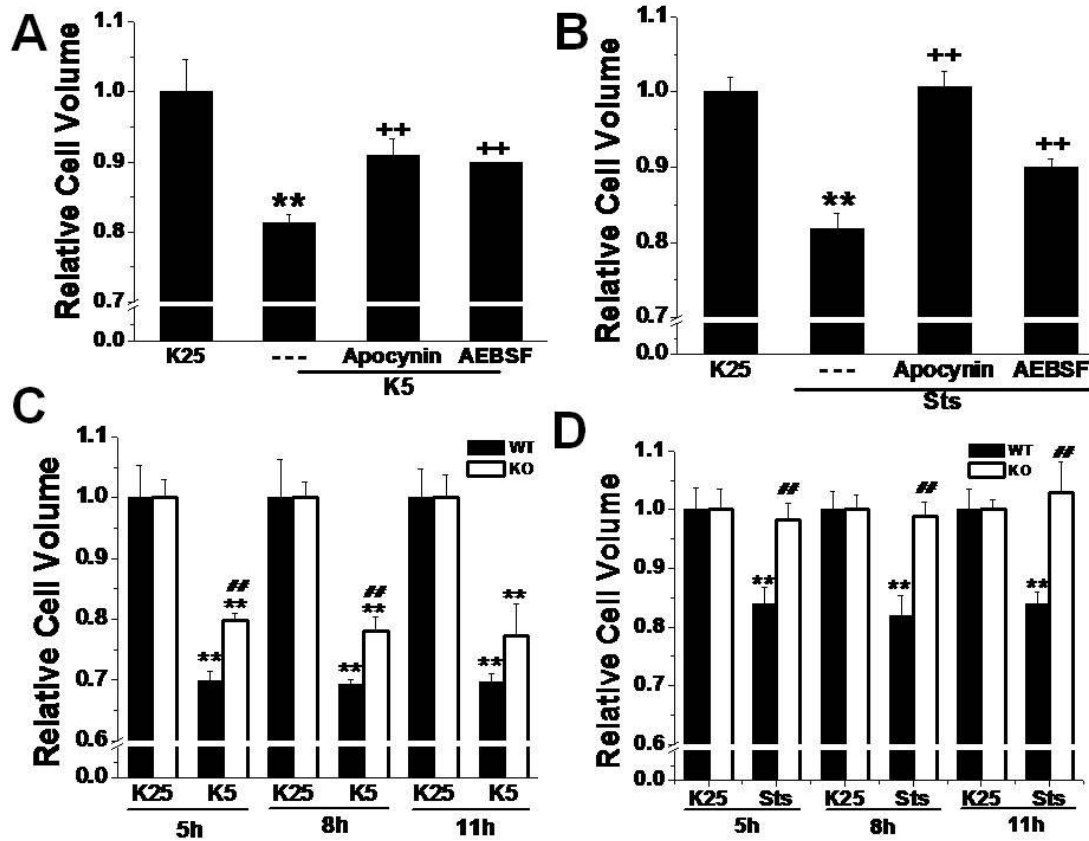


Figure 4. Role of NOX activity on apoptotic volume decrease induced by K5 and Sts in CGN. The apoptotic volume decrease was measured as Fig 2. in CGN after 11h of (A) K5 or (B) Sts treatments, in the presence or absence of apocynin (3mM and 5 mM, respectively) or AEBSF (40μM and 80 μM, respectively). CGN isolated from wild type (WT) or NOX2^{-/-} (KO) mice were treated with (C) K5 or (D) Sts and cell volume was measured at the indicated times. Bars are mean ± SD of 3-5 independent experiments. Significant difference from K25 (**) or WT (##) is indicated (p≤0.05).

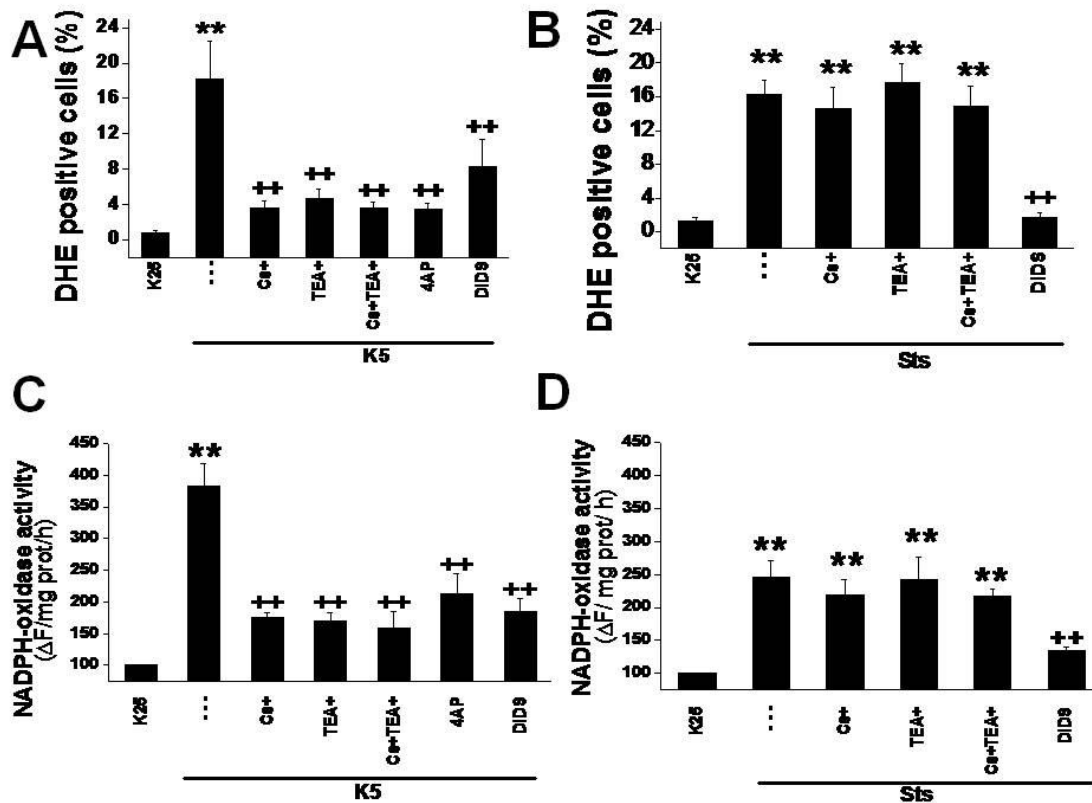


Figure 5. Ion channel blockers decrease ROS generation and NOX activity induced by K5 and Sts in CGN. CGN treated with (A) K5 or (B) Sts for 4.5 or 5 h respectively were assayed for ROS generation using DHE and fluorescence microscopy in the presence or absence of Cs⁺, TEA⁺, 4-AP or DIDS (10mM, 10mM, 5mM and 500μM, respectively). (C) NOX activity was measured spectrophotometrically as the oxidation of dihydroetidine in cell homogenates of CGN treated with K5 or Sts (5h or 6h, respectively) as detailed in Material and Methods. Bars are means± SD of 4 independent experiments. Significant difference from K25 (**), K5 or Sts (++) is indicated (p≤0.05).

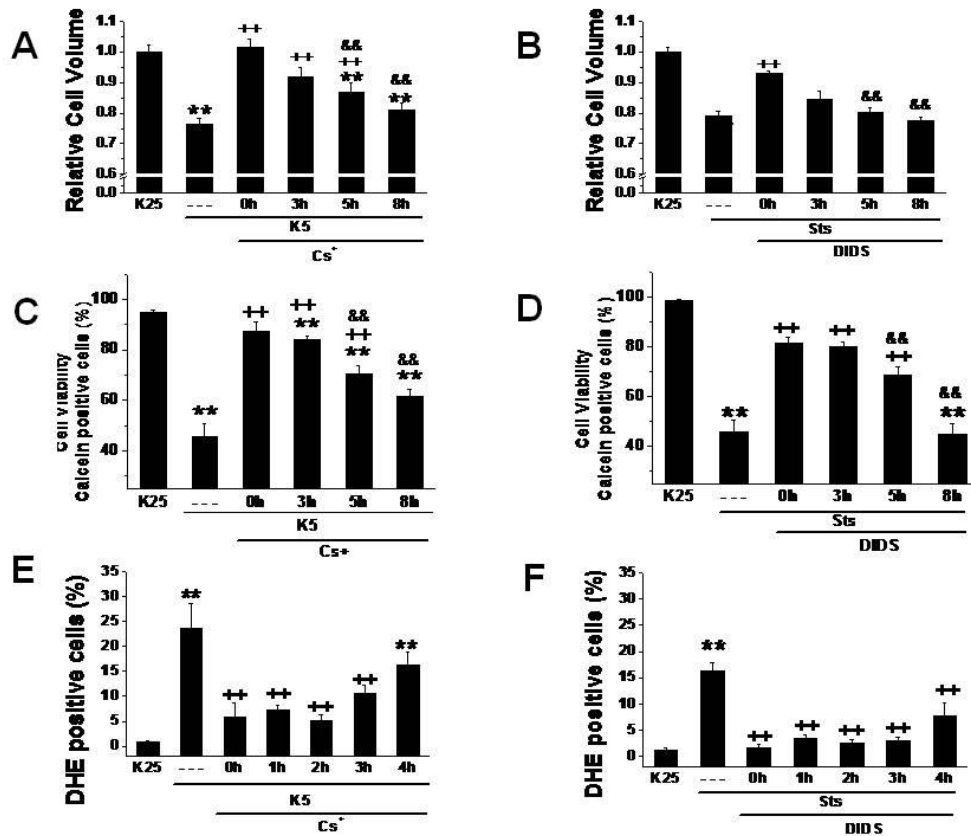


Figure 6. Differential effect of ion channel blockers on ROS generation and NOX activity induced by K5 and Sts in CGN at different times. CGN were cultured in a K25 medium for 7 DIV and treated with low potassium medium (K5) or staurosporine (Sts, 0.5 μ M) plus ion channel blockers added at different times after treatment. Apoptotic volume decrease of GCN treated with K5 (A) or Sts (B) plus ion channel blockers added at the indicated time after treatment was estimated from the maximum cross-sectional area of the cells as a measurement of relative cell volume as detailed in Methods, 11h after K5 or Sts treatments. Cell viability was measured by calcein assay 24h after K5 (C) or Sts (D) treatment as detailed in Methods. ROS generation was measured using DHE and fluorescence microscopy after 4-5h of K5 (E) or Sts (E) treatments. All ion channel blockers are added at the time indicated after K5 and Sts treatment and remains until the end of the experiment. Results are means \pm SD of 3-4 independent experiments. Significant difference from K25 (**), K5 or Sts (++) is indicated ($p \leq 0.05$).

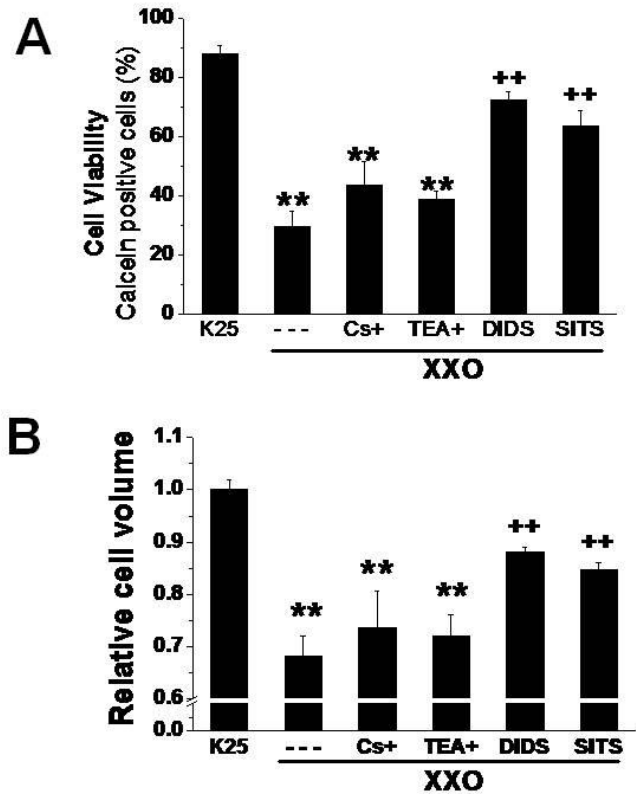


Figure 7. Effect of ion channel blockers on loss of cell viability and AVD induced by xanthine/xanthine oxidase in CGN. Neurons cultured for 7 DIV were treated with xanthine/xanthine oxidase (XXO) (100 μ M and 45mU/ml, respectively) as detailed in Material and Methods in presence or absence of Cs⁺, TEA⁺, DIDS or SITS (10mM, 10mM, 500 μ M and 500 μ M, respectively). **(A)** Cell viability was measured by calcein assay at 6h after treatment. Ion channels blockers were added simultaneously with XXO. **(B)** Cell volume of GCN treated with XXO in presence or absence of ion channel blockers was estimated as relative cell volume change after 4 h. Bars are mean \pm SD of 4-6 independent experiments. Significant difference from K25 (**), XXO (**) is indicated ($p\leq 0.05$).

Reactive oxygen species participates in the p38-mediated apoptosis induced by potassium deprivation and staurosporine in cerebellar granule neurons.

Yazmín Ramiro-Cortés, Alicia Guemez-Gamboa and Julio Morán

División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, UNAM

During apoptosis induced by low potassium (K5) or staurosporine on cerebellar granule neurons a sharp increase on reactive oxygen species (ROS) levels is triggered. ROS inhibition by antioxidants or inhibition of NADPH oxidase (NOX) activity reduces the apoptosis induced by both stimuli. It has been reported that p38 mediate the apoptosis induced by K5; however, is unknown whether p38 activation is mediated or not by ROS. No information is available about the signaling pathway leading to staurosporine induced apoptosis. Here, we investigated whether p38 is activated during apoptosis induced by staurosporine and the role of ROS in both K5 and staurosporine models. We found that K5 activated p38 and ATF2, and the inhibition of p38 activation prevented the apoptosis induced by this treatment. Also, we found that p38 is downstream of the ROS generation induced by K5. On the other hand, staurosporine promoted the sustained activation of p38, whereas ATF2 was activated only transitory. We found that p38 inhibition markedly decreased ROS generation, NOX activity and apoptosis induced by staurosporine. Furthermore, antioxidants (kaempferol and FeTPPS) inhibited p38 activation induced by staurosporine. These data indicate that apoptosis induced by both K5 and staurosporine is dependent on p38 activation that is mediated by ROS. In addition, in the case of staurosporine, p38 activation also seems to induce ROS production through NOX activation.

Key words: apoptosis, ROS, antioxidants, NADPH oxidase, p38, staurosporine, caspase.

1. Introduction

The activation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) pathways, specifically p38 and JNK, play a critical role in the apoptosis of neurons induced by different stimuli (Cao et al., 2004; Nath et al., 2001; Porras et al., 2004; Ramiro-Cortés and Morán, 2009; Yamagishi et al., 2001). p38 is a subfamily of MAPKs that includes four isoforms, p38 α , p38 β , p38 γ and p38 δ , encoded by different genes and differentially expressed in the organism (Diskin et al., 2004; Ono and Han, 2000). p38 α and p38 β are ubiquitously expressed, whereas p38 γ is highly expressed in the muscle and p38 δ is enriched in lung and kidney (Godl et al., 2003; Jiang et al., 1996; Jiang et al., 1997; Li et al., 1996; Raman et al., 2007a; Takeda and Ichijo, 2002). p38 is activated by the MAP kinase kinases (MKKs) MKK3 and MKK6, which activate p38 by a dual phosphorylation in the threonine (Thr) and tyrosine (Tyr) residues in the motif Thr-Gly-Tyr (TGY) that is conserved in all isoforms (Ono and Han, 2000; Raman et al., 2007a; Takeda and Ichijo, 2002). Several MAP kinases

kinases (MKKKs) have been identified as upstream regulators of p38 pathway, including TAK1, ASK1, MEKK4 and TAO kinases (Raman et al., 2007b; Sakurai et al., 2000; Takeda and Ichijo, 2002; Zarubin and Han, 2005). In addition, it has been proposed a MAPKK-independent mechanism of activation of p38 mediated by autophosphorylation induced by TAB1 (Ge et al., 2002), revealing the complexity of p38 regulation. Recently, oxidative stress has been related to JNK and p38 activation in different models of apoptotic cell death (Chen et al., 2009; Ramiro-Cortés and Morán, 2009; Tobiume et al., 2001; Wang et al., 2003; Zhuang et al., 2000). In this regard, it has been reported that MAPKs activation is sensitive to oxidative stress as ASK1, a MAPKKK, is regulated by ROS (Gotoh and Cooper, 1998) leading to p38 and JNK activation (Tobiume et al., 2001). Interestingly, one of the most important sources of ROS, the NADPH oxidase (NOX), has a sequence that may be recognized by MAPKs (El Benna et al., 1994), suggesting a possible relationship between MAPKs and ROS sources.

NOX is an enzymatic complex that catalyzes NADPH-dependent reduction of oxygen to $O_2^{\bullet-}$ and it is constituted by two membranes subunits: p22^{phox} and the catalytic subunit gp91^{phox} (Nox2) and three cytosolic subunits: p47^{phox}, p67^{phox} and p40^{phox} (Bedard and Krause, 2007; Dang et al., 2006). The activation of NOX requires the translocation of the cytosolic components to the membrane to assemble the catalytic active oxidase. It is thought that the phosphorylation of p47^{phox} leads to a conformational change allowing its interaction with p22^{phox} in the membrane (Bedard and Krause, 2007; Dang et al., 2006). It has been reported that neurons express at least three homologues of NOX: NOX1, NOX2 and NOX4 (Bedard and Krause, 2007; Coyoy et al., 2008; Guemez-Gamboa and Moran, 2009).

It has been suggested that NOX contributes to neuronal apoptosis, as NOX2 deficient neurons or general NOX inhibitors induce resistance to apoptosis induced by NGF-deprivation in sympathetic neurons (Tammariello et al., 2000) and prevents apoptosis induced by potassium deprivation (K5) and staurosporine in cerebellar granule neurons (CGN) (Coyoy et al., 2008;Guemez-Gamboa and Moran, 2009).

When CGN cultured during 7-8 days in a medium containing 25 mM KCl (K25) are transferred to a 5 mM KCl containing medium (K5) or treated with staurosporine, most cells die by apoptosis after 24-48 h (Caballero-Benitez and Moran, 2003;D'mello et al., 1993;Gallo et al., 1987;Moran et al., 1999;Ramiro-Cortes and Moran, 2009) Also, under these conditions occurs a transient increase in ROS levels at early times (Martin-Romero et al., 2002;Ramiro-Cortes and Moran, 2009; Valencia and Moran, 2001). In this regard, the use of antioxidants and NADPH oxidase inhibitors prevent neuronal apoptotic death in different models (Coyoy et al., 2008;Ferri et al., 2003;Greenlund et al., 1995;Samhan-Arias et al., 2004;Valencia and Moran, 2001; Zhou et al., 2007), suggesting a critical contribution of ROS in the apoptotic neuronal death.

In the present study, we investigated the role of p38 in the apoptosis induced by K5 and staurosporine in CGN and evaluated a possible functional relationship between p38 activation and ROS generation and NOX activation during apoptotic death of these cells. Here, we found that the inhibition of p38 prevents the apoptosis induced by both K5 and staurosporine. The presence of antioxidants reduces the activation of p38 induced by K5 and staurosporine. Moreover, p38 activation is downstream of ROS generation and NOX activation induced by K5, but not by staurosporine. However, p38 activation induced by staurosporine was also inhibited by an antioxidant, suggesting that although p38 is possibly regulated by oxidative stress, it could also regulate ROS generation.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Fetal calf serum, penicillin/streptomycin and basal Eagle's medium were purchased from GIBCO, Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Dihydroethidium (DHEt), Hoechst 33258 and fluorescein diacetate (FDA) were purchased from Molecular Probes. Poly-L-lysine (mol. wt.>300,000), trypsin, trypsin inhibitor, DNase, cytosine arabinoside, kaempferol, DMSO and reagents for polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) were acquired from Sigma (St. Louis, MO, USA), FeTPPS was purchase from Merck (Darmstadt, Germany). ProSiev Protein Marker was purchased from Lonza (Basel, Switzerland). Polyvinylidene flouride (PVDF) membranes and Immobilon Western HRP substrate were acquired from Millipore (Concord Road, Billerica, MA) and BioMax Light Film was purchased from Kodak (Rochester, N.Y). Ac-DEVD-MCA was acquired from Peptides Intl. (Louisville, KY, USA), and catalase, SOD and Complete were acquired from Roche (Indianapolis, IN). SB203580 was purchased from Tocris (Ellisville, MO, USA). Antibody against p38 was purchased from (Santa Cruz, CA); p-p38 and p-ATF2 antibodies were purchased from Cell Signaling (Danvers, MA). Anti-GAPDH was acquired from Chemicon (Temecula, CA) and peroxidase-conjugated anti-

mouse and anti-rabbit were purchased from Jackson Immuno Research (West Grove, P.A.).

2.2. Cell cultures

All animals used for the experimentation described in the present study were treated in accordance with the accepted standards of animal care and with the procedures approved by the local Committee of Research and Ethics of the Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. The protocol used followed the Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience as well as guidelines released by the Mexican Institutes of Health Research and the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals. All efforts were made to minimize animal suffering, and to reduce the number of animals used.

Cerebellar granule neuron (CGN) cultures were prepared as previously described (Moran and Patel, 1989), briefly, cell suspensions dissociated from 8 day old Wistar rat cerebellum were plated at a density of 265×10^3 cells/cm² in plastic dishes coated previously with poly-L-lysine (5 µg/ml). The culture medium contained basal Eagle's medium supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum, 2 mM glutamine, 25 mM KCl, 50 µg/ml streptomycin and 50 U/ml penicillin. This medium is referred in the text as K25. The cultures dishes were incubated at 37°C in a humidified 5%CO₂/95% air atmosphere. Cytosine arabinoside (10 µM) was added 20 h after seeding. After 7–8 days *in vitro* (DIV), neurons were either transferred to a serum-free medium containing 5 mM KCl (referred to in the text as K5) or treated with 0.5 µM staurosporine for varying times (0.5–48 h). The inhibitor of p38 activation (SB203580) and the antioxidants were added simultaneously to K5 or staurosporine and were present until the end of the corresponding experiments.

2.3. Cell viability

Cell viability was estimated by fluorescein diacetate (FDA) and propidium iodide (PI) assay at 24 h after treatments of CGN. FDA permeates through cell membrane of healthy cells and emits green fluorescence when it is cleaved by

esterases. Cleaved FDA can no longer permeate cell membranes. Propidium iodide penetrates dying cells and binds to DNA emitting red fluorescence. Cells were plated in dishes and cultured in a K25 medium for 7 DIV and then switched to a K5 medium or treated with Staurosporine in the presence or absence of 10 µM of SB203580 (SB) for 24h. CGN were incubated with 5 µM of FDA and 5 µM of PI for 5 min at 37°C, washed twice with PBS and then observed and photographed with a fluorescence microscope using of 485-520 nm wavelengths for FDA and 450-510 nm wavelengths for PI.

2.4. Nuclear condensation

Nuclear condensation was evaluated by Hoechst 33258, which penetrates to cell and binds to DNA dyeing nuclei. Cells were plated on coverslips and cultured in a K25 medium for 7 DIV and then switched to a K5 medium or treated with staurosporine in the presence or absence of 10 µM SB203580. After 24 h, cells were washed with PBS and fixed in 4% fresh formaldehyde at room temperature for 30 min, then cultures were washed with PBS and incubated with 0.001% Hoechst 33258 at room temperature for 5 min, washed with PBS and mounted with PBS-glycerol 1:1 v/v. Cells were observed and photographed in an epifluorescence microscope with an UV BA-2 filter using a 340-460 nm wavelengths.

2.5. Caspase activity

Caspase activity was evaluated by a fluorogenic technique (Thornberry et al., 1997) by using the synthetic tetrapeptide Ac-DEVD-MCA, which is fragmented by caspase 3 releasing the fluorophore MCA that emits fluorescence proportional to caspase activity. CGN were treated from 6 h to 48 h with K5 or Staurosporine under the indicated conditions and cells were washed with PBS and homogenized in lysis buffer (100 mM HEPES, 20 µM EGTA, 1 mM EDTA at 7.5 pH), 10% (w/v) sucrose, 1 M DTT, 0.1% (w/v) CHAPS and 20 µl/ml complete), diluted 1:1 (v/v) with glycerol and stored at -20°C. Caspase activity was assayed in a spectrofluorophotometer RF-5301PC from Shimadzu. Reaction was followed for 15 min at 360-440 nm after addition of 2.5

ml of a standard buffer (100 mM, HEPES, 20 μ M EGTA, 1 mM EDTA at 7.5 pH), 10% (w/v) sucrose, 1 M DTT, 0.1% (w/v) CHAPS and 2 μ l/ml Complete), 5 μ M Ac-DEVD-MCA and cell homogenate (30 μ g/ml). Results are expressed as DEVDase activity, expressed as the change in fluorescence intensity/h/mg protein.

2.6. Measurement of ROS

ROS generation was measured by using dihydroethidium (DHEt), which after its oxidation by ROS intercalates within the DNA and emits red fluorescence. Cells were plated on coverslips and cultured in a K25 medium for 7 DIV and then switched to a K5 medium for 4.5 h or treated staurosporine 5 h in the presence or absence of 10 μ M SB203580 or antioxidants such as 20 μ M kaempferol (Kmp), 125 U/ml superoxide dismutase (SOD), 125 U/ml catalase (CAT) and 100 μ M FeTPPS. After 4.5 h (K5) or 5h (staurosporine) cells were incubated with 3.2 μ M dihydroethidium (DHEt) for 20 min at 37°C, washed with PBS, fixed in 3% fresh formaldehyde for 7 min at room temperature and then mounted with PBS-glycerol 1:1 v/v. Cells were examined in an epifluorescence microscope using a rhodamine filter (488-515 nm).

2.7. Western blot

CGN were cultured in a K25 medium for 7 DIV and then switched to a K5 medium or treated with staurosporine from 15 min to 6 h and from 5 min to 6 h, respectively. Some cells were treated with 10 μ M SB203580 or antioxidants. Cells were washed twice in ice-cold PBS, and homogenized in lysis buffer (20 mM Tris HCl, pH 7.8, 1 mM EDTA, 20 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 0.5 mM Na_3VO_4 , 0.5 mM PMSF, 1 mM NaF, 1 μ g/ml leupeptine, 1 μ g/ml aprotinin and 1 μ g/ml pepstatin). The protein concentration of cellular homogenates was determined by the Bradford method. Homogenates (40 μ g protein per lane) were subjected to 12.5% SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes at 100 V for 1 hr. The membranes were blocked with Tris-buffered saline (TBS)/Tween 20 (TTBS) buffer (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl and 0.1% Tween, pH 7.5) containing 5% nonfat dry milk for 1 hr at room

temperature and incubated overnight with the primary antibody. Antibodies used were as follow: 1:1000 mouse anti p38, 1:1000 mouse anti p-p38, 1:1000 rabbit anti-pATF2 and 1:2000 mouse anti GAPDH. After further washing, the blots were incubated with peroxidase-conjugated anti-mouse 1:10000 or peroxidase-conjugated anti-rabbit 1:10000 for 2 hr at room temperature. Bands were visualized using chemiluminescence according to the manufacturer's recommendations and exposed to Kodak BioMaxLightFilm.

2.8. NOX activity

The activity of NOX was assessed as superoxide production measured in a quantitative kinetic assay based on the reduction of cytochrome c. CGN were treated for 5 h with staurosporine 0.5 μ M in the absence or presence of 10 μ M SB203580, washed with PBS and homogenized in a buffer containing: 150 mM KCl, 150 mM Na_3PO_4 , 1 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA and 2 mM NaN_3 . Cell homogenates were incubated with a reaction mixture containing 0.1 mM cytochrome c, 10 mM FAD and 0.1 mM SDS. The reaction started with the addition of 0.2 mM NADPH to the mixture. The reference cuvette additionally contained 300 U/ml SOD. Reduction of cytochrome c was measured at 550 nm. Results are expressed as the difference between reduced and oxidized cytochrome c per hour per milligram of protein.

2.9. Statistical analysis

Data are expressed as means \pm SE. Statistical significance was defined by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison tests. To establish the statistical significance for caspase 3 activity, we applied Kruskal-Wallis followed by Dunn test. At least three independent experiments using different cultures sets were carried out for each assay. A value of $p < 0.05$ was accepted to indicate a statistically significance difference.

3. Results

3.1. p38 activation induced by K5 and staurosporine

In order to identify whether p38 and ATF2 are activated by K5 in CGN, we performed a time

course of neurons treated with K5 for 0.25- 6 h. Under these conditions, we found a significant increase of p-p38 levels at 0.5 h that remained unchanged 4.5 h after treatment, decreasing to basal levels after 6 h. Similarly, the activation of ATF2 was significantly increased at 0.75 h and it remained active at 3 h, returning to basal levels after 4.5 h of K5 treatment (Fig. 1A). On the other hand, we found that staurosporine activated p38 from 0.75 h and remained active at least 6 h after treatment, whereas a transient increase in ATF2 phosphorylation was detected at 5 min followed by a marked decrease in p-ATF2 after 0.75 h (Fig. 1B).

3.2. p38 activation is involved in the K5 and staurosporine-induced cell death

To evaluate the role of p38 activation on the cell death induced by K5 and staurosporine, we tested the effect of the inhibitor SB203580 (SB), which binds to the ATP site of p38 preventing its phosphorylation and consequently its kinase activity. In this regard, we found that SB prevented the phosphorylation of p38 induced by K5 and staurosporine (Fig. 2C). The effect of SB was evaluated on cell viability assessed by FDA/PI assay after 24 h of K5 and staurosporine treatment. Under these conditions most cells exhibited degeneration of somas and neuritic processes, whereas neurons treated with SB showed a similar morphology than control cells (K25) (Fig. 2A). The evaluation of viability with FDA showed a decrease of viable cells from $88.88 \pm 3.7\%$ in control cultures (K25) to $54.17 \pm 1.25\%$ in K5 treated cells (Fig. 2B). In cultures treated simultaneously with K5 and SB cell viability was clearly increased to $75.64 \pm 1.67\%$ (Fig. 2B). Staurosporine treatment reduced the number of FDA positive cells to $46.43 \pm 1.67\%$. The presence of SB increased to $69.91 \pm 3.08\%$ the number of viable cells (Fig. 2B). Altogether these results suggest a role of p38 activation on cell death induced by K5 and staurosporine.

3.3. Cell death mediated by p38 activation induced by K5 and staurosporine shows apoptotic features

We evaluated the activation of caspase 3 activity, using a fluorogenic substrate Ac-DEVD-MCA, and nuclear condensation as apoptotic parameters. As it has been reported (Moran et al., 1999; Caballero-Benitez and Moran, 2003), an increase of caspase 3 activity was detected after 8h of K5 and staurosporine treatment, reaching a maximum level between 12 h and 24 h. Under these conditions, we found that SB inhibited the caspase 3 activity induced by K5 and staurosporine (Fig. 3A,B). In line with these results, we observed that $3.56 \pm 0.60\%$ of neurons have condensed nuclei under control conditions (K25) (fig. 3C). In contrast, treatment with K5 induced an increase to $30.56 \pm 2.54\%$ of condensed nuclei, which was markedly reduced by SB to $10.11 \pm 3.00\%$ (Fig. 3C). Figure 3C shows that staurosporine induced an increase of $40.17 \pm 2.29\%$ of condensed nuclei that was inhibited about 50% by SB ($24.51 \pm 4.42\%$). These results suggest that apoptotic death of CGN induced by K5 and staurosporine is mediated by p38 activation.

3.4. Role of p38 on ROS generation induced by K5 and staurosporine

Previous studies (Coyoy et al., 2008; Ramiro-Cortes and Moran, 2009) have shown increased ROS levels after 4-5 h of K5 and staurosporine treatments. To assess whether p38 activation is upstream or downstream to ROS generation, we tested the effect of SB on neurons treated with K5 for 4.5 h or staurosporine for 5 h, the times. ROS generation was measured with DHEt. After K5 treatment, ROS levels increased $46.41 \pm 4.13\%$ DHEt positive cells, as compared to control conditions (K25) ($0.63 \pm 0.26\%$ positive cells). The presence of SB did not have any effect on the ROS levels induced by K5 ($45.14 \pm 5.14\%$ DHEt positive cells) (Fig. 4A). In contrast, in cells treated with staurosporine, SB markedly reduced ROS generation induced by staurosporine alone ($13.11 \pm 1.90\%$ DHEt positive cells) to $3.93 \pm 0.65\%$ DHEt positive cells (Fig. 4B). These data indicate that ROS induced by K5 are upstream to p38 activation,

whereas ROS induced by staurosporine are downstream to p38 activation.

3.5. NOX activity induced by staurosporine is inhibited by SB203580

According to previous reports NOX seems to be one of the ROS source implied in apoptotic death induced by staurosporine. NOX activation occurs after 5-6 h of staurosporine treatment (Coyoy et al., 2008; Guemez-Gamboa and Moran, 2009). In this regard, we found that staurosporine treatment induced NOX activity at 5 h and that the inhibition of p38 activation by SB prevented the NOX activation (Fig. 5A), suggesting that p38 activity is required for NOX activation. In agreement with this observation, we found that p38 inhibition induces a protective effect on cell viability when SB is added at any time during the first 4 h post-treatment (Fig. 5B). After this time no protecting effect of SB was observed (Fig. 5B).

3.6. Antioxidants prevents p38 activation induced by K5 and staurosporine

To elucidate the possible role of oxidative stress on p38 activation induced by K5, and to verify that p38 activation is downstream ROS generation, we evaluated the effect of the antioxidants kaempferol and FeTTPS on p38 phosphorylation induced by K5 and staurosporine. Both antioxidants have shown to reduce ROS generation and cell death induced by K5 (Ramiro-Cortes and Moran, 2009) and staurosporine (Ramiro-Cortes and Moran, 2009; Supplementary figure). Under these conditions, we observed that p38 phosphorylation induced by K5 at 45 min and 3 h was completely inhibited by the antioxidant kaempferol (Fig. 6A, B). In staurosporine treatment, as was demonstrated above p38 activation is upstream of ROS generation (Fig. 4B, 5B). However, we cannot discard that p38 activation could be affected by oxidative stress. In order to verify this idea, we tested the effect of antioxidants on the activation of p38 at two different times (45 min and 5 h) induced by staurosporine. We found that p38 phosphorylation at 45 min was not modified by any of antioxidants tested (Fig. 7A).

In contrast, phosphorylation induced by staurosporine at 5 h was totally diminished by both kaempferol and FeTTPS (Fig. 7B). This suggests that ROS also could regulate the activation of p38 induced by staurosporine.

4. Discussion

In previous studies, we have shown that apoptotic cell death induced by K5 in CGN is dependent on JNK pathway activation and that this activation is mediated by ROS. In this regard, and in line with previous studies (Harada and Sugimoto, 1999; Nath et al., 2001; Yamagishi et al., 2001), here we demonstrated that p38 and ATF2, a substrate of p38, are activated by K5 in CGN. The time course of p38 activation occurs early in the process and corresponds to the critical time for the initiation of the apoptotic program induced by K5 in CGN (Valencia and Morán, 2001). This activation seems to be related to the process of apoptotic death of CGN. This is supported by the observation that the inhibitor of p38 activation, SB203580 (Davies et al., 2000; Godl et al., 2003; Salvador et al., 2005), suppressed the induced p38 phosphorylation and also prevented cell death induced by K5, as well as the apoptotic parameters assessed, including caspase 3 activity and nuclear condensation. This supports the notion that p38 play a pivotal role in the apoptosis of CGN induced by K5.

It has been established that during K5 induced apoptosis, increased ROS levels is an early event that plays a pivotal role because when antioxidant compounds are administered cell death can be prevented (Coyoy et al., 2008; Martin-Romero et al., 2002; Ramiro-Cortes and Moran, 2009; Samhan-Arias et al., 2004; Valencia and Moran, 2001). We and other research groups have reported that administration of antioxidants prevents MAPKs activation in different cellular models suggesting ROS as mediator of the activation of these kinases (Hong et al., 2009; Ramiro-Cortes and Moran, 2009). In line with these results, it has been reported that apoptosis induced by direct exposition to oxidants as malonate, hydrogen peroxide or singlet oxygen, also induced p38

activation on cortical neurons and cell lines (Gomez-Lazaro et al., 2007; Wang et al., 2003; Zhuang et al., 2000). Taking into account that K5 induce an oxidative stress, we evaluate whether p38 activation is upstream or downstream ROS generation. In this regard, we found that p38 activation is downstream of ROS generation, since p38 inhibition by SB did not prevent the oxidative stress induced by K5. According to this, we found that p38 remains phosphorylated after 4.5 h of K5 treatment, suggesting oxidative stress as an activator of p38 because at this time ROS reaches a maximum level induced by K5 (Ramiro-Cortes and Moran, 2009). This idea was confirmed when kaempferol prevented K5 induced p38 activation. Altogether, these data suggest that p38 and JNK pathways share characteristics akin, as both kinases activation is ROS dependent and both regulate K5 induced apoptosis.

On the other hand, not information about the signaling pathways activated during staurosporine induced apoptosis is available in neurons. We know that apoptosis induced by staurosporine is independent of JNK pathway and there are some reports that shown p38 activation by staurosporine in astrocytes and human neuroblastoma cells (D'alimonte et al., 2007; Fitzgerald et al., 2007). This supports the notion that another signaling pathway triggers the apoptotic machinery, leading the cell death induced by staurosporine. In this study, we have shown for the first time that p38 is activated by staurosporine. For this reason, we perform a time course in order to define whether p38 is being activated and for how long. Our results demonstrate that p38 is being activated in sharp fashion, however ATF2, one of its preferential substrates (Waas et al., 2001), is only activated transitory. Our data also indicate that p38 activation time frame is different from ATF2 activation, suggesting that staurosporine induced ATF2 activation could be independent of p38 activation. We evaluated the role of p38 on cell death induced by staurosporine using SB. In this regard, we demonstrated that the administration of SB prevented p38 phosphorylation induced by staurosporine,

promoting cell survival due to the inhibition of caspase 3 activity and nuclear condensation induced by staurosporine. These data demonstrate for the first time that staurosporine induced apoptosis on CGN is p38 dependent.

As we mentioned before p38 activation is sensitive to ROS, In addition, staurosporine induced p38 activation at short times (45 min) was not inhibited by any antioxidants tested, maybe because at this time ROS are in basal levels (Ramiro-Cortes and Moran, 2009), in contrast, when p38 is activated 5 h after treatment, at least two antioxidants kaempferol and FeTPPS, prevented p38 activation induced by staurosporine. This time correlates with the time at which maximum level of ROS induced by staurosporine is reached. We also found that the inhibition of p38 activation prevented staurosporine induced ROS generation. Studies on neutrophils reported that p38 activates NOX by phosphorylating p47^{phox} (Brown et al., 2004; Dang et al., 2003; Dang et al., 2006; El Benna et al., 1994). Recently, it has been reported that p38 could induce the activation of both NOX and the inducible form of nitric oxide synthase (iNOS) in astrocytes (Yoo et al., 2008). These studies are focus in the contribution of p38 in inflammatory response, however, recently our group had demonstrated that staurosporine induced apoptosis in CGN is mediated by NOX (Coyoy et al., 2008; Guemez-Gamboa and Moran, 2009). In line with these previous reports, we found that staurosporine induced NOX activity was prevented by the inhibition of p38 activation; supporting the notion that p38 could regulate ROS generation through the induction of NOX activity. In summary, our data indicate that apoptosis induced by K5 treatment is dependent on p38 activation, which is mediated by ROS, due to kaempferol prevented the p38 phosphorylation induced by K5. On the other hand, staurosporine induced apoptosis is dependent on p38 activation therefore; p38 regulates ROS generation through NOX activity. Additionally, p38 activation also could be mediated by ROS on apoptotic death induced staurosporine of cerebellar granule neurons, because kaempferol

and FeTPPS prevented the p38 activation, suggesting that p38 could regulate the ROS generation and could be regulated by ROS in apoptosis induced by staurosporine.

Acknowledgements The authors are grateful to Guadalupe Dominguez for the excellent technical assistance. This work was supported by DGAPA-UNAM (IN223107) and CONACYT (47158Q). R-C, Y. and G-G, A. were supported by a CONACYT fellowship.

References

- Alavez, S., Pedroza, D., Moran, J. 2003. Mechanisms of cell death by deprivation of depolarizing conditions during cerebellar granule neurons maturation. *Neurochem Int* 43, 581-90.
- Becker, E.B., Bonni, A. 2004. Cell cycle regulation of neuronal apoptosis in development and disease. *Prog Neurobiol* 72, 1-25.
- Bedard, K., Krause, K.H. 2007. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 87, 245-313.
- Brown, G.E., Stewart, M.Q., Bissonnette, S.A., Elia, A.E., Wilker, E., Yaffe, M.B. 2004. Distinct ligand-dependent roles for p38 MAPK in priming and activation of the neutrophil NADPH oxidase. *J Biol Chem* 279, 27059-68.
- Buss, R.R., Oppenheim, R.W. 2004. Role of programmed cell death in normal neuronal development and function. *Anat Sci Int* 79, 191-7.
- Caballero-Benitez, A., Moran, J. 2003. Caspase activation pathways induced by staurosporine and low potassium: role of caspase-2. *J Neurosci Res* 71, 383-96.
- Cao, J., Semenova, M.M., Solovyan, V.T., Han, J., Coffey, E.T., Courtney, M.J. 2004. Distinct requirements for p38alpha and c-Jun N-terminal kinase stress-activated protein kinases in different forms of apoptotic neuronal death. *J Biol Chem* 279, 35903-13.
- Chen, L., Liu, L., Yin, J., Luo, Y., Huang, S. 2009. Hydrogen peroxide-induced neuronal apoptosis is associated with inhibition of protein phosphatase 2A and 5, leading to activation of MAPK pathway. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 1284-95.
- Coyoy, A., Valencia, A., Guemez-Gamboa, A., Moran, J. 2008. Role of NADPH oxidase in the apoptotic death of cultured cerebellar granule neurons. *Free Radic Biol Med* 45, 1056-64.
- D'Alimonte, I., Ballerini, P., Nargi, E., Buccella, S., Giuliani, P., Di Iorio, P., Caciagli, F., Ciccarelli, R. 2007. Staurosporine-induced apoptosis in astrocytes is prevented by A1 adenosine receptor activation. *Neurosci Lett* 418, 66-71.
- D'Mello, S.R., 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, 10989-93.
- Dang, P.M., Morel, F., Gougerot-Pocidallo, M.A., El Benna, J. 2003. Phosphorylation of the NADPH oxidase component p67 by ERK2 and P38MAPK: selectivity of phosphorylated sites and existence of an intramolecular regulatory domain. *Biochemistry* 42, 4520-6.
- Dang, P.M., Stensballe, A., Boussetta, T., Raad, H., Dewas, C., Kroviarski, Y., Hayem, G., Jensen, O.N., El-Benna, J. 2006. A specific p47-serine phosphorylated by convergent MAPKs mediates neutrophil NADPH oxidase priming at inflammatory sites. *J Clin Invest* 116, 2033-43.
- Davies, S.P., Reddy, H., Caivano, M., Cohen, P. 2000. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* 351, 95-105.
- Diskin, R., Askari, N., Capone, R., Engelberg, D., Livnah, O. 2004. Active mutants of the human p38alpha mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 279, 47040-9.
- el Benna, J., Faust, L.P., Babior, B.M. 1994. The phosphorylation of the respiratory burst oxidase component p47phox during neutrophil activation. Phosphorylation of sites recognized by protein kinase C and by proline-directed kinases. *J Biol Chem* 269, 23431-6.
- Ferri, P., Cecchini, T., Ciaroni, S., Ambrogini, P., Cuppini, R., Santi, S., Benedetti, S., Pagliarani, S., Del Grande, P., Papa, S. 2003. Vitamin E affects cell death in adult rat dentate gyrus. *J Neurocytol* 32, 1155-64.
- Fitzgerald, J.C., Ufer, C., De Girolamo, L.A., Kuhn, H., Billett, E.E. 2007. Monoamine oxidase-A modulates apoptotic cell death induced by staurosporine in human neuroblastoma cells. *J Neurochem* 103, 2189-99.
- Gallo, V., Kingsbury, A., Balazs, R., Jorgensen, O.S. 1987. The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J Neurosci* 7, 2203-13.
- Ge, B., Gram, H., Di Padova, F., Huang, B., New, L., Ulevitch, R.J., Luo, Y., Han, J. 2002. MAPKK-independent activation of p38alpha mediated by TAB1-dependent autophosphorylation of p38alpha. *Science* 295, 1291-4.

- Godl, K., Wissing, J., Kurtenbach, A., Habenberger, P., Blencke, S., Gutbrod, H., Salassidis, K., Stein-Gerlach, M., Missio, A., Cotten, M., Daub, H. 2003. An efficient proteomics method to identify the cellular targets of protein kinase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15434-9.
- Gomez-Lazaro, M., Galindo, M.F., Melero-Fernandez de Mera, R.M., Fernandez-Gomez, F.J., Concannon, C.G., Segura, M.F., Comella, J.X., Prehn, J.H., Jordan, J. 2007. Reactive oxygen species and p38 mitogen-activated protein kinase activate Bax to induce mitochondrial cytochrome c release and apoptosis in response to malonate. *Mol Pharmacol* 71, 736-43.
- Gotoh, Y., Cooper, J.A. 1998. Reactive oxygen species- and dimerization-induced activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 in tumor necrosis factor-alpha signal transduction. *J Biol Chem* 273, 17477-82.
- Greenlund, L.J., Deckwerth, T.L., Johnson, E.M., Jr. 1995. Superoxide dismutase delays neuronal apoptosis: a role for reactive oxygen species in programmed neuronal death. *Neuron* 14, 303-15.
- Guemez-Gamboa, A., Moran, J. 2009. NOX2 mediates apoptotic death induced by staurosporine but not by potassium deprivation in cerebellar granule neurons. *J Neurosci Res* 87, 2531-40.
- Harada, J., Sugimoto, M. 1999. An inhibitor of p38 and JNK MAP kinases prevents activation of caspase and apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *Jpn J Pharmacol* 79, 369-78.
- Henderson, C.E. 1996. Programmed cell death in the developing nervous system. *Neuron* 17, 579-85.
- Hong, J.T., Yen, J.H., Wang, L., Lo, Y.H., Chen, Z.T., Wu, M.J. 2009. Regulation of heme oxygenase-1 expression and MAPK pathways in response to kaempferol and rhannocitrin in PC12 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 237, 59-68.
- Jiang, Y., Chen, C., Li, Z., Guo, W., Gegner, J.A., Lin, S., Han, J. 1996. Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta). *J Biol Chem* 271, 17920.
- Jiang, Y., Gram, H., Zhao, M., New, L., Gu, J., Feng, L., Di Padova, F., Ulevitch, R.J., Han, J. 1997. Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 272, 30122-8.
- Kuida, K., Haydar, T.F., Kuan, C.Y., Gu, Y., Taya, C., Karasuyama, H., Su, M.S., Rakic, P., Flavell, R.A. 1998. Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell* 94, 325-37.
- Li, Z., Jiang, Y., Ulevitch, R.J., Han, J. 1996. The primary structure of p38 gamma: a new member of p38 group of MAP kinases. *Biochem Biophys Res Commun* 228, 334-40.
- Lindsten, T., Ross, A.J., King, A., Zong, W.X., Rathmell, J.C., Shiels, H.A., Ulrich, E., Waymire, K.G., Mahar, P., Frauwirth, K., Chen, Y., Wei, M., Eng, V.M., Adelman, D.M., Simon, M.C., Ma, A., Golden, J.A., Evan, G., Korsmeyer, S.J., MacGregor, G.R., Thompson, C.B. 2000. The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell* 6, 1389.
- Lossi, L., Merighi, A. 2003. In vivo cellular and molecular mechanisms of neuronal apoptosis in the mammalian CNS. *Prog Neurobiol* 69, 287-312.
- Martin-Romero, F.J., Garcia-Martin, E., Gutierrez-Merino, C. 2002. Inhibition of oxidative stress produced by plasma membrane NADH oxidase delays low-potassium-induced apoptosis of cerebellar granule cells. *J Neurochem* 82, 705-15.
- Misko, T.P., Highkin, M.K., Veenhuizen, A.W., Manning, P.T., Stern, M.K., Currie, M.G., Salvemini, D. 1998. Characterization of the cytoprotective action of peroxynitrite decomposition catalysts. *J Biol Chem* 273, 15646.
- Moran, J., Itoh, T., Reddy, U.R., Chen, M., Alnemri, E.S., Pleasure, D. 1999. Caspase-3 expression by cerebellar granule neurons is regulated by calcium and cyclic AMP. *J Neurochem* 73, 568-77.
- Moran, J., Patel, A.J. 1989. Effect of potassium depolarization on phosphate-activated glutaminase activity in primary cultures of cerebellar granule neurons and astroglial cells during development. *Brain Res Dev Brain Res* 46, 97-105.
- Nardi, N., Avidan, G., Daily, D., Zilkha-Falb, R., Barzilai, A. 1997. Biochemical and temporal analysis of events associated with apoptosis induced by lowering the extracellular potassium concentration in mouse cerebellar granule neurons. *J Neurochem* 68, 750-9.
- Nath, R., McGinnis, K., Dutta, S., Shivers, B., Wang, K.K. 2001. Inhibition of p38 kinase mimics survival signal-linked protection against apoptosis in rat neurons. *Cell Mol Biol Lett* 6, 173-84.
- Ono, K., Han, J. 2000. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal* 12, 1.
- Pettmann, B., Henderson, C.E. 1998. Neuronal cell death. *Neuron* 20, 633-47.
- Porras, A., Zuluaga, S., Black, E., Valladares, A., Alvarez, A.M., Ambrosino, C., Benito, M., Nebreda, A.R. 2004. P38 alpha mitogen-activated protein

kinase sensitizes cells to apoptosis induced by different stimuli. *Mol Biol Cell* 15, 922-33.

Prehn, J.H., Jordan, J., Ghadge, G.D., Preis, E., Galindo, M.F., Roos, R.P., Kriegstein, J., Miller, R.J. 1997. Ca²⁺ and ROS in staurosporine-induced neuronal apoptosis. *J Neurochem* 68, 1679-85.

Raman, M., Chen, W., Cobb, M.H. 2007a. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 26, 3100-12.

Raman, M., Earnest, S., Zhang, K., Zhao, Y., Cobb, M.H. 2007. TAO kinases mediate activation of p38 in response to DNA damage. *EMBO J* 26, 2005-14.

Ramiro-Cortes, Y., Moran, J. 2009. Role of oxidative stress and JNK pathway in apoptotic death induced by potassium deprivation and staurosporine in cerebellar granule neurons. *Neurochem Int* 55, 581-92.

Sakurai, H., Miyoshi, H., Mizukami, J., Sugita, T. 2000. Phosphorylation-dependent activation of TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase by TAB1. *FEBS Lett* 474, 141-5.

Salvador, J.M., Mittelstadt, P.R., Guszczynski, T., Copeland, T.D., Yamaguchi, H., Appella, E., Fornace, A.J., Jr., Ashwell, J.D. 2005. Alternative p38 activation pathway mediated by T cell receptor-proximal tyrosine kinases. *Nat Immunol* 6, 390-5.

Samhan-Arias, A.K., Martin-Romero, F.J., Gutierrez-Merino, C. 2004. Kaempferol blocks oxidative stress in cerebellar granule cells and reveals a key role for ROS production at the plasma membrane in the commitment to apoptosis. *Free Radic Biol Med* 37, 48-61.

Schulz, J.B., Weller, M., Klockgether, T. 1996. 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* 16, 4696-706.

Takeda, K., Ichijo, H. 2002. Neuronal p38 MAPK signalling: an emerging regulator of cell fate and function in the nervous system. *Genes Cells* 7, 1099-111.

Tammariello, S.P., Quinn, M.T., Estus, S. 2000. NADPH oxidase contributes directly to oxidative stress and apoptosis in nerve growth factor-deprived sympathetic neurons. *J Neurosci* 20, RC53.

Thornberry, N.A., Rano, T.A., Peterson, E.P., Rasper, D.M., Timkey, T., Garcia-Calvo, M., Houtzager, V.M., Roy, S., Vaillancourt, J.P., Chapman, K.T., Nicholson, D.W. 1997. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* 272, 17907-11.

Tobiome, K., Matsuzawa, A., Takahashi, T., Nishitoh, H., Morita, K., Takeda, K., Minowa, O., Miyazono, K., Noda, T., Ichijo, H. 2001. ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep* 2, 222-8.

Valencia, A., Moran, J. 2001. Role of oxidative stress in the apoptotic cell death of cultured cerebellar granule neurons. *J Neurosci Res* 64, 284.

Waas, W.F., Lo, H.H., Dalby, K.N. 2001. The kinetic mechanism of the dual phosphorylation of the ATF2 transcription factor by p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase alpha. Implications for signal/response profiles of MAP kinase pathways. *J Biol Chem* 276, 5676-84.

Wang, J.Y., Shum, A.Y., Ho, Y.J. 2003. Oxidative neurotoxicity in rat cerebral cortex neurons: synergistic effects of H₂O₂ and NO on apoptosis involving activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Neurosci Res* 72, 508-19.

Woo, M., Hakem, R., Soengas, M.S., Duncan, G.S., Shahinian, A., Kagi, D., Hakem, A., McCurrach, M., Khoo, W., Kaufman, S.A., Senaldi, G., Howard, T., Lowe, S.W., Mak, T.W. 1998. Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes Dev* 12, 806.

Yamagishi, S., Yamada, M., Ishikawa, Y., Matsumoto, T., Ikeuchi, T., Hatanaka, H. 2001. p38 mitogen-activated protein kinase regulates low potassium-induced c-Jun phosphorylation and apoptosis in cultured cerebellar granule neurons. *J Biol Chem* 276, 5129-33.

Yoo, B.K., Choi, J.W., Shin, C.Y., Jeon, S.J., Park, S.J., Cheong, J.H., Han, S.Y., Ryu, J.R., Song, M.R., Ko, K.H. 2008. Activation of p38 MAPK induced peroxynitrite generation in LPS plus IFN-gamma-stimulated rat primary astrocytes via activation of iNOS and NADPH oxidase. *Neurochem Int* 52, 1188-97.

Zarubin, T., Han, J. 2005. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res* 15, 11-8.

Zhou, M., Dominguez, R., Baudry, M. 2007. Superoxide dismutase/catalase mimetics but not MAP kinase inhibitors are neuroprotective against oxygen/glucose deprivation-induced neuronal death in hippocampus. *J Neurochem* 103, 2212-23.

Zhuang, S., Demirs, J.T., Kochevar, I.E. 2000. p38 mitogen-activated protein kinase mediates bid cleavage, mitochondrial dysfunction, and caspase-3 activation during apoptosis induced by singlet oxygen but not by hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 275, 25939-48.

FIGURES

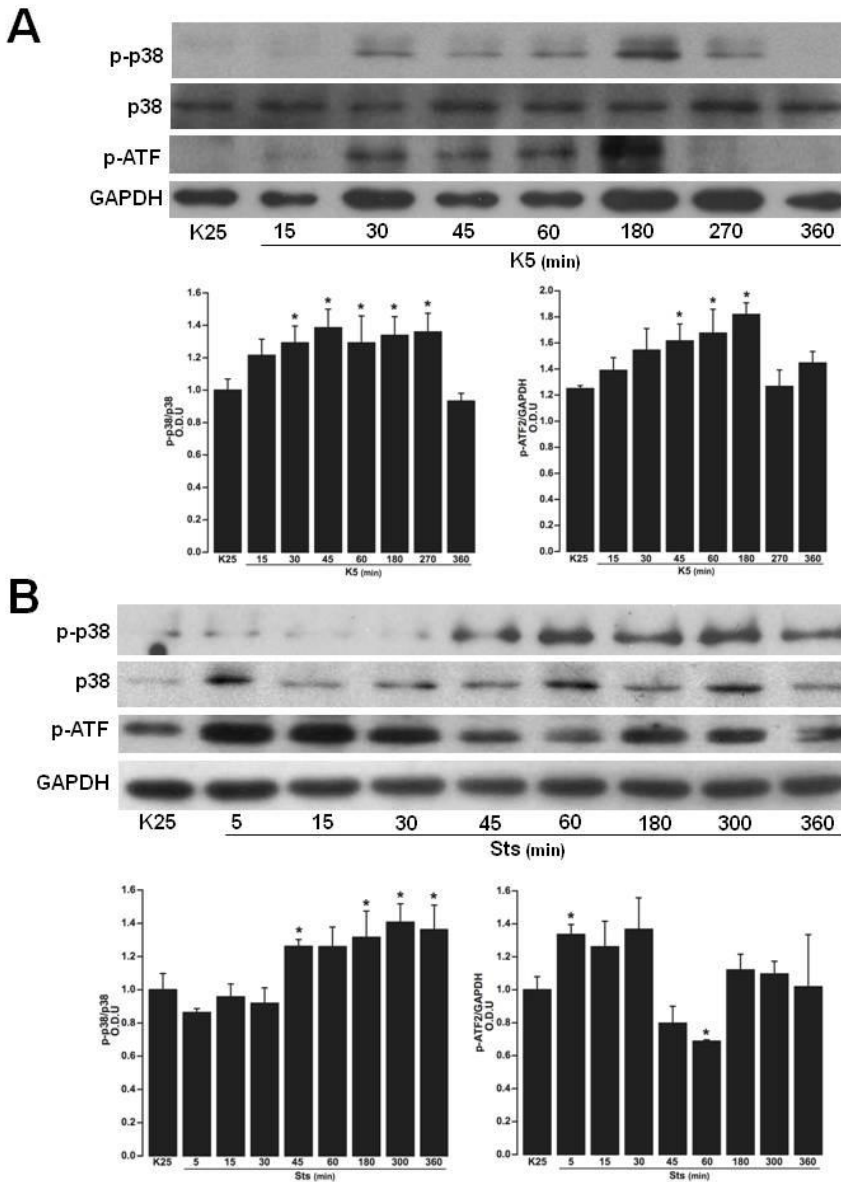


Fig. 1. *p38* and *ATF2* activation induced by *K5* or *staurosporine*. Cultures of CGN maintained in *K25* for 7 DIV were transferred to a *K5* medium for 15 min to 6h, or treated with 0.5 μ M *staurosporine* (*Sts*) for 5 min to 6 h. Bars indicate the ratio of the phosphorylated protein and no phosphorylated protein or *GAPDH* expressed in optic density units (O.D.U). (A) Time course of p-*p38* and p-*ATF2* levels in *K5*. Bars are means \pm S.E. of six independent experiments, **p* < 0.05 versus *K25*. (B) Time course of p-*p38* and p-*ATF2* levels in *staurosporine*. Bars are means \pm S.E. of seven independent experiments, **p* < 0.05 versus *K25*.

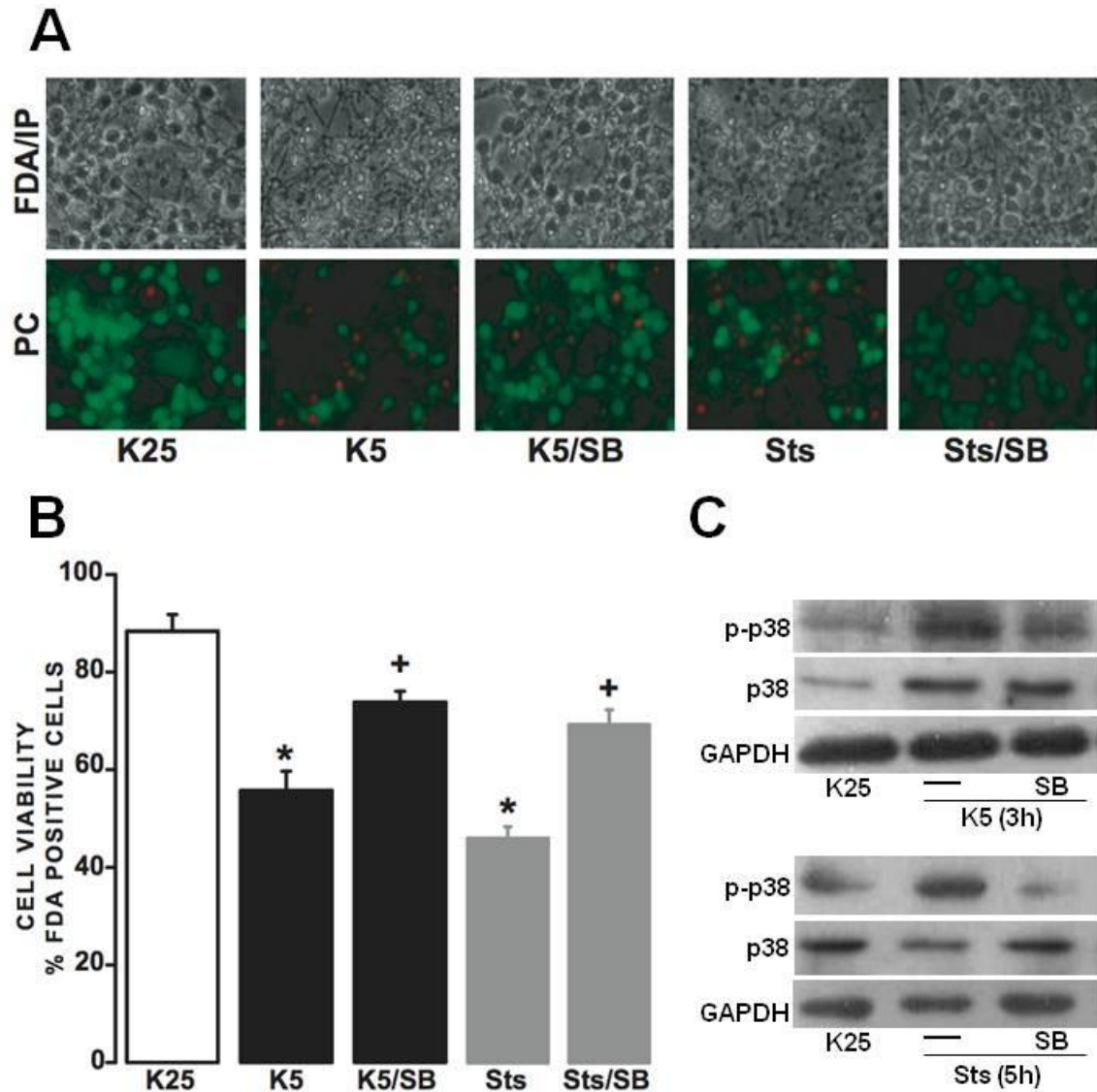


Fig. 2. Effect of the inhibition of p38 activation on cell death induced by K5 or staurosporine. Cells maintained in K25 for 7 DIV were transferred to a K5 medium or treated with 0.5 μ M staurosporine (Sts) in the presence or absence of 10 μ M SB203580 (SB), after 24 h each treatment the cell viability was determined by FDA/PI assay. (A) Photomicrographs of cells in phase contrast (PC) dyed with FDA and dyed with PI. (B) Quantification of cell viability. Results are expressed as the percentage of FDA positive cells from total cells. Bars are the means S.E. of ten independent experiments, * $p < 0.05$ versus K25, + $p < 0.05$ versus K5.

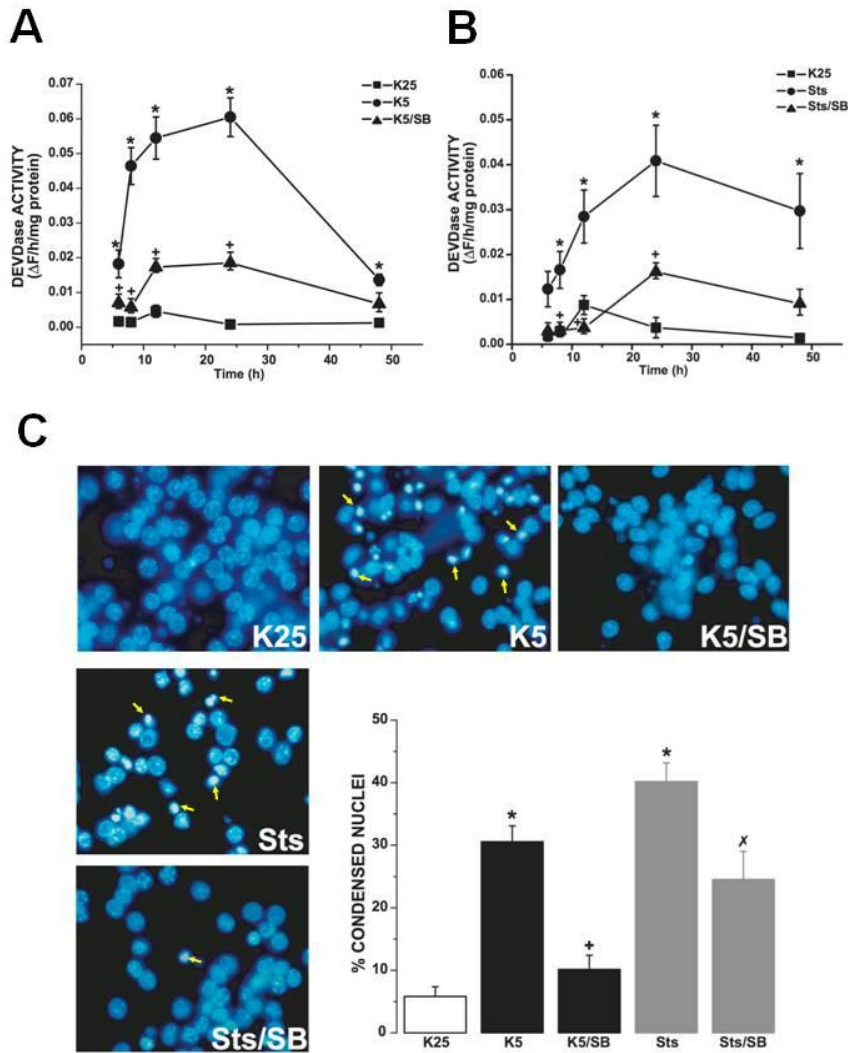


Fig. 3. *p38* activation regulates caspase 3 activity and nuclear condensation induced by K5 and Sts. (A,B) Cells maintained in K25 for 7 DIV were transferred to a K5 medium or treated with 0.5 μ M Sts in absence or presence of 10 μ M SB203580 (SB) for 6h to 48h. Caspase 3 activity was evaluated by fluorometric method. Results are expressed as fluorescence change per hour per milligram of protein and are means \pm S.E. of ten independent experiments, * $p < 0.05$ versus K25, + $p < 0.05$ versus K5. (C) CGN maintained in K25 for 7 DIV were transferred to a K5 medium or treated with 0.5 μ M Sts in absence or presence of 10 μ M SB203580 after 24 h each treatment. Photomicrographs were taken; nuclear condensation was evaluated by Hoechst dye and observed in fluorescence microscopy. (D) The results are expressed as the percentage of nuclear condensation. Bars are means \pm S.E. of five independent experiments, * $p < 0.05$ versus K25, + $p < 0.05$ versus K5.

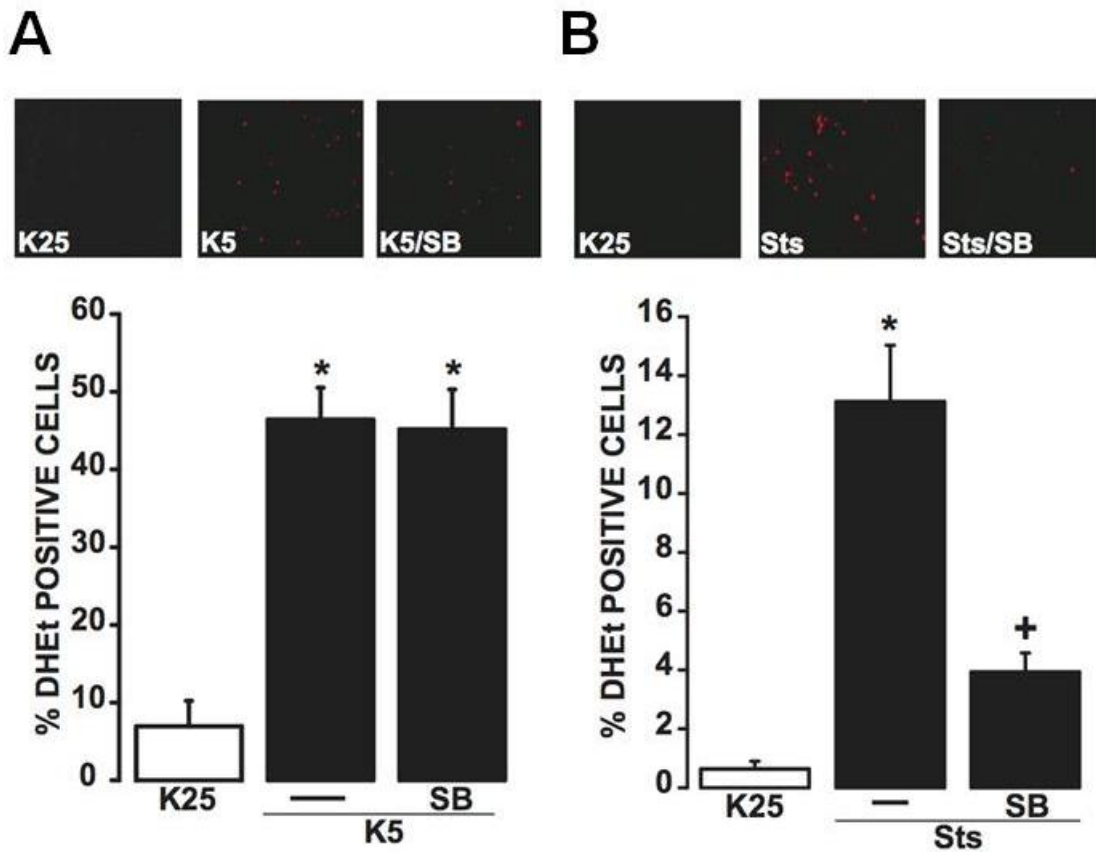


Fig. 4. Effect of SB203580 on ROS generation induced by K5 and staurosporine. ROS generation was evaluated DHEt dye and observed in fluorescence microscopy. Results are expressed as percentage of positive cells to DHEt and are the means \pm S.E. of four independent experiments, * $p < 0.05$ versus K25. (A, B) Photomicrographs of CGN maintained in K25 for 7 DIV were transferred to a K5 medium or treated with 0.5 μ M Sts in absence or presence of 10 μ M SB203580 (SB) after 4.5 h and 5 h respectively. Results are expressed as percentage of positive cells to DHEt. Bars are the means \pm S.E. of ten independent experiments, * $p < 0.05$ versus K25, † $p < 0.05$ versus Sts.

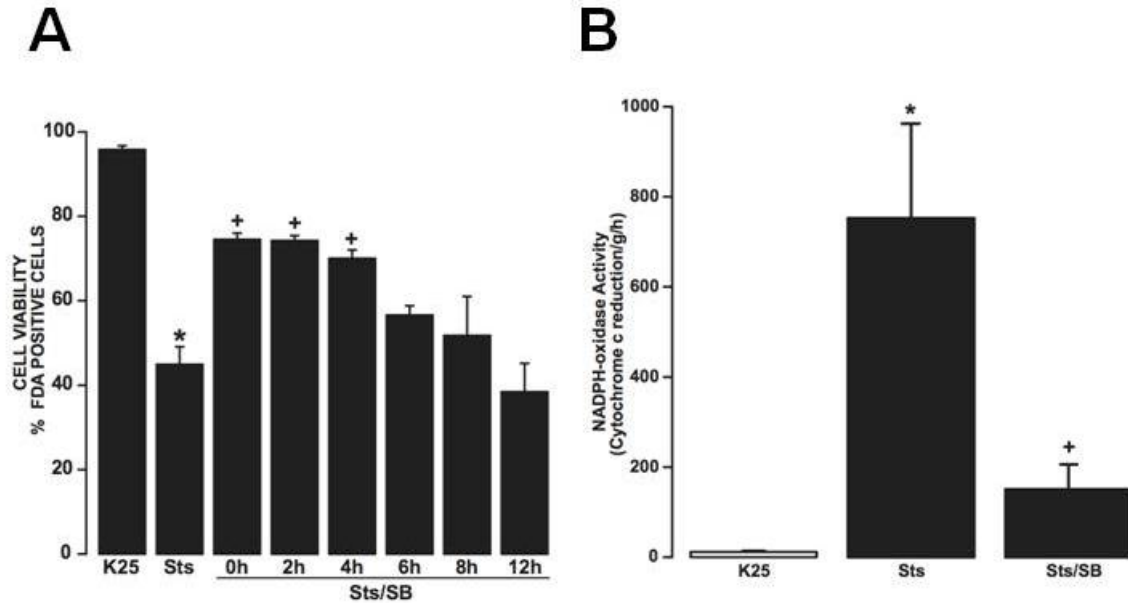


Fig. 5. *p38* regulates NADPH-oxidase activity induced by staurosporine. (A) CGN were treated with 0.5 μ M Sts from 0 h to 12 h in absence or presence of 10 μ M SB203580 (SB). Cell viability was evaluated by FDA/IP assay. Results are expressed as the percentage of FDA positive cells from total cells. Bars are the means S.E. of four independent experiments, * $p < 0.05$ versus K25, + $p < 0.05$ versus K5. (B) CGN maintained in K25 for 7 DIV were treated with 0.5 μ M Sts for 5 h in absence or presence of 10 μ M SB203580 (SB). The activity of NADPH-oxidase was assessed spectrophotometric as cytochrome c oxidation on cell homogenates. Results are expressed as cytochrome c reduction per hour per milligram of protein and are means \pm S.E. of three independent experiments, * $p < 0.05$ versus K25, + $p < 0.05$ versus K5.

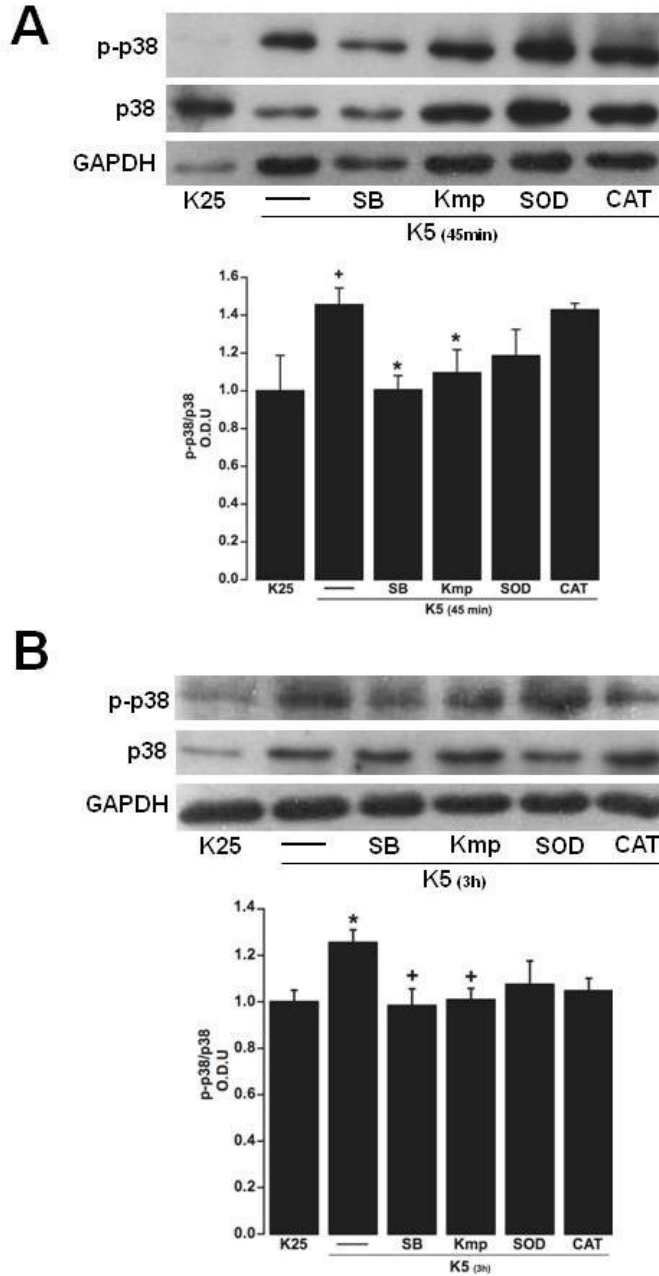


Fig. 6. Effect of antioxidants on p38 activation induced by K5. Cells maintained in K25 for 7 DIV were transferred to K5 medium in absence or presence of 20 μ M kaempferol (Kmp), 125U/ml superoxide dismutase (SOD), 125U/ml catalase (CAT) for 45 min and 4.5 h, proteins levels were determined by Western blot. Bars represent the ratio between the proteins phosphorylated and total protein expressed in optic density units (O.D.U). (A) Effect of antioxidants on p-p38 at 45 min. Bars are means \pm S.E. of three independent experiments, + $p < 0.05$ versus K25, * $p < 0.05$ versus K5. (B) Effect of antioxidants on p-p38 at 4.5 h. Bars are means \pm S.E. of three independent experiments + $p < 0.05$ versus K25, * $p < 0.05$ versus K5.

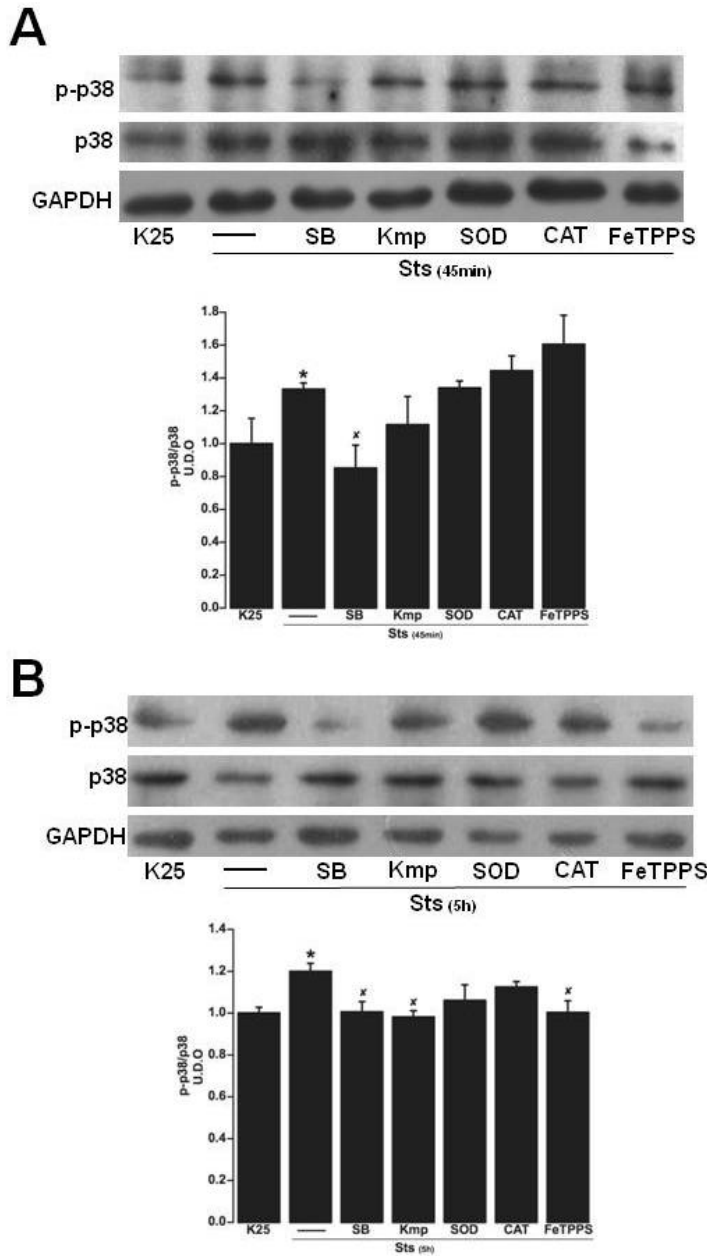
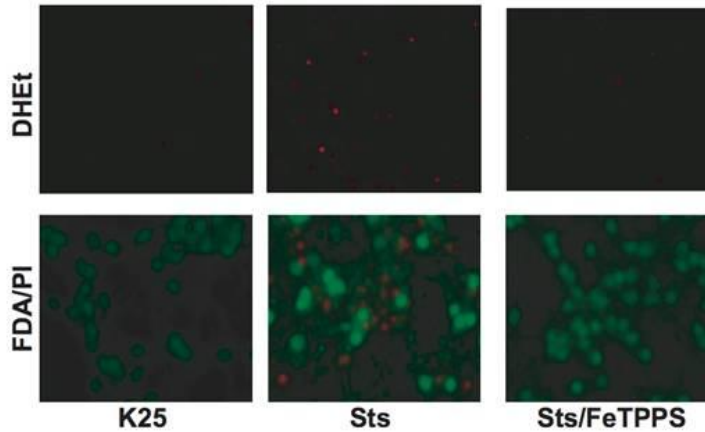


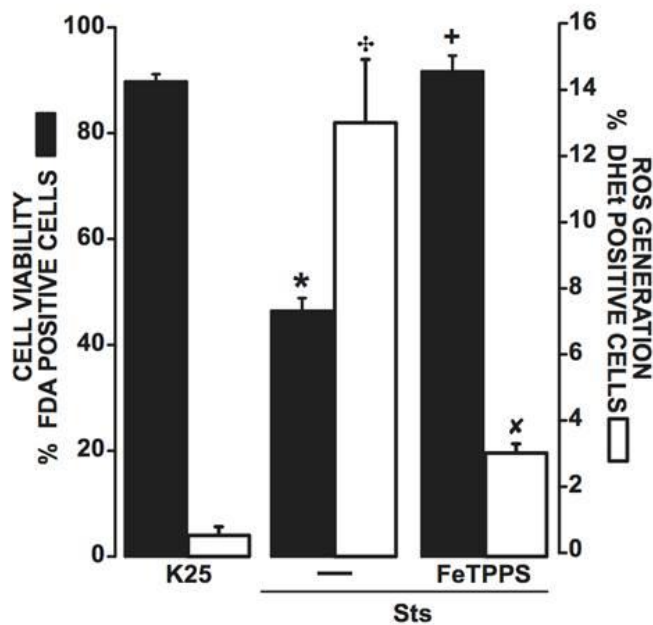
Fig. 7. Effect of antioxidants on p38 activation induced by staurosporine. Cells maintained in K25 for 7 DIV were treated with 0.5 μ M Sts in absence or presence of 20 μ M kaempferol (Kmp), 125 U/ml superoxide dismutase (SOD), 125U/ml catalase (CAT) and 100 μ M FeTPPS for 45 min and 5 h, proteins levels were determined by Western blot. Bars represent the ratio between the proteins phosphorylated and total protein expressed in optic density units (O.D.U). (A) Effect of antioxidants on p-p38 at 45 min. Bars are means \pm S.E. of four independent experiments, + $p < 0.05$ versus K25, * $p < 0.05$ versus K5. (B) Effect of antioxidants on p-p38 at 4.5 h. Bars are means \pm S.E. of four independent experiments * $p < 0.05$ versus K25, γ $p < 0.05$ versus K5.

Supplementary Fig.

A



B



Suppl. Fig. *Effect of FeTPPS on cell death and ROS generation induced by staurosporine.* Cells maintained in K25 for 7 DIV were treated with 0.5 μ M staurosporine (Sts) in the presence or absence of 100 μ M FeTPPS, the cell viability and the ROS generation were tested after 24 h and 5 h respectively. (A) Photomicrographs of cells in phase contrast (PC) dyed with FDA and PI. (B) Quantification of cell viability and ROS generation. Results are expressed as the percentage of FDA positive cells from total cells and percentage of DHEt positive cells. Bars are the means S.E. of six independent experiments, * $p < 0.05$ versus K25, $\Delta p < 0.05$ versus Sts, $\Delta p < 0.05$ versus K25, $\delta p < 0.05$ versus Sts.