



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

PAPEL DEL GLUTATIÓN EN EL
DESARROLLO DEL CEREBELO
DE RATA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

BIOL. ERICK ARIEL MARTÍNEZ CHÁVEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:

DR. JULIO EDUARDO ROQUE MORÁN ANDRADE

COMITÉ TUTOR:

DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE
DRA. DIANA MARÍA ESCALANTE ALCALDE

MÉXICO, D.F.

ABRIL, 2012



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.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 30 de enero de 2012, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del alumno, **MARTÍNEZ CHÁVEZ ERICK ARIEL** con número de cuenta **30179528-5** con la tesis titulada **"PAPEL DEL GLUTATIÓN EN EL DESARROLLO DEL CEREBELO DE RATA"**, realizada bajo la dirección del **DR. JULIO EDUARDO ROQUE MORÁN ANDRADE**.

Presidente:	DRA. MINA KONIGSBERG FAINSTEIN
Vocal:	DR. ABEL SANTAMARÍA DEL ANGEL
Secretario:	DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE
Suplente:	DRA. LIMEI ZHANG
Suplente:	DRA. DIANA MARÍA ESCALANTE ALCALDE

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 21 de marzo de 2012.

M. del Coro Arizmendi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Al CONACyT por haberme brindado una beca durante mis estudios de maestría.

A las instituciones que financiaron este proyecto:

DGAPA-UNAM IN218310 y CONACyT 79788

Al comité tutoral por brindarme su asesoría a lo largo de toda la maestría, por haber generado ideas que aportaran y ayudaran a la conclusión del mismo:

Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte

Instituto de Investigaciones
Biomédicas, UNAM.

Dra. Diana María Escalante Alcalde

Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

AGRADECIMIENTOS

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

Agradezco a la M. en C. María Guadalupe Domínguez Macouzet por su valiosa asistencia y asesoría técnica, así como por la realización de los cultivos primarios que se utilizaron en este proyecto.

En la misma forma, agradezco a la Biol. Teresa Montiel Montes por su valiosa asesoría técnica y teórica, así como por el apoyo en la planificación de experimentos.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Esta tesis no sólo representa un esfuerzo llevado a cabo por mí, sino también por personas e instituciones que ayudaron en forma directa e indirecta en su realización. Por lo tanto, es forzoso para mí agradecerles en la forma más sincera el apoyo que me brindaron.

Inicialmente agradezco a mi madre y a mi abuela por el cariño y apoyo incondicional que me han brindado a lo largo de mi vida, sin el cual no podría estar aquí.

A Leticia Alvarado por el cariño, apoyo, comprensión y motivación que ha alimentado mi ser y me ha hecho crecer.

Al Dr. Julio Eduardo Roque Morán Andrade por haberme apoyado académicamente y por haber puesto su esmero en la revisión y evaluación de esta tesis.

A la M. en C. María Guadalupe Domínguez Macouzet, a la Dra. Lourdes Massieu Trigo y a la Biol. Teresa Montiel Montes por brindarme su apoyo en toda ocasión en que se la solicité.

A los miembros del jurado que revisó y evaluó esta tesis: Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte, Dra. Diana María Escalante Alcalde, Dra. Limei Zhang, Dra. Mina Konigsberg Fainstein, Dr. Abel Santamaría del Ángel.

A mis compañeros del laboratorio por mantener un ambiente de retroalimentación y sanamente competitivo.

A las pobres ratas que sucumbieron para poder realizar este proyecto.

Finalmente agradezco a la UNAM por ofrecerme una educación de calidad sin lucro alguno.

ÍNDICE

Lista de abreviaturas	3
1. Resumen	5
2. Abstract	7
3. Introducción	9
3.1. Desarrollo y muerte neuronal del cerebelo	9
3.2. Papel de las especies reactivas de oxígeno (ERO) en el desarrollo del sistema nervioso	12
3.3. Relación entre ERO y muerte neuronal	15
3.4. Apoptosis	17
3.5. Apoptosis en el sistema nervioso y su relación con las ERO	19
3.6. Funciones del glutatión	21
4. Antecedentes	25
4.1. Glutatión y apoptosis	25
4.1.2. Glutatión y regulación de la apoptosis	26
4.2. Disminución del glutatión en neuronas	28
5. Planteamiento del problema	30
6. Hipótesis	30
7. Objetivo	30
7.1. Objetivos particulares	30
8. Materiales y métodos	31
8.1. Materiales	31
8.2. Cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo	31
8.3. Tratamiento de los cultivos	31
8.4. Viabilidad celular	32
8.5. Evaluación de los niveles de GSH <i>in vitro</i>	33
8.6. Evaluación de los niveles de ERO	33
8.7. Tratamiento de las ratas	34
8.8. Evaluación de los niveles de GSH <i>in vivo</i>	34
8.9. Evaluación de la morfología del cerebelo	34
8.10. Inmunohistoquímica contra caspasa 3 activa	34
8.11. Inmunohistoquímica contra BrdU	35
8.12. Análisis estadístico	35

9. Resultados	36
9.1. Rol del glutatión en las neuronas granulares del cerebelo de rata	36
9.2. Rol del glutatión en el desarrollo del cerebelo de rata <i>in vivo</i>	46
9.2.1. Repercusión de la carencia de glutatión en la morfología del cerebelo	47
9.2.2. Los bajos niveles de GSH inducen alteraciones en la migración y muerte neuronal del cerebelo	51
9.2.3. Repercusión de las alteraciones observadas en el cerebelo por la disminución en los niveles de GSH sobre el equilibrio de las ratas	54
10. Discusión	56
10.1. Efecto de la disminución del GSH en la generación de ERO y su repercusión en la viabilidad celular	56
10.2. La carencia de GSH facilita la acumulación de ERO e induce la muerte neuronal	58
10.3. El rol del GSH en la muerte de las CGNs radica en evitar la acumulación de H ₂ O ₂	60
10.4. La carencia de glutatión favorece la generación de alteraciones durante el desarrollo del cerebelo	65
10.5. El tratamiento con BSO induce la expresión de la caspasa-3 y disminuye la migración de las CGNs	68
11. Conclusión	70
12. Referencias	71

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico
AIF: Factor inductor de apoptosis
ANOVA: Análisis de varianza de diseño aleatorio
ANT: Subunidad de nucleótidos de adenina
BrdU: 5-bromo-2'-deoxiuridina
BSO: Butionina sulfoximina
CARD: dominio de activación y reclutamiento de caspasas
Cit-c: Citocromo c
DED: Dominio efector de muerte
DHE: Dihidroetidio
DISC: Complejo de señalización inductora de muerte
DPN: Día postnatal
DTNB: 5,5'-Ditiobis (2-ácido nitrobenzoico)
DVA: Decremento del volumen apoptótico
ERO: Especies reactivas de oxígeno
FDA: Diacetato de diclorofluoresceína
GR: Glutación reductasa
GCL: γ -glutamilcisteina-ligasa
GCLC: γ -glutamilcisteina-ligasa, subunidad catalítica
GCLM: γ -glutamilcisteina-ligasa, subunidad moduladora
GSH: Glutación reducido/total (dependiendo el caso)
GSHPx: Glutación peroxidasa
GSH-T: Glutación transferasa
GSSG: Glutación oxidado
H₂O₂: Peróxido de hidrógeno IAP: Inhibidor de apoptosis
IP: Ioduro de propidio
K25: Potasio 25 mM
K5: Potasio 5 mM
NAC: N-acetil-cisteína
NGC: Neuronas granulares de cerebelo
NOX: NADPH oxidasa

$\text{NO} \cdot$: Óxido nítrico

$\text{O} \cdot^-$: Anión superóxido

$\text{OH} \cdot$: Radical hidroxilo

ONOO^- : Peroxinitrito

PBS: Buffer salino de fosfatos

PBT: PBS + Tritón X-100

PERK: Cinasa del retículo endoplasmático tipo PKR

PTP: Poro de transición permeable

RE: Retículo endoplasmático

SNC: Sistema nervioso central

SOD: Superóxido dismutasa

ST: Estaurosporina

TNB: 5-tio-2-ácido nitrobenzoico

TNF: Factor necrótico tumoral

Trx: Tioredoxina

1. RESUMEN

El glutatión (GSH) representa el antioxidante más importante en el sistema nervioso central (SNC). Esta condición lo convierte en un potente regulador de las especies reactivas de oxígeno (ERO), las cuales han demostrado tener un papel en procesos de desarrollo como la proliferación, diferenciación y muerte. En particular, se ha demostrado que la muerte programada está íntimamente ligada a los niveles celulares de GSH. Así, se ha visto que las células sometidas a una condición de muerte presentan como evento temprano, un incremento en la generación de ERO y una disminución en los niveles de GSH. Esto sugiere que los niveles de GSH son importantes en la regulación de la muerte celular y probablemente de otros eventos del desarrollo.

Debido a lo anterior, en este trabajo se estudió el papel que tiene el GSH en la regulación de la muerte apoptótica inducida por estímulos de bajo potencial (K5) y estaurosporina (ST) en un modelo *in vitro* de neuronas granulares de cerebelo (NGC). Para ello, se trataron a las NGC con butionina sulfoximina (BSO), un inhibidor de la síntesis de GSH y encontramos que los niveles de GSH disminuyeron en forma significativa a partir de las 24 hrs, pero que esto no provocó un incremento en los niveles de ERO ni de muerte, sino hasta las 36 horas ó más de tratamiento. No obstante, si las células tratadas con BSO se someten a los estímulos proapoptóticos con K5 o ST, los niveles de ERO se incrementan marcadamente a partir de las 4.5 hrs, provocando una disminución clara en la viabilidad celular. En forma consistente, el pre-tratamiento con el antioxidante EUK 134 que dismuta al $O_2^{\cdot-}$ y reduce el H_2O_2 , disminuyó la muerte inducida por ambos estímulos, aunque la reducción de las ERO fue significativa únicamente con la ST. En contraste, el pretratamiento con el Mn(III)TMPyP, un antioxidante con capacidad de dismutar al $O_2^{\cdot-}$ pero no de reducir al H_2O_2 , generó una potenciación de la muerte celular. Finalmente, el pretratamiento con N-acetil-cisteína, un antioxidante y precursor del GSH, redujo las ERO generadas por la ST, pero no por K5, produciendo efectos similares en la viabilidad celular. Estos resultados indican que la ausencia de GSH predispone a la célula a sufrir daño oxidante debido a la acumulación de H_2O_2 y otras ERO; y que esto repercute en forma directa sobre la viabilidad celular.

En base a los resultados anteriores y con la idea de evaluar el papel de GSH durante el desarrollo del SNC *in vivo*, se evaluó a nivel histológico e inmunohistoquímico, si la disminución de los niveles de GSH repercute en el desarrollo del cerebelo. Por un lado, encontramos que el tratamiento crónico con BSO a partir del 2° día posnatal (P2) y hasta el P8, P12, P16 y P22, reduce significativamente los niveles de GSH. Por otro lado, encontramos que los animales tratados con BSO hasta el P16 presentan un incremento en la activación de la caspasa-3 en el borde de la capa granular interna y de células de Purkinje. Adicionalmente, los animales tratados con BSO hasta el P12 presentaron una reducida migración neuronal. Finalmente, encontramos que los animales tratados con BSO muestran un marcado incremento en la frecuencia de errores, en el patrón de foliación y en las alteraciones en las capas del cerebelo.

En este estudio sugerimos que el GSH juega un papel crítico en el desarrollo del cerebelo, probablemente a través del mantenimiento de los niveles óptimos de ERO. Por otro lado, demostramos que las ERO participan en la regulación de la muerte apoptótica y de la migración neuronal en el cerebelo. Adicionalmente, sugerimos que estas alteraciones pueden verse reflejadas en la morfogénesis y funcionamiento del cerebelo.

2. ABSTRACT

Glutathione represents the most important antioxidant in the central nervous system (CNS). This condition makes it a potent regulator of reactive oxygen species (ROS), which have been demonstrated to have a role in developmental processes, including proliferation, differentiation and cell death. In particular, it has been demonstrated that programmed cell death is intimately related to cellular GSH levels. Thus, it has been shown that during the cell death process, the levels of GSH diminish while ROS generation increases. This suggests that GSH levels could be important in the regulation of cell death, and probably, other events of development.

Based on these antecedents, in this work we studied the possible role of GSH in the regulation of apoptotic death induced by low potassium (K5) and staurosporine (ST) in an *in vitro* model of granule cell neurons (CGN). For this purpose, we treated CGN with buthionine sulfoximine (BSO), an inhibitor of the synthesis of GSH and we found that the levels of GSH decrease in a significant way at 24 hrs, but that this condition didn't increase neither ROS levels nor death before 36 h of treatment. Nonetheless, when CGN treated with BSO are exposed to K5 or ST, ROS levels are markedly increased at 4.5 h, inducing a clear decrease in cell viability. Consistently, pretreatment with the antioxidant EUK 134, which dismutates $O^{\cdot-}_2$ and reduces H_2O_2 , diminished the death induced by both apoptotic conditions, however the observed ROS were statistically significant only for ST. In contrast, pretreatment with Mn(III)TMPyP, an antioxidant that also dismutates $O^{\cdot-}_2$ but does not reduce H_2O_2 , potentiated cell death. Finally, N-acetyl-cysteine pretreatment, an antioxidant and GSH precursor, reduced the ROS generated by ST, but not by K5 and induced similar effects in cell viability. These results indicate that GSH depletion predisposes the cell to oxidative injury because of the accumulation of H_2O_2 and other ROS; and that this affects directly the cell viability.

Based on the above results and to evaluate the role of GSH during *in vivo* CNS development, we evaluated whether GSH depletion has a repercussion on the development of the cerebellum. For this, we evaluated at the histological and immunohistochemical level the migration, apoptosis and morphologic parameters in the cerebellum. On one hand, we found that the chronic treatment with BSO starting on the 2th postnatal day (P2) and until P8, P12, P16 and P22, significantly reduced GSH levels.

We also found that BSO treated animals until P16 showed an increase in caspase-3 activity in the border of the internal granule cell layer and the Purkinje cell layer. Additionally, the animals treated with BSO until P12 presented a reduced neural migration. Finally, we found that BSO treated animals showed a marked increase in the frequency of errors, in the foliation pattern and in the alterations in the layers of the cerebellum.

These results suggest that GSH seems to play a critical role in the development of the cerebellum, probably through the maintenance of optimal ROS levels. On the other hand, we demonstrate that ROS participate in the regulation of programmed cell death and in the neural migration in the cerebellum. Furthermore, we suggest that these alterations can be reflected in the morphogenesis and function of the cerebellum.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Desarrollo y muerte neuronal del cerebelo

El cerebelo es una región del cerebro presente en todos los vertebrados que recibe información sensorial de la piel, comisuras, músculos, sistema vestibular y visual, no obstante su función más notable es la regulación motora. *Grosso modo*, el cerebelo contribuye a este último punto a mantener el balance y equilibrio, a monitorear y corregir los movimientos presentes y futuros, a coordinar el tiempo y ejecución de los movimientos voluntarios complejos y a mediar la adquisición de nuevas habilidades motrices (Goodlett, 2008).

El cerebelo está compuesto por la corteza cerebelar, la materia blanca interna y tres pares de núcleos profundos. A su vez, la corteza cerebelar del adulto está constituida por cinco tipos neuronales organizados en tres capas; éstas son la capa molecular, la capa de células de Purkinje y la capa de células granulares o capa granular interna (Figura 1). En tanto, los tipos neuronales presentes en la corteza cerebelar incluyen: las células de canasta, las células esteladas, las células de Purkinje, las células de Golgi y las células granulares (NGC).

Dentro de estas neuronas, las NGC juegan un papel de suma importancia por ser las neuronas más numerosas del cerebelo. Los somas de estas neuronas se localizan en la capa más interna o capa granular de la rata adulta. Utilizan ácido glutámico como neurotransmisor y reciben contactos de las fibras musgosas, formando a sí, sinapsis complejas llamadas glomérulos. Sus axones ascienden hacia la capa molecular de la corteza cerebral formando las denominadas fibras paralelas que hacen contacto con las dendritas de las células de Purkinje y de las interneuronas (Voogd y Glickstein 1998; Goldowitz y Hamre 1998).

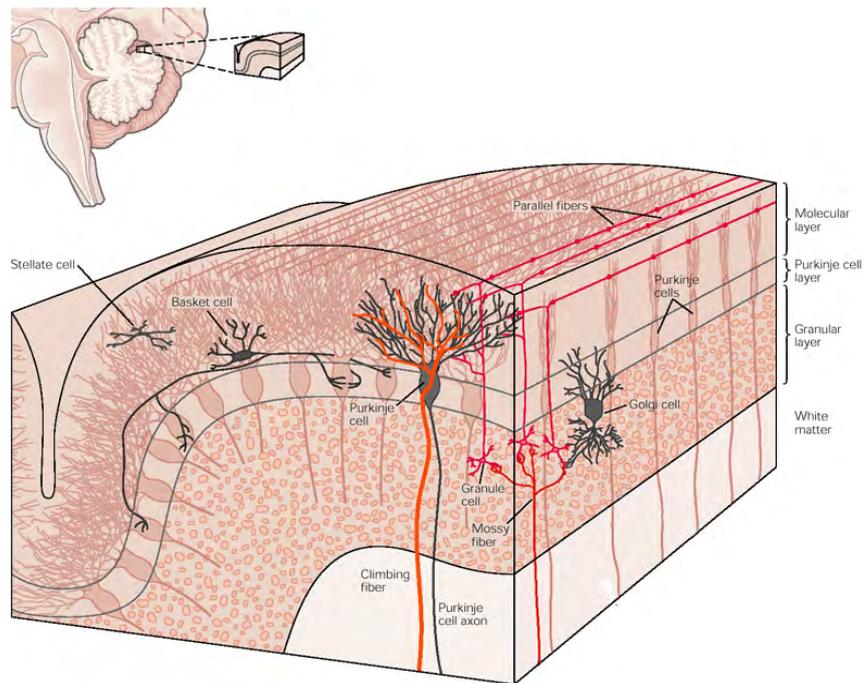


Figura 1. La corteza cerebelar está organizada en tres capas que contienen cinco tipos neuronales. La figura ilustra la organización general de la corteza cerebelar representada en plano transversal y longitudinal (tomado de Kandel et al, 2000).

Las células de Purkinje son neuronas grandes de fenotipo GABAérgico que funcionan como la única vía de salida de la corteza cerebelar. Estas neuronas presentan más de un axón mielinizado y terminan en neuronas del núcleo cerebelar y en algunos núcleos de tallo cerebral. Los árboles dendríticos de estas neuronas son aplanados y están orientados en forma perpendicular respecto a las fibras paralelas, las cuales, junto con las fibras trepadoras terminan innervándolas. En relación a su localización, sus somas se distribuyen en una sola hilera entre la capa granular y molecular (Voogd y Glickstein 1998; Goldowitz y Hamre 1998).

En esta misma capa también se localizan los somas de la glia de Bergmann, las cuales dirigen la migración de las neuronas de Purkinje y de las NGC desde su origen en la matriz ventricular y capa granular externa respectivamente, hasta su posición definitiva en la corteza cerebelar (Voogd y Glickstein 1998; Goldowitz y Hamre 1998).

Por su parte, las células de canasta y es teladas son neuronas inhibitorias localizadas en la capa molecular que hacen contacto con las células de Purkinje, regulando su actividad. Las células de Golgi también son neuronas inhibitorias pero

estas se localizan en la capa granular interna y hacen contacto tanto con las CGNs como con las células de Purkinje (Voogd y Glickstein 1998, Goodlett 2008).

Dados los pocos tipos neuronales de la corteza cerebelar, su arreglo en capas conspicuas y su accesibilidad, el cerebelo resulta un modelo útil para estudiar el desarrollo en el sistema nervioso central. El desarrollo del cerebelo de la rata es posnatal y se completa durante las 3 primeras semanas de vida, coincidiendo con el desarrollo de las NGC (Altman, 1972). El proceso de desarrollo de estas neuronas incluye su proliferación en la capa granular externa, una capa de células precursoras cerebelares con alta capacidad proliferativa localizada en la superficie externa del cerebelo.

Parte del desarrollo incluye la migración de las NGC hacia el interior, así como su diferenciación fenotípica y el establecimiento de conexiones sinápticas. Desde el primer día posnatal (DPN) algunas de estas células se sitúan en la zona basal constituyendo la zona premigratoria que crece en grosor entre los 7 y 10 DPN. Para el día 11, las zonas proliferativa y premigratoria presentan una disminución importante en su grosor, que se debe, en parte, a la eliminación y/o migración masiva de NGCs hacia la capa granular interna (Altman, 1972). Este proceso de migración se da a través de los procesos de las células gliales de Bergmann y se propone que el mecanismo ocurre mediante el reconocimiento de moléculas de adhesión de ambos tipos celulares y/o por componentes de la matriz extracelular. Alrededor de la segunda semana, se completa la migración y se establecen contactos sinápticos entre sus dendritas y los axones de las fibras musgosas. Dichas sinapsis han sido identificadas desde el 5 DPN, siendo funcionales la mayoría de estos desde los 10-12 DPN (Arsenio-Núñez y Sotelo, 1985; Burgoyne y Cambray-Deakin, 1988).

En relación al proceso de eliminación de las neuronas, se sabe que alrededor del 50% de las NGC muere por apoptosis, ayudando al establecimiento de innervaciones apropiadas con otras poblaciones neuronales. Se ha demostrado que uno de los momentos de mayor muerte de NGC ocurre durante la segunda semana posnatal (Tanaka *et al*, 2000). Un estímulo crítico para la diferenciación y supervivencia de las NGC parece estar mediado por el glutamato utilizado como neurotransmisor por las fibras musgosas que las innervan. Estudios *in vivo* han demostrado que al bloquear al glutamato entre los 10 y 19 DPN se altera la supervivencia (Alavez *et al*, 2006) y

diferenciación de las NGC (Morán *et al*, 1999). Adicionalmente, la inhibición de los receptores glutamatérgicos en rebanadas de cerebelo inmaduro genera una reducción en la migración de las NGC (Komuro y Rakic, 1993).

3.2. Papel de las especies reactivas de oxígeno (ERO) en el desarrollo del sistema nervioso

Las ERO son especies más reactivas que el oxígeno en su estado basal de energía. Algunas ERO están vinculadas a diversos procesos fisiológicos y son sintetizadas como productos secundario del metabolismo celular o por enzimas específicas como la familia de la NADPH oxidasa, la xantina oxidasa y el citocromo P450 (Sauer *et al*, 2001). Las ERO también incluyen moléculas como los radicales libres superóxido ($O_2^{\cdot-}$), óxido nítrico ($NO\cdot$) e hidroxilo ($OH\cdot$); y especies moleculares, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el peroxinitrito ($ONOO^-$) (Dringen, 2000) (Tabla 1). Cada una de las ERO tiene una vida media generalmente corta, indicando que su sitio de interacción con los elementos celulares es cercano al sitio en que fueron generados. La excepción a esto, son las especies como el peróxido de hidrógeno y los hidroperóxidos, cuya estabilidad les permite desplazarse e interactuar con elementos más allá de su sitio de síntesis (Bienert *et al*, 2007).

Tabla 1. Especies reactivas de oxígeno		
Especie reactiva	Símbolo	Vida media
Superóxido	$O_2^{\cdot-}$	10^{-6} s
Radical hidroxilo	$\cdot OH$	10^{-9} s
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2	estable
Radical peroxilo	$ROO\cdot$	segundos
Hidroperóxido orgánico	$ROOH$	estable
Oxígeno en singulete	1O_2	10^{-6} s
Ozono	O_3	segundos

Tabla 1. Las especies reactivas de oxígeno se caracterizan por tener una vida media relativamente corta que restringe su lugar de interacción. Algunas de ellas tienen vidas medias más largas, permitiéndoles interactuar con elementos lejanos a su sitio de síntesis.

Dado que el consumo de oxígeno refleja la actividad celular y que este siempre genera como productos secundario de l metabolismo mitocondrial ERO; procesos energéticamente costosos como la proliferación, diferenciación, migración, crecimiento

y muerte, presentan elevaciones en la tasa de síntesis de ERO. Lo anterior indica que los niveles de ERO se regulan en una forma específica y que pueden jugar un papel particular en cada proceso de desarrollo. Así, se ha visto que las concentraciones elevadas de ERO resultan citotóxicas, mientras que las concentraciones bajas pueden servir como una señal que promueve eventos relacionados con desarrollo y diferenciación (Valencia y Morán, 2001; Ramiro-Cortés et al., 2009; Tzatzali et al., 2006; Covarrubias et al., 2008, Hernández-García et al., 2010.). Consistentemente, los antioxidantes y otros agentes que afectan la producción o metabolismo de las ERO afectan los mismos procesos en varios sistemas (Mattson, 1998).

Ejemplificando lo anterior, se ha visto que la concentración de H_2O_2 determina la proliferación y detención del ciclo celular (Covarrubias et al., 2008). De esta forma, bajos niveles de H_2O_2 ó de $O_2^{\cdot -}$ estimulan la proliferación de células de distinto fenotipo celular, como músculo liso y fibroblasto; y en forma consistente, la sobre expresión de antioxidantes como la catalasa y/o SOD2 inhibe la proliferación de células del músculo liso en respuesta a EGF (Hernández-García et al., 2010). Por su parte, concentraciones más elevadas de H_2O_2 inducen la detención y/o senescencia celular en fibroblastos de mamífero, así como la inactivación de la expresión de genes constitutivos y la activación de genes relacionados con el estrés (Davies, 1999). Finalmente, si el estrés oxidante es muy elevado, las células mueren en distintas formas. La decisión del tipo de muerte es igualmente dependiente de la concentración de ERO en este rango. En general, las concentraciones más bajas inducen apoptosis, a niveles intermedios se induce autofagia y las concentraciones más elevadas inducen necrosis (Covarrubias et al., 2008). En estos procesos de muerte, las ERO funcionan como señal inicial, más que como un ejecutor de muerte (Schulz *et al*, 1996; Valencia y Moran, 2001; Ramiro-Cortés *et al.*, 2009), indicando la importancia en su regulación.

En relación a procesos de diferenciación, se sabe que las neuronas, pero no los astrocitos, requieren un nivel elevado de ERO durante el proceso de diferenciación a partir de los progenitores neuronales (Tzatzali et al., 2006). En esta forma, sí durante este proceso se modifica la concentración de ERO por medio de tratamiento con antioxidantes, la diferenciación, pero no el número de neuronas se ve afectada,

obteniendo así, una proporción fenotípica distinta a la generada normalmente (Tsatmali et al., 2006).

Los ejemplos anteriores sugieren que las ERO son elementos capaces de encender distintas maquinarias para llevar a cabo procesos específicos en el desarrollo, más que la consecuencia de dicho efecto. Por lo tanto, recientemente se ha comenzado a estudiar cómo es que las ERO regulan estos procesos. Lo anterior puede ser explicado por la activación o inactivación de distintos genes y/o proteínas; estas últimas en forma postraduccional.

Un ejemplo de la modulación de la actividad de los genes por ERO es NFκB. Se ha demostrado que el incremento de ERO como el H₂O₂ puede inducir la expresión de este gen (Schreck et al, 1991) y que este proceso puede ser regulado por el sistema Trx/Ref1 (Covarrubias et al., 2008). Las tioredoxinas (Trx) son proteínas que contienen un sitio activo que posee un grupo disulfuro con capacidad de reducir los grupos tiol de algunas proteínas y mantener así, un estado redox reducido. De esta forma, Trx puede mantener el estado reducido de Ref1, una proteína nuclear con actividad de endonucleasa y oxido-reductasa que reduce a las Cys de los dominios de unión al ADN de algunos factores de transcripción, provocando así un incremento en su actividad (Covarrubias et al., 2008).

A nivel proteico, distintos aminoácidos como Tyr, Trp, His y principalmente Cys pueden ser oxidados, provocando cambios que culminan en la modificación conformacional de las proteínas y por lo tanto, de su actividad (Dröge 2002). En forma interesante, diversas proteínas relevantes para el desarrollo son sensibles a cambios mediados por estrés oxidante. Ejemplo de ello son las cinasas de tirosinas y las cinasas de fosfatasas, reportadas como enzimas importantes en el control de la proliferación y diferenciación por varios factores de crecimiento (Covarrubias et al., 2008). Un segundo ejemplo es la oxidación de la nucleoredoxina por el H₂O₂ (Funato et al, 2006). En su forma reducida, esta proteína es capaz de interactuar con Dishevelled y suprimir la señalización de Wnt. Al ser oxidada, la nucleoredoxina libera a Dishevelled y promueve la acumulación de la β-catenina en ausencia de ligando Wnt (Covarrubias et al., 2008).

En forma adicional, la estimulación de varios receptores por factores de crecimiento y citocinas promueven o suprimen la producción de ERO como un evento de señalización cuantificado. Un ejemplo de lo anterior es el bFGF, que promueve el crecimiento dendrítico y axonal en cultivos de neuronas hipocámpales (Mattson et al, 1989) mediante la regulación de los niveles de ERO (Mattson et al, 1995). Esto indica, que las ERO son capaces de modificar a las proteínas, pero también que estas últimas pueden participar en forma directa en la síntesis de ERO (Covarrubias et al., 2008).

Por otro lado, se sabe que los niveles de ERO son modulados en diferentes estadios de vida de la rata, indicando distintas funciones en distintos estadios de desarrollo. Se ha demostrado que éstas incrementan durante el primer mes postnatal en comparación con los niveles detectados en etapas embrionarias (Scarpa *et al*, 1987; Coyoy et al., en reparación) y que la respuesta de las neuronas frente a las ERO también cambia durante el desarrollo (Kushima et al, 1990). Por ejemplo, el oxígeno en concentraciones elevadas induce la muerte neuronal en embriones, pero no en neuronas de animales en estadios postnatales (Ishikawa et al, 1999).

3.3. Relación entre ERO y muerte neuronal

A lo largo de la vida de un individuo se presentan distintos tipos de muerte celular. Estos eventos son regulados y necesarios para mantener la homeostasis celular, para formar y eliminar células dañadas, o pueden ser resultado de un evento masivo o crónico, consecuencia de lesiones como traumas e infarto cerebral, así como de patologías como las enfermedades neurodegenerativas.

Un ejemplo de muerte regulada ocurre durante el desarrollo del sistema nervioso, donde más del 50% de las neuronas mueren (Burek y Oppenheim 1996). En este caso específico, el que una neurona muera o no, dependerá principalmente de si logra hacer una conexión exitosa con su célula blanco, ya que ésta le aporta factores tróficos que promueven su supervivencia (Sastry y Rao 2000).

Los efectos deletéreos provocados por las ERO representan el papel más común que se les ha atribuido desde hace algunas décadas. La capacidad de generar daño radica en el estado parcialmente reducido de dichas moléculas que permite su interacción con

diversos elementos de la célula y que genera alteraciones como la peroxidación de ácidos grasos insaturados, que puede producir la oxidación en cadena de otros lípidos cercanos a ellos; la oxidación de proteínas, que puede alterar los sitios activos y estructura de las proteínas y la oxidación del ADN, que puede generar mutaciones con impacto a distintos niveles. Estos procesos pueden activar distintas rutas que funcionan como señales en diferentes condiciones y que culminan con un proceso fisiológico como la muerte celular (Ramiro-Cortés et al., 2009).

Las células del cerebro, principalmente las neuronas, son particularmente susceptibles al daño oxidante generado por las ERO debido, entre otras cosas, a que el cerebro genera niveles elevados de ERO dado que su tasa metabólica es la más elevada de todos los órganos, consumiendo el 20% del oxígeno total. Además, el cerebro está enriquecido con ácidos grasos insaturados que son fácilmente peroxidables y algunas de sus áreas contienen altos niveles de hierro que cataliza la formación de ERO (Dringen 2000). Otro punto importante es la oxidación de varios neurotransmisores. Por ejemplo, la dopamina y noradrenalina pueden reaccionar con el oxígeno para generar $O_2^{\cdot-}$. Adicionalmente, la oxidación de dopamina puede generar H_2O_2 en una reacción catalizada por las monoaminooxidasas localizadas en la membrana mitocondrial (Limón-Pacheco y Gonsebatt, 2007). Finalmente, las defensas antioxidantes del cerebro no son particularmente elevadas en comparación con otros órganos (Floyd, 1999). Dado lo anterior, no es difícil comprender el por qué una elevada producción de ERO se correlaciona con una amplia gama de enfermedades neurodegenerativas (Floyd, 1999, Wang y Michaelis, 2010).

En los casos patológicos y de envejecimiento, la sobreproducción de ERO induce la modificación de las macromoléculas antes mencionadas provocando daño. No obstante, las distintas poblaciones neuronales responden al estrés oxidante en forma distinta, siendo algunas de ellas más sensibles que otras. Se ha visto que neuronas vulnerables a este tipo de estímulo incluyen a las del CA1 del hipocampo y a las CGN (Wang et al., 2005, 2007, 2009). En el caso de estas últimas neuronas, es posible que su elevada vulnerabilidad juegue un papel en la degeneración observada en cerebelos de individuos adultos (Renovell et al, 1996; Andersen et al., 2003).

3.4. Apoptosis

El proceso de muerte que ocurre durante el desarrollo embrionario y/o la maduración posnatal del sistema nervioso antes mencionado es principalmente apoptótico. Este tipo de muerte es un evento evolutivamente conservado y altamente organizado. Las etapas tempranas de la apoptosis se caracterizan por una activación de caspasas iniciadoras, encogimiento celular, pérdida de la asimetría en los lípidos de la membrana plasmática, y condensación de cromatina. Las fases tardías, por su parte, se caracterizan por la activación de las caspasas ejecutoras, así como de endonucleasas, la liberación de citocromo c, la formación de cuerpos apoptóticos y la fragmentación celular.

El encogimiento celular o decrecimiento del volumen apoptótico (DVA), es un evento crítico que ocurre en las etapas tempranas de la apoptosis, así como en las fases tardías y en el que se presenta una alteración iónica y de la homeostasis del agua, así como una reorganización del citoesqueleto (Benson et al, 1996; Hernández-Enríquez et al 2010; Maeno et al, 2000). El DVA está asociado a movimientos de iones como el Cl^- y K^+ . En el caso del K^+ , ocurre una salida a favor de su gradiente, debido a la apertura de canales permeables que a su vez provoca la salida de Cl^- . Todo esto genera un desbalance osmótico que es compensado por la célula con la salida de agua, provocando la reducción del volumen celular.

Las caspasas por su parte, son proteasas de cisteína que tienen como sustrato residuos de aspartato y que son expresadas en cadenas polipeptídicas sencillas compuestas por tres dominios: N-terminal, una subunidad larga y una subunidad pequeña. Las caspasas iniciadoras poseen un pro-dominio N-terminal largo que alberga al dominio efector de muerte (DED) (como las caspasas 8 y 10) o un dominio de activación y reclutamiento de caspasas (CARD) (como las caspasas 2 y 9) (Elmore 2007). La regulación negativa de las caspasas está mediada por inhibidores de apoptosis (IAP) como XIAP, c-IAP1, c-IAP2 y la survivina. Estos, a su vez son inhibidos por proteínas como Smac/Diablo y Omi/HtrA2 (Elmore 2007).

En cuanto a la activación de las caspasas, ésta ocurre cuando se unen (vía sus dominios N-terminales) a complejos multiprotéicos, como el complejo de

señalización inductora de muerte (DISC) y el complejo del apoptosoma (Elmore 2007, Franco y Cidlowsky, 2009). Posterior al proceso de activación, se desencadena una cascada de cortes proteolíticos de caspasas a procaspasas que resulta en la activación de caspasas efectoras (como la 7 y la 3) y culmina con la muerte celular (Elmore, 2007).

El complejo DISC está formado por el dominio de muerte asociado a Fas (FADD), la caspasa 8 (en algunos casos también la 10) y la proteína inhibitoria de FLICE (FLIP). Por su parte, el apoptosoma está conformado por la procaspasa 9, el citocromo c (cit-c) y Apaf-1 que es sensible a los niveles de ATP (Circu y Aw, 2008, Elmore, 2007). Así, en condiciones fisiológicas normales, el ATP se une al cit-c e impide la formación de dicho complejo; si sus niveles bajan (como en condiciones de muerte) el complejo se forma.

Las cascadas de señalización antes mencionadas han sido divididas en dos vías: la ruta extrínseca, mediada por los receptores a muerte y la vía intrínseca, llevada a cabo en la mitocondria y/o en el retículo endoplasmático (Figura 2). La ruta extrínseca es disparada por señales como hormonas o componentes de la familia de factores necróticos tumorales (TNF), como $TNF\alpha$, ligando Fas/CD95 o TRAIL, que se unen a receptores de muerte en la membrana plasmática (Elmore, 2007). Dicha activación provoca su interacción con proteínas proapoptóticas, resultando en la producción de DISC. Este complejo dispara una cascada de señalización que fluye cuesta abajo hasta activar caspasas ejecutoras como la 7 ó 3, resultando en la muerte de la célula (Elmore, 2007).

Por su parte, la ruta intrínseca mitocondrial se ejecuta por la liberación de proteínas pro-apoptóticas como el cit-c, el factor inductor de apoptosis (AIF) ó el antagonista anti-apoptótico Smac/Diablo del interior de la mitocondria hacia el citosol. Estas proteínas disparan eventos de señalización de pendiente e independiente de caspasas que culminan en la muerte celular (Figura 2). Se ha propuesto que el proceso de liberación se da por medio de la ruptura de la membrana mitocondrial provocada por un incremento osmótico del medio mitocondrial, debido a la formación de un mega poro nombrado poro de transición permeable (PTP) que deja pasar los solutos (Elmore, 2007). Estos eventos de permeabilidad mitocondrial son modulados por los elementos de la familia de proteínas de notada como Bcl-2, los cuales pueden ser tanto pro-

apoptóticos (Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik, Bcl, etc.) como anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-2, BAG, etc) (Elomre, 2007).

Finalmente, la vía intrínseca del retículo endoplasmático se origina por la acumulación persistente de proteínas plegadas en forma incorrecta y/o desplegadas, perturbaciones en la homeostasis de calcio, así como después de una situación de estrés. Estos eventos inducen la activación de tres receptores transmembranales localizados en el retículo endoplasmático: La cinasa del retículo endoplasmático tipo PKR (PERK), el factor transcripcional activador 6 y la enzima 1 con requerimiento de inositol (IRE1). En roedores, la activación de estos receptores ha sido relacionada con el corte proteolítico de la pro-caspasa-12, localizada en el lumen citoplasmático del retículo endoplasmático y sucesivamente de la caspasa-3, 6 ó 7, a través de la activación de la caspasa 9 (Mosishima et al 2002; Chowdhury et al 2008).

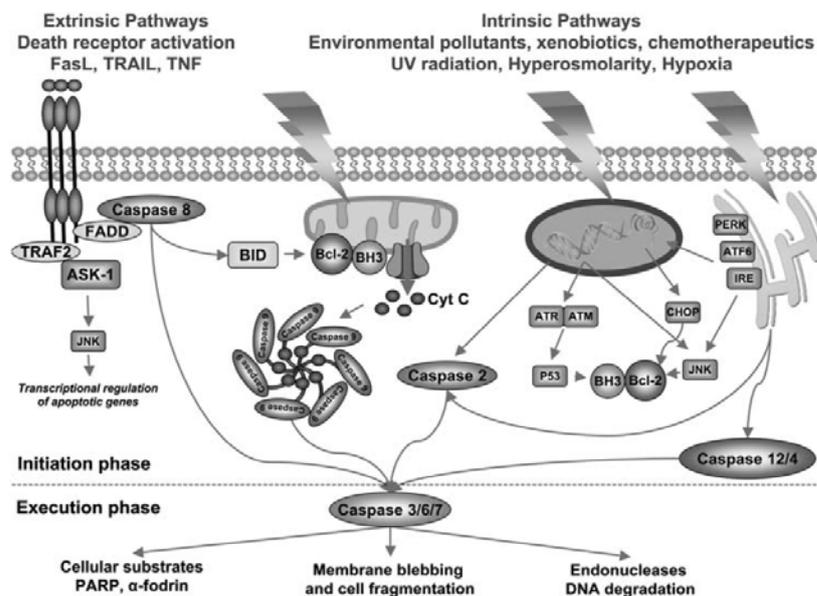


Figura 2. Ruta intrínseca y extrínseca de muerte apoptótica. Para mayor detalles referirse al texto.

3.5. Apoptosis en el sistema nervioso y su relación con las ERO

Como se mencionó anteriormente, la apoptosis es el proceso que elimina más del 50% de las neuronas en el desarrollo embrionario y/o en la maduración postnatal del sistema nervioso. Lo anterior asegura su correcta conexión con otras neuronas, así como la eliminación de neuronas que no recibieron innervación alguna y también elimina neuronas que migraron a una posición incorrecta.

Adicional a los procesos normales de desarrollo, la apoptosis también juega un papel en eventos patológicos como es el caso de algunas enfermedades neurodegenerativas. Se ha demostrado que al modular distintos elementos apoptóticos pertenecientes tanto a la ruta intrínseca como extrínseca es posible regular la muerte celular. Ejemplo de ello es que el uso de inhibidores de caspasas previene la neurodegeneración en algunos modelos animales (Ona et al, 1999). Otro ejemplo es que el uso de la minociclina (un inhibidor de la liberación mitocondrial del citocromo c) tiene un efecto neuroprotector en modelos animales de enfermedades neurodegenerativas como las enfermedades de Huntington y de Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica (Friedlander 2003).

Sin importar si la apoptosis ocurre por un proceso neurodegenerativo o de desarrollo, éste siempre va acompañado de una generación importante de ERO. Debido a ello, se ha estudiado en forma detallada el papel de las ERO en la señalización de la apoptosis. Algunas evidencias que apoyan el papel de las ERO en la apoptosis son:

1. Existe un incremento importante en la concentración de $O_2^{\cdot-}$ en la muerte apoptótica inducida por la privación de factores tróficos en distintos tipos neuronales (Satoh et al, 1998; Guo et al 1999). Dicho aumento en la concentración de $O_2^{\cdot-}$ es inducido por elementos de la NADPH oxidasa (Tammariello et al 2000).
2. El oxígeno en singulete induce la muerte neuronal por medio de la activación de caspasa 3 (Valencia y Morán, 2004) y también en la apoptosis de células no neuronales, mediada por Bid y algunos miembros de la familia de MAPK (Zhuang et al 1998) y PKC (Zhang et al 2001).
3. Las ERO, en particular el peróxido de hidrógeno (Shimizu y Numata 2004; Varela y Simon, 2004), pueden modular la actividad de los canales iónicos regulados por volumen, los cuales son activados durante la apoptosis (Okada y Maeno, 2001, Hernández-Enríquez et al, 2010, 2011).

Dentro de los procesos de señalización de muerte apoptótica, la ruta de JNK representa una de las cascadas más conocidas regulada por ERO (Kamata et al, 2005a; Ramiro-Cortes et al, 2009). Esta ruta es activada bajo condiciones oxidantes que permiten la disociación de ASK1 de la tioredoxina, promoviendo así, la defosforilación de la Ser-967 de ASK1, induciendo la muerte apoptótica dependiente de JNK y p38 (Goldman et al 2004). Adicionalmente, bajo estas condiciones, la fosfatasa de MAP cinasas (Mkp) se encuentra oxidada, impidiendo la inactivación de JNK (Kamata et al, 2005a). Estos hechos se ven apoyados por el aumento en la fosforilación de JNK1/2 y de c-Jun (uno de los principales sustratos de JNK) por K5, y por la disminución de la misma al momento de adicionar antioxidantes (Ramiro-Cortés et al, 2009).

Es importante mencionar que la ruta de JNK no señala en todos los casos de muerte apoptótica. El tratamiento de NGC en cultivo con estaurosporina (ST) también induce una elevada producción de ERO que precede a la muerte, pero no activa a JNK (Ramiro-Cortes et al, 2009). En este caso, la vía señala únicamente por p38 en una forma dependiente de ERO (Ramiro-Cortés et al, 2011). Lo anterior indica que, sin importar la vía de señalización, las ERO es tan relacionadas en forma directa con la muerte apoptótica y que su generación es regulada por los estímulos pro-apoptóticos. Así mismo, indica la importancia de una regulación fina en la concentración de ERO en procesos de desarrollo y muerte neuronal.

3.6. Funciones del glutatión

Los niveles intracelulares de ERO es tan determinados por el balance entre su producción y su tasa de degradación o inactivación. Los sistemas antioxidantes incluyen enzimas como la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa, y moléculas como el α -tocoferol, el β -caroteno, el ascorbato y el glutatión (GSH). Este último, es un péptido compuesto por tres aminoácidos (γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina) y es considerado el sistema antioxidante más abundante en el sistema nervioso central.

La propiedad antioxidante del glutatión (GSH) radica en la capacidad de donar electrones y protones por parte de su cisteína, lo cual provoca la oxidación de GSH a GSSG y la neutralización de especies reactivas, ya sea de oxígeno o de nitrógeno. Este

proceso lo realiza por sí mismo o en conjunto con la enzima glutatión peroxidasa (GSHPx) (Figura 3). Existen al menos 4 homólogos de esta enzima localizados en el citoplasma y en la mitocondria y su función específica consiste en reducir al H_2O_2 e hidroperóxidos (Dringen 2000).

La función de antioxidante es el papel más conocido del GSH; sin embargo, también se le atribuyen otras funciones (Limón-Pacheco y Gonsebatt, 2007). Puede funcionar como reductor de otros antioxidantes como el α -tocoferol, ascorbato y ubiquinonas. Es considerado el mayor reservorio de grupos tiol intracelulares y por lo tanto de cisteína. Participa en la reducción de ribonucleótidos por medio del sistema glutaredoxina (Limón-Pacheco y Gonsebatt, 2007). Puede formar conjugados excretables de glutatión con proteínas (GS-proteína), ya sea en forma espontánea o enzimática por medio de las glutatión S-transferasas. El GSH se ha relacionado con procesos de señalización celular por medio de su interacción con cisteínas localizadas en el sitio activo o regiones reguladoras de proteínas tipo cinasas y factores de transcripción. Finalmente, también se ha sugerido como neurotransmisor con su propio receptor e incluso como regulador de canales ionotrópicos glutamatérgicos (Janáky et al, 2001; Oja et al, 2000).

El GSH conforma más del 90% del total de los tioles no proteicos en la mayoría de las células y su concentración varía de 0.5 a 10 mM dependiendo el tipo celular. En el hígado por ejemplo, se detectan concentraciones de 4 a 8 mM, siendo sólo el 5% GSSG. En relación a su distribución, alrededor del 85 al 90% del glutatión se encuentra libremente distribuido en el citosol. El resto está localizado en organelos como la mitocondria, peroxisomas, núcleo y retículo endoplasmático (RE) (Circu y Yee Aw, 2008) (Figura 3). En mamíferos existen tres mecanismos que mantienen la homeostasis del GSH: la síntesis *de novo*, la entrada de GSH proveniente de fuentes exógenas a través de la membrana celular y el reciclamiento del GSSG a GSH por medio de la glutatión reductasa (GR), la cual se encuentra distribuida tanto en el citoplasma como en la mitocondria. El proceso de síntesis ocurre en el citosol en dos pasos consecutivos dependientes de ATP, catalizados por la γ -glutamilcisteina-ligasa (GCL) y por la glutatión sintetasa (Figura 3). El punto limitante en la síntesis del GSH está mediado por la GCL y es regulado en forma negativa por el mismo GSH (Circu y Yee Aw, 2008). La GCL está constituida por dos subunidades; una catalítica (GCLC) y una

modificadora (GCLM). La función de esta última consiste en disminuir la K_m por el glutamato y ATP e incrementar la K_i por la retroalimentación negativa que ejerce el GSH. Los ratones nulos a *Gclc* no sobreviven más allá del día 9 de gestación (E9), mientras que los heterocigotos tienen la mitad de proteína que el ratón silvestre y aparentemente son normales (Dalton et al, 2004).

En términos de concentración de GSH y GSSG, cada organelo presenta un ambiente redox peculiar que cumple un fin específico. El GSH de la mitocondria por ejemplo, contiene con las ERO generadas por el proceso de fosforilación oxidativa donde la concentración de GSH:GSSH es de 100: 1, pudiendo disminuir a 4: 1 en condiciones de estrés oxidante. El RE por su parte presenta un ambiente redox altamente oxidado y tiene una concentración similar de GSH en relación a la citosólica. Este estado redox favorece la formación de puentes disulfuro y el plegamiento correcto de las proteínas. Finalmente, el GSH del núcleo juega un papel esencial al proteger al ADN del daño inducido por radiación ionizante y agentes oxidantes. Adicionalmente, participa en la síntesis del ADN al funcionar como donador de hidrógenos en la reducción de ribonucleótidos a deoxiribonucleótidos (Circu y Aw, 2008).

Dado lo anterior, es fácil entender que el GSH juega un papel crucial en diversas funciones de los organismos y en particular en el cerebro, el cual tiene al GSH como defensa primaria en contra de los efectos adversos de las ERO. Ejemplo de ello es el daño mitocondrial inducido por el aumento en el nivel de ERO, generado por la disminución en los niveles de GSH en cerebros de ratas recién nacidas por medio de BSO, un agente inhibidor de la síntesis de glutatión (Dringen 2000).

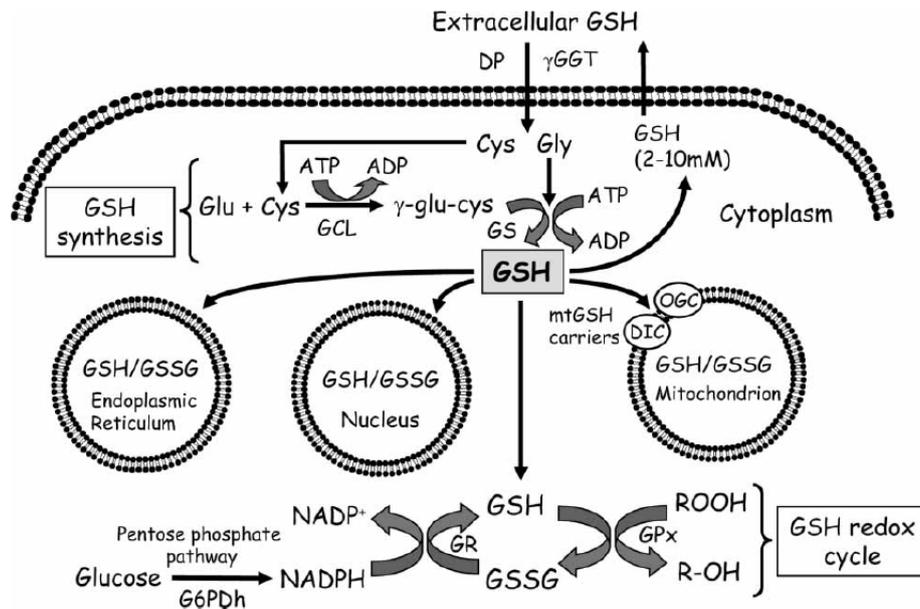


Figura 3. Homeostasis celular del GSH: síntesis, ciclo redox y compartimentalización. El GSH se sintetiza a partir de Glu, Cys y Gly en dos pasos consecutivos dependientes de ATP catalizados por la glutamato cisteína ligasa y la glutatión sintetasa. Estos aminoácidos precursores son obtenidos por la hidrólisis extracelular de distintos elementos, catalizada por la γ -glutamyltransferasa y dipeptidasa. Sintetizado el GSH, se compartimentaliza en el núcleo, mitocondria y retículo endoplasmático. Estos organelos contienen distintas concentraciones de GSH, provocando una diferencia en sus ambientes redox. Los acarreadores dicarboxilato y oxoglutarato median la entrada del GSH a la mitocondria. El reciclamiento del GSSG a GSH se lleva a cabo por la GR en un proceso dependiente de NADPH.

4. ANTECEDENTES

4.1. *Glutación y apoptosis*

En forma histórica, se ha propuesto que durante la muerte apoptótica ocurre una disminución en los niveles de GSH resultado del estrés oxidante generado. No obstante, estudios recientes han sugerido que el GSH es un regulador de la apoptosis (Circu y Yee Aw, 2008, Pompella *et. al.*, 2003). Se ha demostrado que 30 minutos después de ejercer un estímulo oxidante, ocurre una elevación importante de GSSG que precede a la pérdida de la integridad mitocondrial, la translocación del cit-c y la activación de la caspasa 3. Consistentemente, el pretratamiento con N-acetilcisteína (NAC), un precursor de GSH, previene la apoptosis por el mismo estímulo (Circu y Aw, 2008).

Ayudando lo anterior, se ha visto que al mantener los niveles intracelulares de GSH por el uso de análogos permeables de GSH o al inhibir la expulsión del GSH, se inhibe o retrasa la apoptosis (Ghibelli *et al* 1998). En forma adicional, existe una gran cantidad de información respecto a la resistencia de tumores con niveles elevados de GSH a terapias de radiación y quimioterapia (Schroder *et al*, 1996). Estas evidencias sugieren que el GSH es un regulador de la apoptosis y no un efecto secundario de esta.

Por otro lado, se sabe que una vez desatada la activación de la maquinaria apoptótica, la caspasa 3 induce el corte proteolítico de la GCLC en la Asp⁴⁹⁹, una región necesaria para la asociación con la GCLM. Este evento induce una rápida pérdida en los niveles de GSH, y por lo tanto, ejerce un ciclo de retroalimentación (Franklin *et al*, 2002). Finalmente, la disminución en los niveles de GSH produce un incremento en los niveles de ERO, favoreciendo eventos como la dimerización de Bax de pendiente de oxidación, la formación de la apoptosoma, la oxidación de la cardiolipina y la subsecuente liberación del cit-c. También se ha propuesto que el GSH puede disparar la apoptosis en forma directa al modular aspectos como la formación de poro de transición, al prevenir la oxidación de grupos tioles de la subunidad de nucleótidos de adenina (ANT) (Armstrong *et al*, 2002).

Lo anterior indica que la disminución en el contenido del GSH es un evento que puede mediar diversos puntos de regulación en las cascadas de señalización de la vía

intrínseca y de la vía extrínseca apoptótica. No obstante, hay evidencias contradictorias (Circu y Yee Aw, 2008, Franco y Cidlowski, 2009) y en este momento no es posible indicar un rol preciso del glutatión en la apoptosis.

En relación al decremento de los niveles de GSH durante la muerte apoptótica, existen dos mecanismos principales que lo explican. Estos son, la oxidación directa del GSH provocada por ERO y su expulsión de la célula a través de la membrana plasmática por medio de bombas (GSH-T) (Franco y Cidlowski, 2009). Este último está relacionado con la activación de los receptores de muerte y precede al estrés oxidante generado por la acumulación de ERO y es necesario para la progresión de la apoptosis. Si se evita la expulsión del GSH utilizando L-metionina o sulfobromoftaleina, es posible revertir la apoptosis (Filomeni et al, 2002).

Por otro lado, el estrés oxidante en el retículo endoplasmático se relaciona con la oxidación directa del GSH, resultado de alteraciones en los niveles energéticos de la célula, del estado redox, de la concentración de Ca^{2+} y se ve reflejado en la acumulación o agregación de proteínas desplegadas capaces de disparar la apoptosis. Otro organelo cuyo contenido de GSH se ve afectado por oxidación es la mitocondria. En este caso, la muerte se induce cuando los niveles de GSH se encuentran por debajo del 50% en relación al control (Jain et al, 1991, Martensson et al, 1991), predisponiendo al ADN y a los ácidos grasos mitocondriales a extenso daño oxidativo (Fonnum y Lock, 2004). En estas condiciones, elementos de la fosforilación oxidativa como la succinil-CoA transferasa y principalmente, la ATP sintetasa, presentan un decremento sustancial en su actividad debido a su estado glutationilado (García et al, 2010). Lo anterior parece reflejarse en un decremento en la tasa de recambio de ATP y en una limitada exportación del mismo hacia el citoplasma (Vesce et al., 2005). En forma adicional, el estrés oxidante generado por los bajos niveles de GSH en la mitocondria se asocian a la pérdida del potencial de membrana, liberación al citosol del cit-c e iniciación de la cascada apoptótica (Circu y Aw, 2008; Filomeni et al, 2002; Franco y Cidlowski, 2009).

4.1.2. Glutatión y regulación de la apoptosis

Como se mencionó anteriormente, existe una amplia discusión alrededor del rol específico que juega el GSH en la apoptosis. Diversas evidencias sugieren una función

protectora en este tipo de muerte celular. Ejemplo de ello es la capacidad del GSH de proteger a las cisteínas del motivo catalítico QACRG de las caspasas, de la oxidación por ERO (Circu y Yee Aw, 2008). Esta protección se lleva a cabo por la formación reversible de complejos S-glutión que funcionan como una barrera que impide el corte proteolítico por otras caspasas (Circu y Aw, 2008, Pompella *et. al.*, 2003). En forma consistente, se ha visto que el proceso de muerte apoptótica va acompañado de un incremento en la formación de estos complejos proteína-SSG (Circu y Aw, 2008). Este proceso de cruce de di sulfuros entre la cisteína de l G SH y un motivo de cisteína presente en la proteína en cuestión es conocida como (S-) glutationilación y se ve favorecida por condiciones oxidantes, como las inducidas por un estímulo apoptótico (Dalle-Donne *et al.*, 2007).

Un ejemplo de estímulo apoptótico que desencadena este proceso es la estimulación con el ligando Fas. Dicho estímulo desencadena la activación de caspasas que favorece el corte proteolítico de blancos como la glutaredoxina 1, inhibiendo su actividad enzimática. Lo anterior promueve la glutationilación de Fas, que incrementa la unión de su ligando y aumenta la activación de caspasas (Anathy *et al.*, 2009).

Por otro lado, existen evidencias que sugieren que Bcl-2 interactúa con el GSH por medio de su dominio BH3 y que esta interacción puede regular positivamente los niveles del último (Zimmermann *et al* 2007). Prueba de ello es la sobre expresión de Bcl-2 en células con niveles bajos de GSH, la cual genera un incremento en estos últimos e inhibe la muerte celular inducida por la mitocondria (Alessio *et al.*, 2004; Circu y Yee Aw, 2008). En forma consistente, la disrupción de esta interacción por proteínas proapoptóticas como BimL, provoca la expulsión del GSH mitocondrial, así como la inhibición del transporte de GSH a su interior (Circu y Aw, 2008). Además, se ha demostrado que varios canales iónicos y transportadores están regulados por alteraciones en la homeostasis del GSH y ERO. Dentro de estos casos se encuentran los canales de K^+ , Cl^- y de la ATPasa de Na^+/K^+ , los cuales a su vez, han sido asociados a los procesos de decremento en volumen celular presente en la apoptosis (Petrushanko *et al* 2005).

4.2. Disminución del glutatión en neuronas

Las evidencias anteriores demuestran que al disminuir los niveles de GSH se genera una predisposición a la muerte apoptótica de distintos tipos celulares, incluyendo las neuronas. Tal es el caso de varias enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson, cuyo marcador más temprano es la disminución en el contenido de GSH/GSSG en la sustancia nigra y cuya magnitud se correlaciona directamente con la formación de agregados proteicos y severidad de la enfermedad (Andersen, 2004). Lo anterior parece estar en relación directa con la producción de ERO, dado que el metabolismo de la dopamina genera productos como el superóxido, el peróxido de hidrógeno y quininas dopaminérgicas, que pueden estar ligadas con la oxidación de la α -sinucleína (Andersen, 2004)

En forma adicional y reciente, se ha observado que no solo los bajos niveles de GSH inducen la muerte neuronal, sino que también su sobreexpresión ejerce efectos deletéreos. Se sabe que la sobreexpresión de GSH genera una glutationilación de proteínas en una forma aberrante y una subsecuente muerte, indicando que debe haber una regulación muy fina de los niveles de GSH para la supervivencia de estas neuronas (Garrido et al., 2011).

En el caso específico de las NGC, los estudios de Wüllner *et al.* (1999) demostraron que el tratamiento con BSO produce un decremento de GSH citoplasmático dependiente de la concentración y tiempo de tratamiento, mientras que los niveles de GSH mitocondrial se mantienen relativamente estables. En estas condiciones, la degeneración neuronal es apoptótica y ocurre después de 24-36 hrs de tratamiento, tiempo en el cual la disminución de GSH sobrepasa el 50% en relación con células no tratadas. En contraste, la conjugación directa del GSH mitocondrial y citoplasmático por ácido tetrácico induce la pérdida de GSH mitocondrial en forma inmediata, lo cual genera un incremento de intermediarios de especies reactivas en tan solo 2 horas. Esta rápida disminución en los niveles de GSH produce el colapso del potencial de membrana mitocondrial y muerte celular con características necróticas en 4-8 hrs. (Wüllner et al., 1999). Lo anterior no es de sorprender, dado que el ADN mitocondrial es altamente vulnerable al estrés oxidante debido a su estructura circular abierta y a la carencia de histonas que lo protejan (Ayer et al., 2010). Por ende, estos

daños deben ser capaces de desencadenar procesos de señalización que concluyan con la muerte neuronal.

En conclusión, el contenido de GSH parece relacionarse en forma directa con la concentración de ERO y con la muerte neuronal, indicando un posible proceso de señalización celular desencadenado por estas últimas y regulado por el GSH. Por lo tanto, estudiar a fondo la relación entre el GSH, las ERO y la muerte programada en el cerebelo y las CGN generará resultados que ayuden a comprender el papel de este tiol en el desarrollo del sistema nervioso.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existen evidencias que sugieren que las ERO pueden funcionar como señales en diversos procesos fisiológicos, incluyendo el de desarrollo. Dado que el glutatión es la molécula antioxidante más importante en el sistema nervioso, es posible que regule los procesos de desarrollo y muerte celular apoptótica en las que se ha implicado a las ERO. Una forma de probar lo anterior es modificando los niveles de GSH mediante el uso de BSO durante el desarrollo del sistema nervioso de la rata, un periodo en el cual el BSO tiene acceso al sistema nervioso central y puede inducir una reducción en los niveles de GSH en cerebro (Martensson y Meister, 1992; Castagné *et al.*, 2004).

6. HIPÓTESIS

Dado que las ERO están involucradas en procesos de desarrollo y que el GSH es uno de los sistemas antioxidantes más importantes del sistema nervioso, entonces la reducción de los niveles de GSH durante periodos críticos del desarrollo del sistema nervioso afectará algunos de sus eventos, en particular la muerte neuronal programada, y la migración neuronal.

7. OBJETIVO

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

7.1. *Objetivos particulares*

- Conocer los niveles de glutatión en neuronas granulares de rata *in vitro*.
- Estudiar el efecto del BSO en los niveles de glutatión y ERO en cultivos de neuronas granulares de rata en condiciones control y sometidas a una condición apoptótica.
- Explorar la participación del glutatión en la regulación de los niveles de ERO en el cerebelo durante procesos del desarrollo como la muerte apoptótica, la migración y la proliferación de CGN.
- Estudiar los efectos provocados por la disminución de los niveles de glutatión en el desarrollo del cerebelo de rata a nivel histológico.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Materiales

El suero fetal bovino, penicilina/estreptomicina fueron adquiridos en GIBCO (Grand Island, NY, USA). El 5,5'-Ditiobis(2-ácido nitrobenzoico) (DTNB), la glutatión reductasa (GR), la butionina sulfoximina (BSO), el NADPH, el N-acetil cisteína (NAC), la 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU), el ioduro de propidio (IP), la poli-L-lisina, la tripsina, la ADNasa, la citosina-D-arabino-furoanosida y la gelatina de bovino, se compraron en Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA). El Mn(III)TMPyP y EUK134 fueron de Calbiochem. La calceína-AM y el anticuerpo Alexa Fluor 488 de pollo anti-rata IgG (H+L) se compraron en Invitrogen, Molecular Probes (Eugene, OR, USA). El anticuerpo policlonal contra caspasa-3 cortada (Asp 175) se obtuvo de Cell Signaling technology (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). El anticuerpo monoclonal de rata-anti BrdU fue comprado en Accurate Chemical & Scientific (Westbury, NY, USA). El Vectashield fue adquirido en Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA).

8.2. Cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo

Se obtuvieron a partir de ratas Wistar de 8 DPNs (Morán y Patel, 1989). Para ello, se disectó el cerebelo y se disociaron las neuronas con tripsina y ADNasa. Dichas neuronas se cultivaron a una densidad de 1.5×10^6 células/ml en cajas de plástico previamente cubiertas con 5 µg/ml de poli-L-lisina. El medio utilizado fue basal Eagle suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino inactivado por calor, 2mM de glutamina, 25 mM de KCl, 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomicina. Las neuronas se incubaron a 37° C en una atmósfera húmeda al 95% de aire y 5% de CO₂. Finalmente, a los cultivos se les añadió citosina arabinosida 10 µM 24 hrs después de sembradas, evitando así la proliferación de células no neuronales. Estos cultivos se emplearon para determinar parámetros de viabilidad celular, niveles de GSH y de ERO.

8.3. Tratamiento de los cultivos

Los cultivos celulares fueron tratados entre los 6 y 8 días *in vitro* (DIV). El primer tratamiento fue con concentraciones de BSO de 50, 100, 200, 300 y 500 μM a 4, 8, 12, 24 y 36 hrs. Dicho tratamiento tuvo como fin encontrar una concentración y tiempo adecuado para disminuir los niveles de GSH. Conociendo esta concentración y en forma posterior a la disminución de los niveles de GSH, se utilizó un segundo tratamiento con estímulos apoptóticos como el cambio de medio sin suero con KCl 5 mM (referido como K5) o 0.5 μM de estaurosporina (ST). Este experimento tuvo como fin conocer el papel del GSH frente a un estímulo apoptótico. Finalmente se utilizaron antioxidantes como el NAC 3, 5 y 10 mM, Mn(III)TMPyP a 50 ó 100 μM y EUK 134 a 15 μM durante 23 horas y media de después del tratamiento con BSO 200 μM y 30 minutos antes de los estímulos apoptóticos (Figura 4). En el caso del K5, el BSO fue removido al momento del cambio del medio, mientras que al tratar con la ST, este continuó hasta el final del ensayo. El fin de estos experimentos fue comprobar si los cambios ocasionados por la disminución del GSH y los estímulos eran debidos a la generación de ERO, así como obtener una idea de qué especies podrían estar jugando un papel en ello.

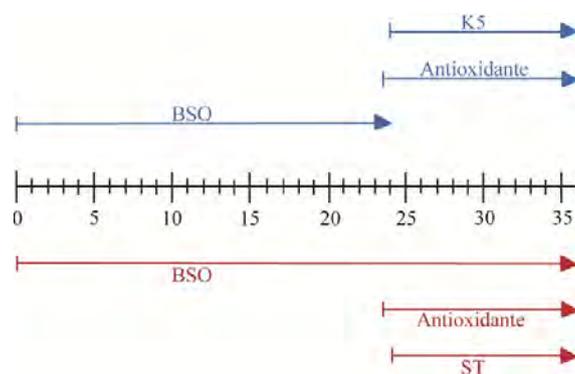


Figura 4. El diagrama ilustra el orden y duración de la administración de BSO, de los antioxidantes (EUK 134, Mn(III)TMPyP, NAC) y del estímulo prooxidante (K5 en azul ó ST en rojo). La regleta central indica las horas y las flechas delimitan el comienzo y fin de cada tratamiento. Transcurridas las 36 horas, los experimentos fueron evaluados en un microscopio de epifluorescencia.

8.4. Viabilidad celular

Posterior a los tratamientos realizados, se cuantificó la viabilidad de los cultivos. Para ello se sometió a las células a 0.4 μM de calceína-AM por 10 minutos ó a 5 μM de diacetato de diclorofluoresceína (FDA) por 15 minutos. Estas moléculas son permeables

al las membranas lipídicas de las células y son cortadas por las esterasas de células viables, liberando así una fluorescencia verde. El ensayo se complementó con la adición de yoduro de propidio (IP) 2 μ M para teñir células muertas o en proceso de muerte. A partir de la contabilización de células positivas a calceína e IP y la obtención las proporciones de éstas respecto al total de células en el campo, se obtuvo la viabilidad de las células. Para hacer estas evaluaciones, se fotografiaron los pozos y se hizo la cuantificación del 40% del campo. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio de epifluorescencia (Nikon Diaphot TMD; Nikon Corp., Japan) y se utilizaron filtros Nikon para fluoresceína y rodamina.

8.5. Evaluación de los niveles de GSH in vitro

Los niveles de GSH se determinaron en homogenizados de NGC, mediante el ensayo de reciclamiento enzimático de Tietze publicado (Rahman et. al., 2007). Este ensayo consiste en oxidar al GSH por medio de 5,5-ditio-bis (2-ácido nitrobenzoico) (DTNB) para formar el derivado amarillo 5-tio-2-ácido nitrobenzoico (TNB) (medido a 412 nm) y el producto oxidado GS-TNB. Este producto es reciclado a GSH utilizando NADPH y la GR, produciendo la liberación de TNB. En esta forma se obtiene la medición de glutatión celular total. Para la medición del GSSG, el GSH se une covalentemente con 2-vinilpiridina. Este compuesto únicamente se une al GSH y por lo tanto evita que interactúe con el DTNB. En esta forma, se mide el TNB liberado únicamente por la reducción de GS-TNB, obteniendo la medición del glutatión oxidado. A partir de los resultados se puede obtener la diferencia entre el glutatión total y el GSSG para así conocer el GSH presente en la muestra. Las concentraciones de GSH y GSSG se obtuvieron a partir de la curva de regresión generada y de la cuantificación proteica hecha por el ensayo de Bradford.

8.6. Evaluación de los niveles de ERO

Se determinó la producción de ERO en NGC incubadas por 20 minutos con dihidroetidio (DHE) 3.2 μ M, las cuales se fijaron con paraformaldehído 4%. El DHE es una molécula altamente susceptible a la oxidación por distintas ERO, produciendo su descomposición a etidio, el cual es capaz de unirse al ADN. Al contabilizar los núcleos positivos a DHE respecto al total de las células por campo, se obtuvo una medida del

estado oxidante de las células. Estas evaluaciones se hicieron empleando un microscopio de epi fluorescencia (Nikon Diaphot TMD; Nikon Corp., Japan) con un filtro Nikon para rodamina.

8.7. Tratamiento de las ratas

Las ratas se inyectaron diariamente una vez y en forma intraperitoneal (i.p.), a partir de las 48 hrs de nacimiento y hasta el día de su perfusión. Se utilizaron 2 dosis de BSO (1.5 mmol/Kg de peso total y 3 mmol/Kg peso total) y como control solución de NaCl 0.9%. Cuatro horas antes de la perfusión se hizo una dosis i.p. de DHE 27 mg/Kg de rata. En los experimentos donde se utilizó BrdU, se hizo una inyección en el 8 DPN de 50 mg/Kg de rata, ya sea 2 horas (8 DPN) ó 4 días (12 DPN) antes de la perfusión.

8.8. Evaluación de los niveles de GSH in vivo

Los tejidos se obtuvieron a partir de ratas decapitadas al momento de la recolección. El tejido se disectó en forma rápida, se lavó en una solución fría de NaCl 0.9%, se pesó y posteriormente se suspendió en 0.5 ml de ácido sulfosalicílico 4.31%. En este medio se hizo el homogenado de tejido, se centrifugó a 8000 g por 15 minutos a 4 °C y se recuperó el sobrenadante. A partir de este último se realizó el ensayo de reciclamiento enzimático de Tietze y a partir del pellet se hizo la cuantificación de proteína por medio del ensayo de Bradford.

8.9. Evaluación de la morfología del cerebelo

Se perfundió y fijó a las ratas con paraformaldehído al 4%. Posteriormente se obtuvieron cortes sagitales seriales del vermis del cerebelo y estos fueron teñidos con hematoxilina/eosina. La evaluación de la morfología se hizo a partir de imágenes obtenidas en un microscopio estereoscópico.

8.10. Inmunohistoquímica contra caspasa 3 activa

Los cortes se lavaron 3 veces y por 4 minutos con PBS. Subsecuentemente se bloqueó con suero de cabra al 3% diluido en PBS + Tritón X-100 0.3% (PBT) por 2 hrs

y a temperatura ambiente. Posteriormente se sometieron los cortes al anticuerpo primario policlonal contra caspasa-3 cortada (Asp 175) (1:200) diluido en PBT por 2 días y a 4 °C. Terminado este tiempo, se hicieron 4 lavados por 5 minutos en PBS y se puso el anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 de pollo anti-rata IgG (H+L) (1:250) por 1 hora y a temperatura ambiente. Concluido este tiempo, se hicieron 3 lavados en PBS por 5 minutos y se procedió a montar con Vectashield. Las imágenes fueron analizadas en un microscopio confocal (FluoView FV1000, Olympus, Japan).

8.11. Inmunohistoquímica contra BrdU

Los cortes se lavaron 3 veces y por 4 minutos con PBS. El ADN fue desnaturalizado con HCl 1M por 30 minutos y a 45 °. Para neutralizar el ácido se hicieron 3 lavados de 5 minutos con PBS. En forma subsecuente se bloqueó con suero de cabra al 3% diluido en PBS + Tritón X-100 0.3% (PBT) por 1 hr y a temperatura ambiente. Posteriormente se sometieron los cortes al anticuerpo primario monoclonal anti BrdU hecho en rata (1:200) diluido en PBT por 2 días y a 4 °C. Terminado este tiempo, se hicieron 4 lavados por 5 minutos en PBS y se puso el anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 de pollo anti-rata IgG (H+L) (1:500) por 2 horas y a temperatura ambiente. Concluido este tiempo, se hicieron 3 lavados en PBS por 5 minutos y se procedió a montar con Vectashield. Las imágenes fueron analizadas en un microscopio confocal (FluoView FV1000, Olympus, Japan).

8.12. Análisis estadístico

Los resultados se analizaron con un análisis de varianza de diseño aleatorio (ANOVA) de una serie de experimentos independientes seguidos o por una prueba t de Student, dependiendo el caso. La significancia utilizada fue de $p < 0.05$. El número de ensayos se indica en los pies de figura.

9. RESULTADOS

9.1. Rol del glutatión en las neuronas granulares del cerebelo de rata

Con el fin de establecer puntos críticos de tratamiento que afecten la supervivencia de las NGC, se realizó una curva de tiempo y concentración de BSO. Se tomó como referencia el trabajo de Wüllner *et. al.* (1999) para establecer algunas concentraciones y tiempos. Estos parámetros se ampliaron con el fin de obtener un rango más completo, evaluando así concentraciones de BSO de 50, 100, 200, 300 y 500 μM . Estas se administraron por tiempos de 4, 8, 12, 24 y 36 hrs. (Figura 5).

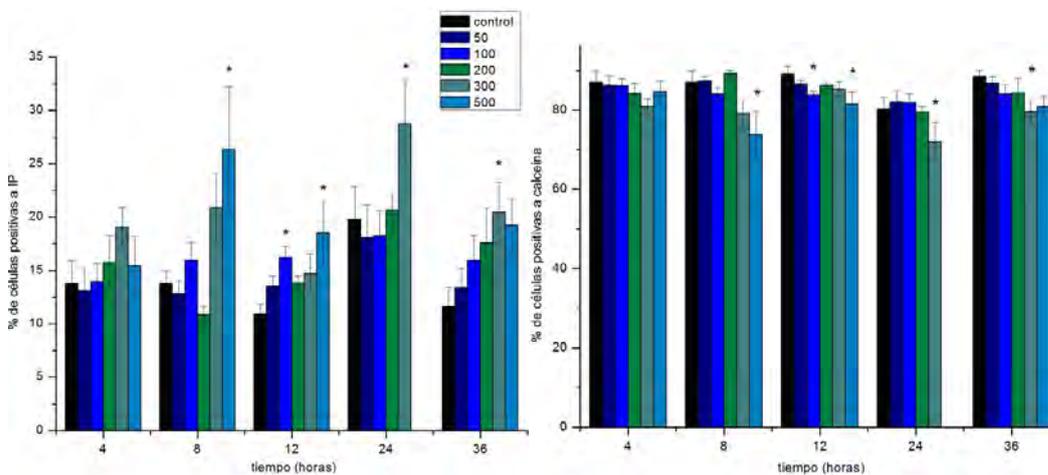


Figura 5. Efecto del tratamiento de BSO sobre la viabilidad celular. La viabilidad se evaluó como la incorporación de yoduro de propidio para identificar neuronas muertas y como la tinción de calceína para identificar las neuronas vivas. Los tratamientos se hicieron durante 4, 8, 12, 24 y 36 hrs. Las concentraciones usadas fueron de 50 a 500 μM como se indica en el recuadro. Los resultados expresan como el porcentaje de células marcadas del total de neuronas teñidas con yoduro de propidio y calceína en el mismo campo. Las barras representan el error estándar de por lo menos 3 experimentos independientes. ANOVA de una vía, $p < 0.05$ vs. control.

Los resultados indican una tendencia a incrementar el número de neuronas muertas de forma dependiente de concentración y de tiempo. Los cambios más importantes ocurrieron después de las 12 hrs. de tratamiento, siendo significativos algunos de ellos. No obstante, es notorio que el BSO *per se*, no afecta la viabilidad en una forma importante. Finalmente, se llegaron a hacer algunos experimentos tratando a las neuronas con BSO por 48 hrs. A períodos tan largos como éste, las células se encuentran totalmente muertas.

Para conocer los niveles de ERO generados en estas mismas condiciones, se hizo la cuantificación de células positivas a DHE (Figura 6). Los resultados indicaron un ligero aumento dependiente del tiempo de tratamiento con BSO a partir de las 12 hrs. Este aumento fue significativo únicamente a tratamientos largos (36 hrs). De esta forma, se observa una correlación entre la viabilidad y la producción de ERO en neuronas tratadas con BSO, sugiriendo que el proceso de muerte puede ser mediado por los efectos deletéreos de las ERO.

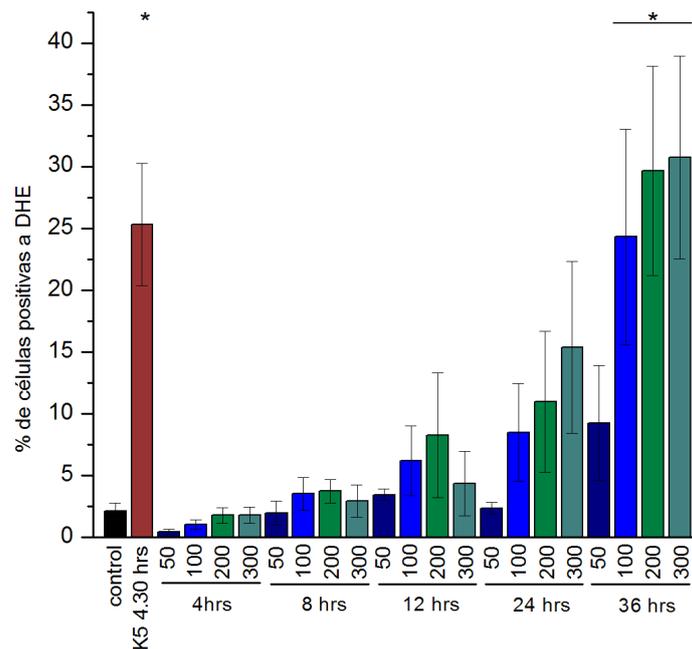


Figura 6. Producción de ERO generada por el tratamiento con BSO a 4, 8, 12, 24 y 36 hrs. Las concentraciones utilizadas fueron de 50 a 300 μM. Los resultados denotan el porcentaje de células positivas a dihidroetidio respecto al total. Las barras representan el error estándar obtenido en por lo menos 3 experimentos independientes. ANOVA de una vía, $p < 0.05$ vs. control.

Intentando correlacionar los resultados anteriores con los niveles de GSH y con el fin de conocer tiempos y concentraciones precisas que disminuyan en forma significativa los niveles de GSH, se analizaron las concentraciones de GSH y GSSG en NGC bajo condiciones basales y tratadas con BSO por diferentes tiempos y concentraciones. Para cumplir este objetivo, se montó una técnica basada en el ensayo de reciclamiento de Tietze (Figura 7).

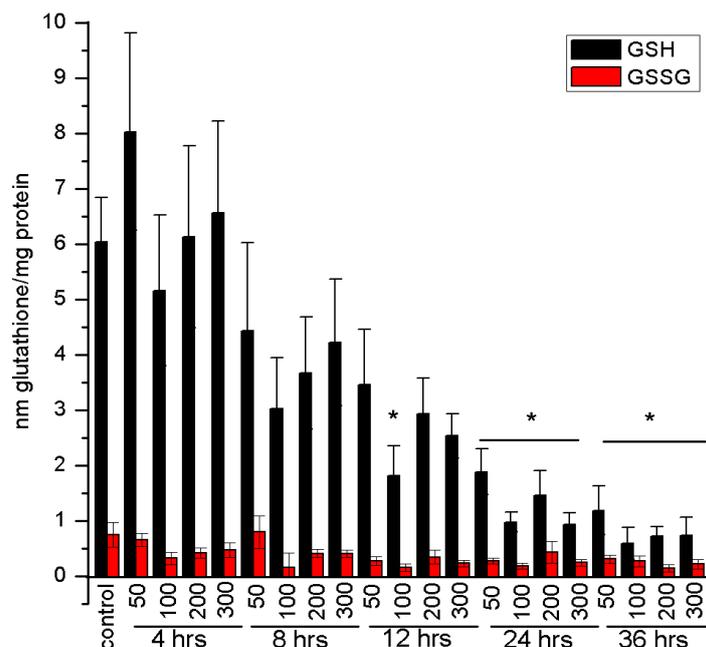


Figura 7. Efecto del BSO en los niveles de GSH total en NGC tratadas por 4, 8, 12, 24 y 36 hrs. de. Las concentraciones usadas fueron de 50 a 500 μM . Las barras negras indican los niveles de GSH, mientras que las rojas los de GSSG. El error estándar se obtuvo de por lo menos 3 experimentos independientes. ANOVA de una vía, $p < 0.05$ vs. Control.

Los resultados obtenidos indicaron que la disminución en los niveles de GSH producidos por la inhibición de la síntesis *de novo* con BSO son dependientes del tiempo. La disminución más significativa de GSH ocurrió a las 24 y 36 hrs de tratamiento, siendo consistentes con los resultados anteriores. Interesantemente, los niveles de GSSG no tuvieron cambios significativos.

Dado que los niveles de GSH disminuyeron en forma significativa a partir de las 24 hrs y que esto correlaciona con un ligero aumento en la generación de ERO, intentamos revertir estos efectos introduciendo dos antioxidantes al momento de poner el BSO. El Mn(III)TMPyP (50 y 100 μM), que es una porfirina de manganeso que posee actividad de reductasa de peroxinitrito y de superóxido dismutasa (SOD); y el N-acetilcisteína (NAC), 2, 5 y 10 mM, que es una molécula con cualidades de antioxidante que mantiene el reservorio de cisteína y que sirve como precursor del GSH. Los resultados obtenidos con el NAC no generaron cambios significativos en la muerte neuronal, mientras que en forma no esperada, el Mn(III)TMPyP produjo un incremento exacerbado en la muerte (Figura 8).

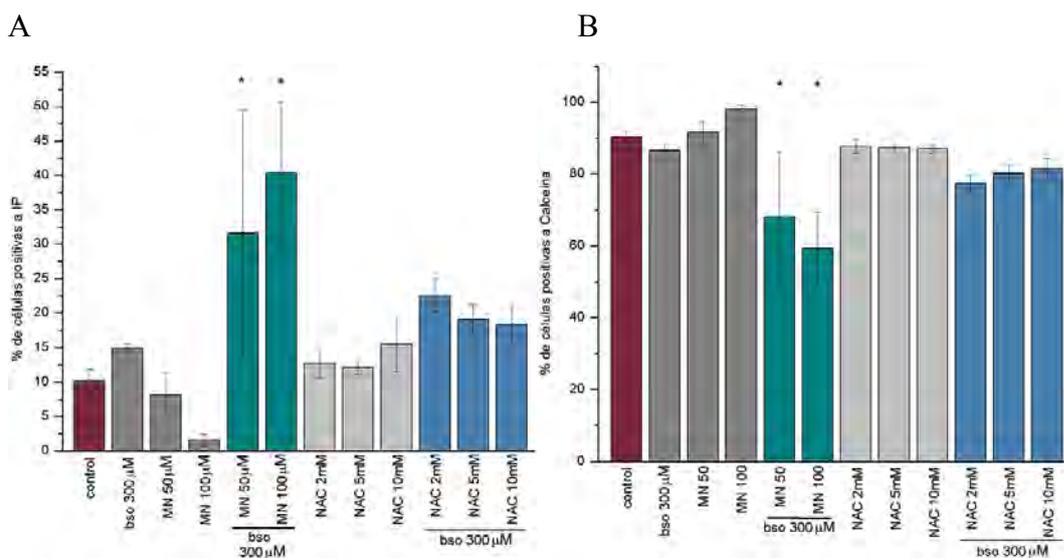


Figura 8. Efecto del tratamiento de Mn(III)TMPyP (50 y 100 μ M) y NAC (2, 5 y 10 mM) sobre la viabilidad celular. La viabilidad se evaluó con la incorporación de yoduro de propidio para identificar neuronas muertas (A) y con la tinción de calceína (B) para identificar las neuronas viables. Los tratamientos se hicieron durante por 24 hrs. Los resultados expresan como el porcentaje de células marcadas del total de neuronas teñidas con yoduro de propidio y calceína en el mismo campo. Las barras representan el error estándar de por lo menos 3 experimentos independientes. ANOVA de una vía, $p < 0.05$ vs. control.

Sabiendo que los niveles de GSH disminuyen en forma significativa a las 24 hrs de tratamiento con BSO, pero que este tratamiento no compromete en forma importante la supervivencia neuronal, se estudió el efecto de someter a las neuronas granulares a tratamientos que inducen un aumento en la producción de ERO (Valencia A. y Morán J., 2001; Valencia A. y Morán J., 2004). Para ello, se disminuyeron los niveles de GSH con BSO 200 μ M o 300 μ M por 24 horas y posteriormente se trataron con estaurosporina 500 nM o potasio 5 mM (K5). En el primer caso, las células conservaron el medio con BSO durante el tiempo de tratamiento con estaurosporina. En el segundo caso, se cambió el medio de cultivo por uno con K5 y por lo tanto, se removió el BSO preexistente.

Los resultados obtenidos indicaron que las células cuyos niveles de glutatión fueron disminuidos al tratarlas con BSO por 24 hrs y que recibieron en forma posterior el estímulo pro-oxidante (K5 o ST), tuvieron una disminución significativa en la viabilidad, respecto a las células tratadas únicamente con el estímulo pro-oxidante (Figura 9). De esta forma se observa que las células tratadas con BSO + K5 por tan solo

4.5 hrs tienen niveles de muerte cercanos al 50 %, equiparables a los obtenidos en células tratadas únicamente con K5 por 24 hrs. A las 12 hrs, se observa una dramática disminución en la población neuronal, encontrando proporciones superiores al 80 % respecto a la población total. Finalmente, a las 24 hrs, todas las células en cultivo se encuentran virtualmente muertas. Es necesario mencionar que todos los resultados presentaron cambios significativos respecto al control K25 y a las células tratadas únicamente con BSO por 24 hrs y que por lo tanto, el efecto observado es resultado del efecto de ambos tratamientos y no de uno solo. Esto demuestra que la carencia de GSH produce una reducción importante en el tiempo necesario para que la viabilidad celular se vea afectada en forma significativa.

Por otro lado, se puede observar que al utilizar dos concentraciones distintas de BSO (200 μ M y 300 μ M) existe un aumento en la muerte celular entre a las 4.5, 6 y 12 hrs. Este aumento no es estadísticamente significativo, no obstante, hace notorio un posible efecto de toxicidad mediado por el BSO a estas concentraciones.

Posteriormente, se correlacionó el proceso de muerte, observado bajo estas condiciones, con un incremento en la generación de ERO (Figura 10). Los resultados indicaron que la carencia de GSH generada por el tratamiento con BSO provoca un incremento significativo de ERO, respecto a su control correspondiente, a partir de las 12 hrs de tratamiento con K5 o S.T. Todos los resultados presentaron cambios significativos respecto al control K25 y a las células tratadas únicamente con BSO por 24 hrs; por lo tanto, el efecto observado es resultado del efecto de ambos tratamientos y no de uno solo.

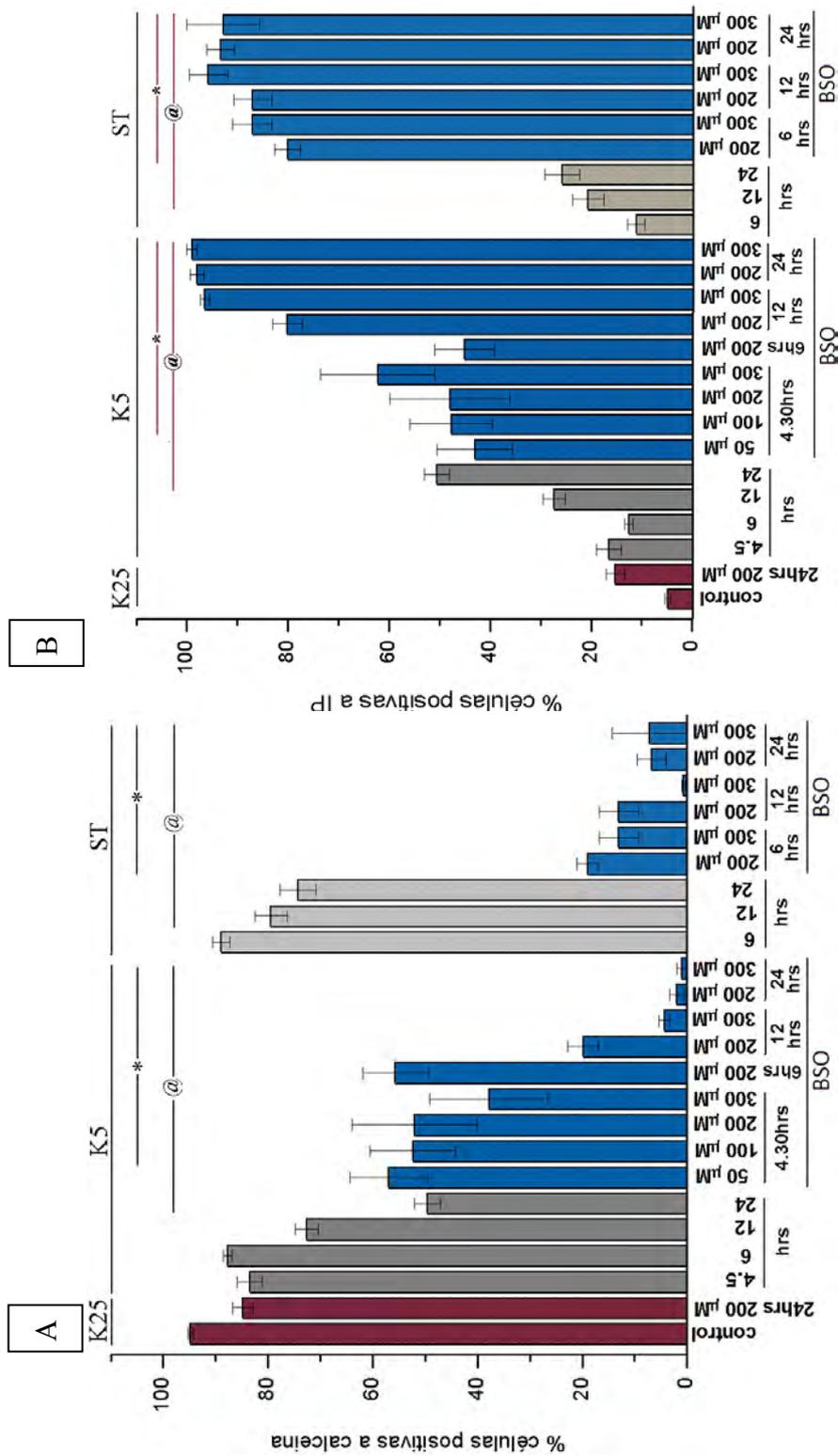


Figura 9. Efecto del tratamiento con K5 por 4.5, 6, 12 y 24 hrs en NGC previamente sometidas a BSO 200 μ M ó BSO 300 μ M por 24 hrs. La incorporación de iodo de propidio (A) identifica neuronas muertas; la tinción con calceína (B), identifica neuronas vivas. Los resultados denotan el porcentaje de células positivas respecto al total. Las barras representan el error estándar obtenido ($n \geq 3$). Las "@" indican diferencia significativa entre el control y cualquier otra categoría. Los "*" indican diferencia significativa frente a su respectivo tratamiento pro-oxidante. ANOVA de una vía, $p < 0.05$ vs. el control ó estímulo prooxidante de cada categoría.

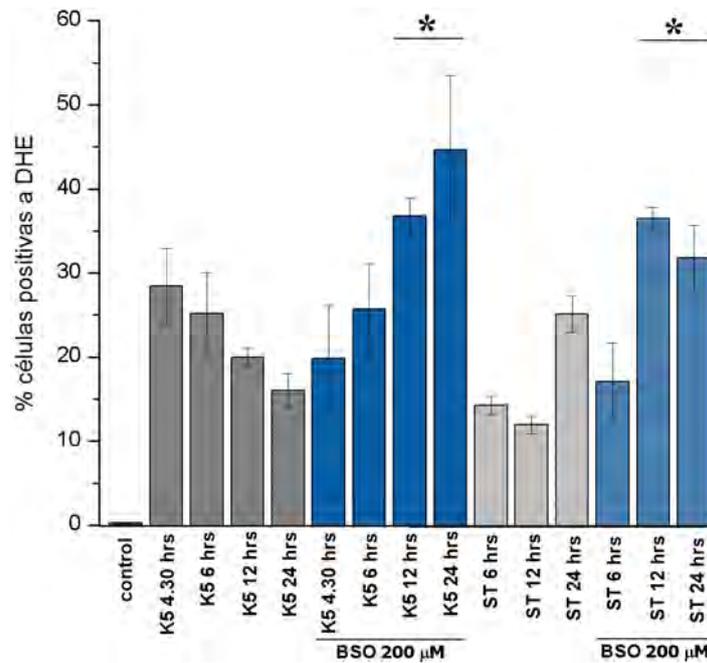


Figura 10. Producción de ERO generada por K5 por 4.5, 6, 12 y 24 hrs ó estaurosporina por 6, 12 y 24 hrs, en NGC previamente sometidas a BSO 200 μM por 24 hrs. Los resultados de notan el porcentaje de células positivas a dihidroetidio respecto al total. Las barras representan el error estándar obtenido ($n \geq 3$). Las “*” indican diferencia significativa frente a su respectivo estímulo pro-oxidante. Todos los valores son significativos respecto al control. ANOVA de una vía, $p < 0.05$ vs. el respectivo estímulo pro-oxidante.

En relación a los o de dos concentraciones distintas de BSO, no se observaron diferencias significativas en la generación de ERO (datos no mostrados). Por lo tanto, el posible efecto de toxicidad mediado por la concentración de BSO no es generado por un aumento en estas. De esta forma, los resultados obtenidos indican que la carencia de GSH generada por el pre-tratamiento con BSO, provoca un incremento significativo de ERO a partir de las 12 hrs de tratamiento con K5 o ST respecto a su control correspondiente.

En secuencia lógica y dados los resultados obtenidos bajo estas condiciones, utilizamos tres antioxidantes para reducir los niveles de ERO (Figura 11) y correlacionamos su efecto con la viabilidad celular (Figura 12). Para este fin, se administraron los antioxidantes 30 minutos antes del estímulo pro-oxidante (K5 o ST) y éstos continuaron en el medio hasta que se hizo la evaluación de la viabilidad y de la producción de la ión superóxido por DHE. Los antioxidantes utilizados para estos experimentos fueron:

- a) Mn(III)TMPyP (100 μ M), una porfirina de manganeso que posee actividad de reductasa de peroxinitrito y de superóxido dismutasa (SOD).
- b) NAC, 5 m M, a gente que mantiene el reservorio de cisteína y que sirve como precursor del GSH. Adicionalmente es te compuesto tiene cualidades de antioxidante dado su grupo tiol.
- c) EUK 134 (15 μ M), un complejo sintético de bajo peso molecular con actividad de SOD y catalasa.

Dentro de estos antioxidantes, el Mn(III)TMPyP fue el más eficiente en disminuir las ERO generadas por ambos estímulos pro-oxidantes (K5 y ST) (Figura 11). No obstante, la supervivencia de las células fue incluso menor a la obtenida al disminuir el GSH y poner los estímulos pro-oxidantes (Figura 12). Resultados similares fueron obtenidos en experimentos previos, al someter a las células a BSO y Mn(III)TMPyP sin estímulo pro-oxidante alguno (Figura 8).

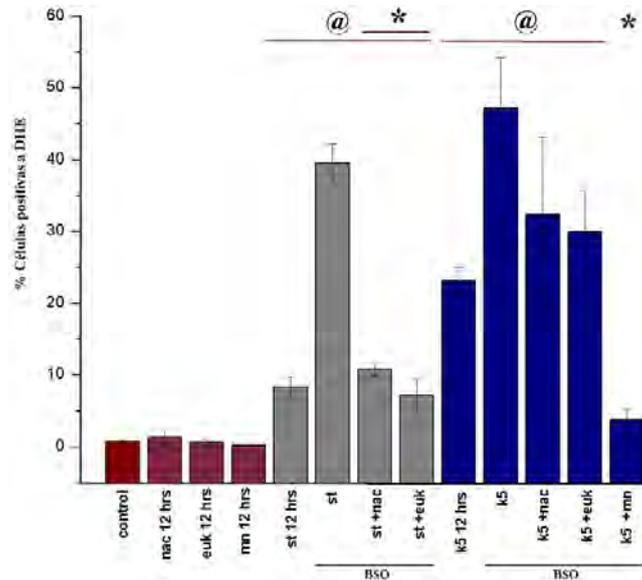


Figura 11. Reducción de ERO por medio de la administración de antioxidantes en N9GC previamente sometidas a BSO 200 μ M por 24 hrs y en forma posterior, al estímulo pro-oxidante durante 12 hrs. Los resultados denotan el porcentaje de células positivas a dihidroetidio respecto al total. Las barras representan el error estándar obtenido ($n \geq 3$). Los “*” indican diferencia significativa frente a su respectivo estímulo pro-oxidante. Todos los valores son significativos respecto al control. ANOVA de una vía, $p < 0.05$ vs. el respectivo estímulo pro-oxidante.

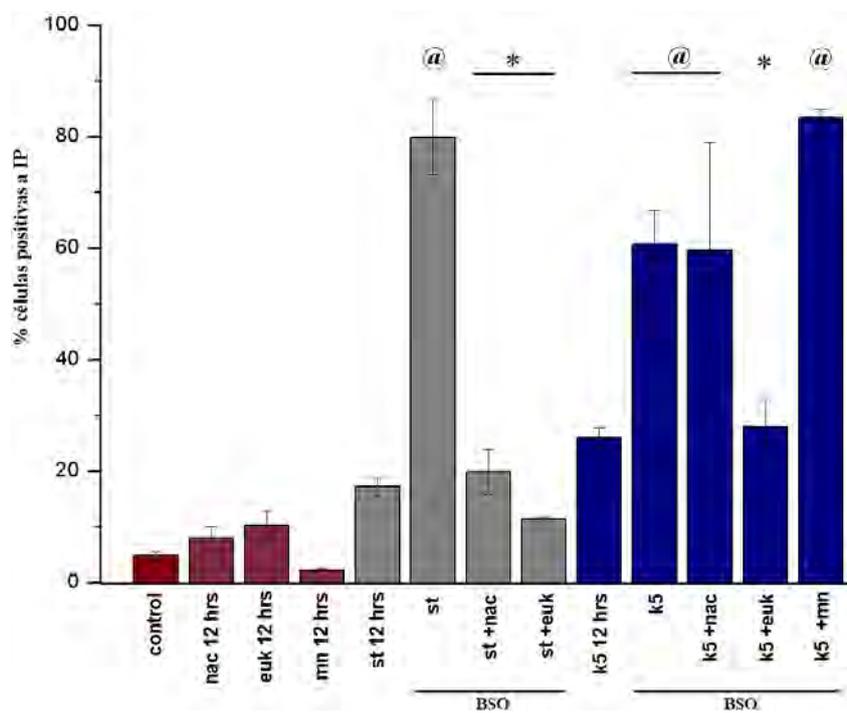
El EUK134, por su parte, evitó en forma eficiente el decremento en la viabilidad celular observado en las células tratadas con BSO por 24 hrs más los estímulos apoptóticos por 12 hrs (Figura 12). La cuantificación con DHE indicó que a diferencia del Mn(III)TMPyP, el EUK 134 no es capaz de reducir en forma significativa la generación de $O_2^{\cdot-}$ en las células tratadas con K5, pero sí en las tratadas con ST (Figura 11), sugiriendo que la reducción del H_2O_2 mediado por el GSH es un proceso indispensable para la supervivencia celular.

Finalmente, y en forma no esperada, el NAC, un precursor del glutatión y por lo tanto un candidato importante para disminuir la generación de ERO (Figura 11), disminuyó significativamente la muerte inducida por ST, pero no por K5 (Figura 12).

De esta forma, los resultados obtenidos demuestran que la generación de ERO está directamente relacionada con la supervivencia neuronal y que dentro de ellas, el H_2O_2 y el $O_2^{\cdot-}$ juegan un papel importante en la muerte de NGC con niveles de GSH abatidos. Adicionalmente, podríamos especular que la supervivencia neuronal bajo estas condiciones depende en primer término, de la reducción del H_2O_2 , y en segunda instancia, de la reducción del $O_2^{\cdot-}$. De esta forma, la efectiva protección por el EUK 134, que tiene la capacidad de reducir ambas especies reactivas, disminuyó en forma efectiva la muerte celular inducida por la administración de K5, a un cuando el $O_2^{\cdot-}$ detectado por el DHE no se redujo en forma significativa, mientras que al utilizar al Mn(III)TMPyP, cuyas propiedades incluyen la reducción del $O_2^{\cdot-}$, se incrementó la muerte.

Lo anterior apoya la importancia del GSH (ya sea *per se* o por la glutatión peroxidasa) como una poderosa defensa frente al H_2O_2 y sugiere que al abatirse su expresión, hay un incremento en la concentración de peróxido de hidrógeno que conlleva a daños celulares. No obstante, los experimentos realizados no son una prueba directa de lo anterior y es necesario estudiar los niveles de H_2O_2 en neuronas cuyos niveles de GSH estén abatidos.

A



B

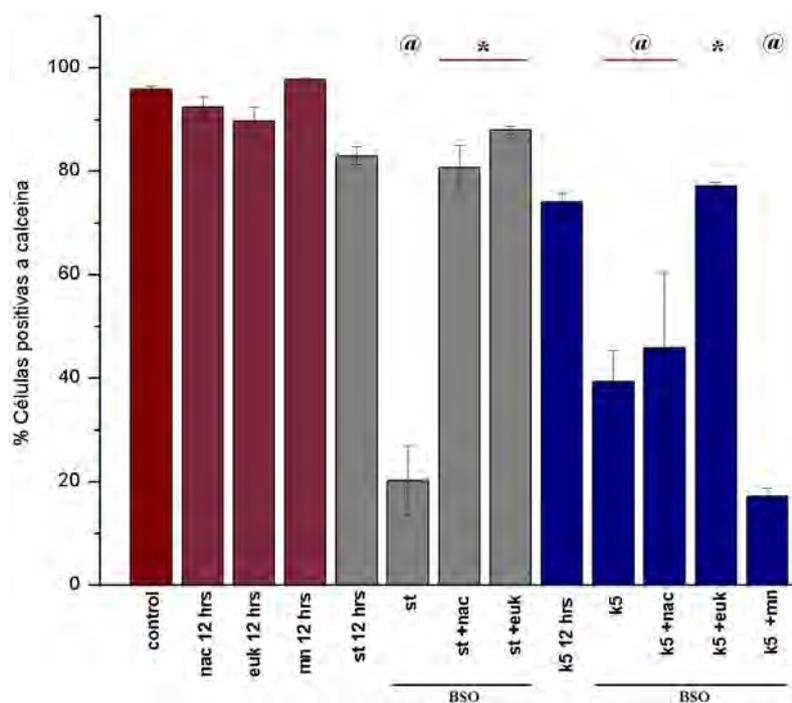


Figura 12. Efecto del tratamiento con distintos antioxidantes en NGC previamente sometidas a BSO 200 μ M por 24 hrs y un posterior estímulo pro-oxidante. La incorporación de yoduro de propidio (**A**) identifica neuronas muertas; la tinción con calceína (**B**), identifica neuronas vivas. Los resultados denotan el porcentaje de células positivas respecto al total. Las barras representan el error estándar obtenido ($n \geq 3$). Las “@” indican diferencia significativa entre el control y cualquier otra categoría. Las “*” indican diferencia significativa frente a su respectivo tratamiento pro-oxidante. ANOVA de una vía, $p < 0.05$ vs. el control ó estímulo pro-oxidante de cada categoría.

9.2 Rol del glutatión en el desarrollo del cerebelo de rata *in vivo*

Con el fin de disminuir los niveles de GSH *in vivo* para poder estudiar procesos de desarrollo, administramos BSO vía intraperitoneal (i.p.) diariamente a partir de los 2 DPN y hasta el día de sacrificio. Estudios previos indicaron que la administración de dosis diarias de 3 mmol disminuye en forma eficiente los niveles de GSH. No obstante, esta dosis genera una tasa de mortandad del 83% (Martenson et. al, 1991). Por otro lado, Jain et. al, (1991) administraron dosis diarias de 2 mmol de BSO, obteniendo una eficiencia similar en la disminución de GSH, pero con un 40% de tasa de mortandad. Debido a ello, nosotros intentamos disminuir el GSH sin generar una tasa de mortandad tan elevada, utilizando una inyección i.p. de 3 mmol por día ó una de 1.5 mmol. Las dosis utilizadas provocaron la muerte de un número muy bajo de ratas. Adicionalmente, en la mayoría de los casos, se generaron cataratas en los ojos de los roedores, un síntoma común de los niveles bajos de GSH (Williams 2006).

Los resultados obtenidos indican que la administración de ambas dosis de BSO son suficientes para disminuir los niveles de GSH en forma significativa en distintos tejidos (Tabla 1).

nm GSH total/g tejido	1.5mmol de BSO		
	cerebelo	corteza	hígado
	26.32 ± 5.38	35.21 ± 7.64	26.65 ± 5.18
nm GSH total/g tejido	3mmol de BSO		
	cerebelo	corteza	hígado
	15.71 ± 1.41	27.47 ± 2.73	19.77 ± 0.91

Tabla 1. Efecto del BSO 1.5 mmol/kg de rata y 3 mmol/kg de rata, sobre los niveles de GSH total en ratas de 8 DPN. Los resultados se expresan como el porcentaje respecto al control. ± indica el error estándar de 4 experimentos independientes. Todos los valores fueron significativos respecto al control. ANOVA de una vía, $p < 0.05$ vs. control.

Dado que los estudios *in vitro* demostraron que un decremento por debajo del 50% en los niveles de GSH es capaz de inducir un proceso de muerte y que los niveles obtenidos en cerebelo por la administración i.p. de 3 mmol de BSO en forma diaria

disminuyeron un 85.3%; intentamos estudiar cambios en procesos del desarrollo como la proliferación, migración y muerte apoptótica en el cerebelo de rata.

Los resultados presentados en las siguientes secciones son de carácter cualitativo y preliminar. El análisis cuantitativo y a detalle está en desarrollo.

9.2.1. Repercusión de la carencia del glutatión en la morfología del cerebelo

Dado que las ERO han de mostrar regular procesos de proliferación, diferenciación y muerte (Covarrubias et al., 2008, Hernández-García et al., 2010) estudiamos si la disminución de los niveles de GSH genera cambios en el patrón de estos eventos de desarrollo. Para saber si lo anterior ocurre, obtuvimos información a partir de cortes sagitales del vermis del cerebelo de ratas de distinta edad. Las edades escogidas fueron días en los que los procesos anteriores ocurren en mayor proporción.

De esta forma, el estudio de ratas de 8 DPN se utilizó para obtener información de células en proliferación, las ratas de 12 DPN dieron información relacionada a la migración neuronal, las ratas de 16 DPN permitieron ver cambios en la activación de caspasa-3 y por lo tanto una probable activación de la ruta apoptótica y finalmente el análisis de ratas de 22 DPN brindó información sobre el estado del cerebelo de ratas adultas jóvenes.

Inicialmente, estudiamos si la carencia de GSH generaba errores visibles a nivel histológico y posteriormente intentamos profundizar en ellos analizando los procesos de desarrollo antes mencionados utilizando un acercamiento inmunohistoquímico. Para ello, se utilizó al BrdU como marcador de proliferación y migración, y un anticuerpo contra caspasa-3 activa como marcador de apoptosis.

A nivel histológico, los resultados obtenidos indican que tanto en las ratas control, como en las ratas tratadas, existe una tendencia a presentar errores en las folias V, VI y en menor instancia en las folias VIII y IX (Figura 13). No obstante, la frecuencia, número de errores y magnitud parece incrementar en las ratas tratadas con BSO (Tabla 2). De esta forma, las ratas control presentan en forma esporádica, pequeños errores en las folias V y VI, mientras que las ratas tratadas con BSO tienen un

donde los errores ocurrieron principalmente en los sitios de fusión de la capa granular externa, las alteraciones observadas a estas edades fueron más generalizadas, ocurriendo tanto en sitios de fusión como en sitios donde no ocurrió tal evento. A continuación detallamos los errores observados en las distintas capas de las ratas tratadas con BSO a estos días.

% de alteración			
Condición			
Día postnatal	Folia	Control	BSO
8	V y VI	40	62.5
	VIII y XIX	10	12.5
12	V y VI	36.8	92.8
	VIII y XIX	10.5	42.8
16	V y VI	30.76	66.66
	VIII y XIX	7.69	11.11
22	V y VI	33.33	55.5
	VIII y XIX	25	44.4

Tabla 2. Índice de alteración generado por el tratamiento de BSO. El BSO incrementa la tasa de malformación observada en los cortes de rata de distintas edades. Los porcentajes refieren a la proporción de individuos que presentaron alguna alteración visible a nivel morfológico en relación al total de la población de una condición dada (del control o de las ratas tratadas; $n \geq 8$).

La capa granular externa presentó grandes discontinuidades, llegando a estar prácticamente ausente en algunas zonas (Figura 14, BSO 8, 12 y 16 DPN). Las células presentes en esta capa comúnmente tienen una orientación aberrante cuando otras capas se encuentran distorsionadas, fusionadas o interrumpidas. En algunos casos se observaron cúmulos de neuronas de la capa granular externa inmersas en la capa molecular e incluso zonas enteras de la capa granular externa rodeadas por capa molecular. En estas islas, la orientación de todas las células es aberrante.

En relación a la capa molecular, se observaron muchas anomalías en relación a su continuidad y grosor. Varias zonas de esta capa fueron muy anchas o muy delgadas y en ocasiones se pudieron observar porciones de capa molecular totalmente aisladas (Figura 13 y 14, BSO 12, 16 y 22 DPN). En forma adicional, dentro de esta capa pudimos observar CGNs migrando en forma aberrante (Figura 14, BSO 22 DPN).

Por su parte, la capa de células de Purkinje presentó interrupciones a lo largo de su monocapa y en ocasiones posición fue aberrante; estando estas inmersas en la orilla

de la capa molecular (Figura 14, BSO 12, 16 y 22 DPN). Adicionalmente, pudimos observar que a algunos de los somas de estas células se orientan en forma diagonal en relación al resto de las células con el mismo fenotipo y por lo tanto sugiere que sus arborizaciones se cruzan en algún punto. En algunos casos, las imágenes permitieron observar que las sínsilas de CGNs están conectadas con los árboles dendríticos de las células de Purkinje en una forma aberrante.

Finalmente, la capa granular interna presentó zonas que invadieron a la capa molecular, ya sea únicamente en los bordes (Figura 14, BSO 16 DPN) o en su totalidad, uniéndose así a la capa granular interna con la externa o a la capa granular externa consigo misma (Figura 14, BSO 12 DPN).

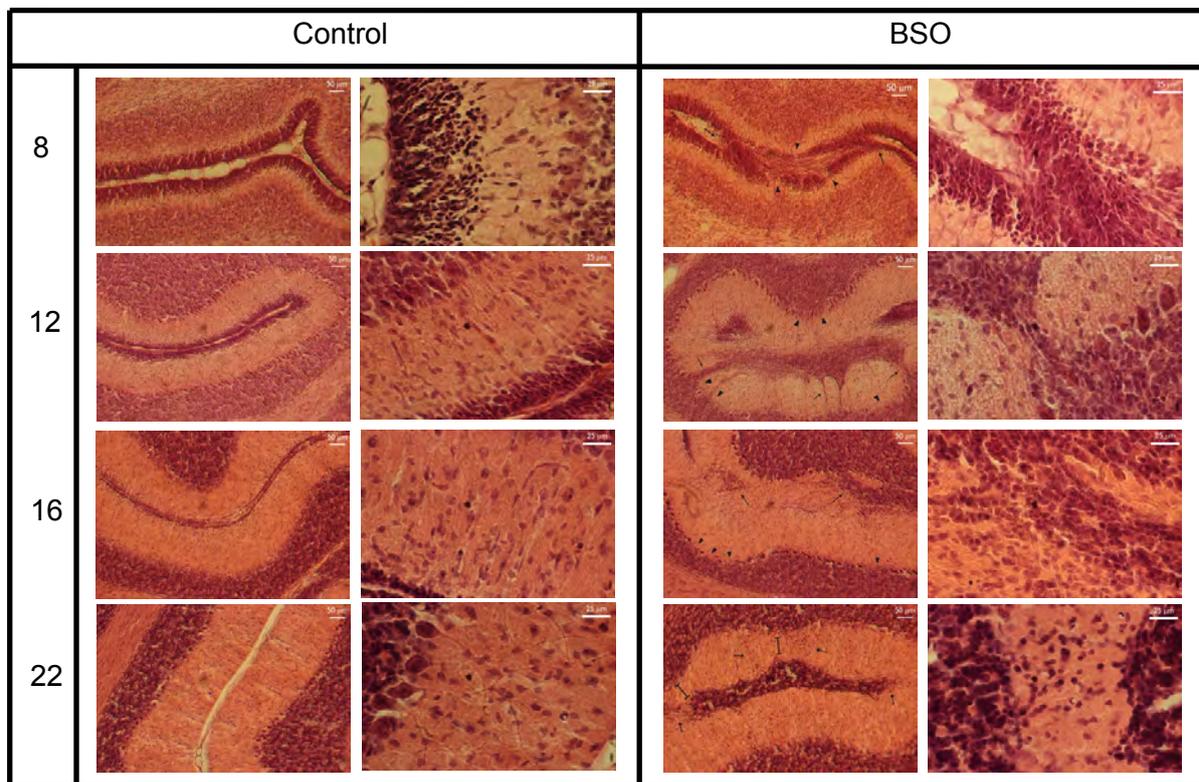


Figura 14. Magnificaciones de cortes sagitales de cerebelo a nivel de las folias V y VI de ratas inyectadas con solución salina o con BSO y sacrificadas a distintos DPN. Las folias de los animales tratados presentan fusiones entre las distintas capas, así como alteraciones en su patrón y continuidad. Las flechas indican la invasión de células de una capa en otra, las cabezas de flecha indican la ausencia de una capa de células y las líneas indican un grosor anormal de una capa dada. Los DPN se indican en la columna izquierda.

Es importante mencionar que todos estos errores no ocurren a lo largo de todo el cerebelo. Al analizar las series de cortes sagitales obtenidos de los cerebelos, observamos que estos se concentran a nivel del vermis y tienden a desaparecer en los hemisferios. Por lo tanto, pueden existir secciones, ya sean cortas o largas, con pedazos que presenten alteraciones que tienden a desaparecer en forma lateral.

9.2.2. Los bajos niveles de GSH inducen alteraciones en la migración y muerte neuronal del cerebelo

Posterior al análisis histológico decidimos profundizar sobre los errores observados entre las folias V y VI. Para ello decidimos evaluar las alteraciones observadas a nivel histológico en relación a la migración de las CGN utilizando el marcaje con BrdU, así como la susceptibilidad a la muerte de las CGN encontrada en los estudios *in vitro*, utilizando un anticuerpo contra caspasa-3 activa. El análisis de los cortes de rata de 12 DPN tratada con BSO muestra un menor número de neuronas marcadas con BrdU, así como una menor fluorescencia en relación a la de las ratas control (Figura 15).

En cuanto a la caspasa-3 activa, los cortes de las ratas de 16 DPN mostraron una población de células positivas cuya distribución se concentró principalmente a lo largo del borde de la capa granular interna y de la capa de células de Purkinje. Las células positivas presentaron una fluorescencia notoriamente mayor en los cortes de las ratas tratadas con BSO y su número fue mayor en relación al control (Figura 16).

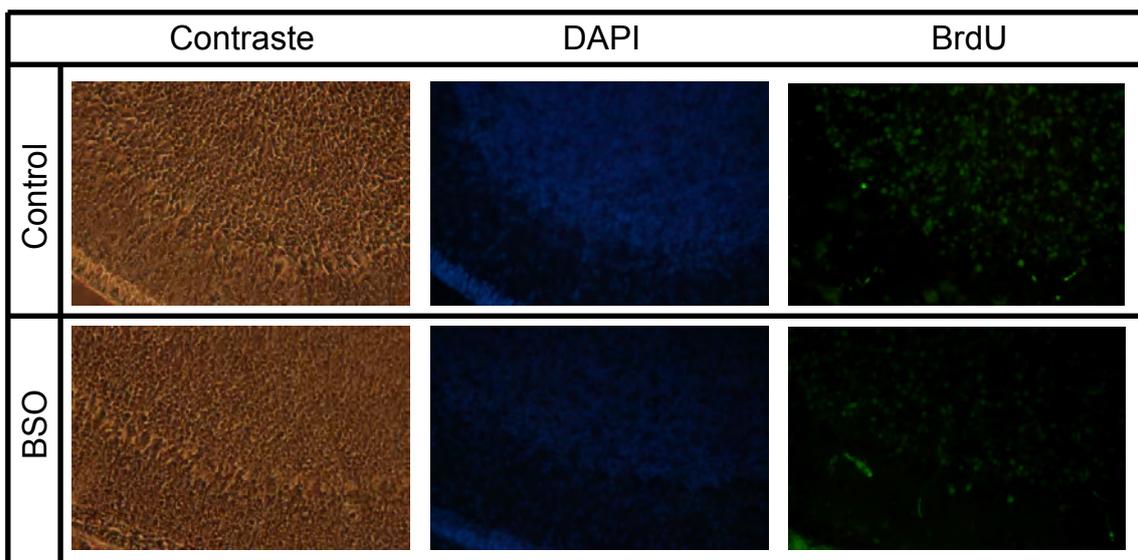
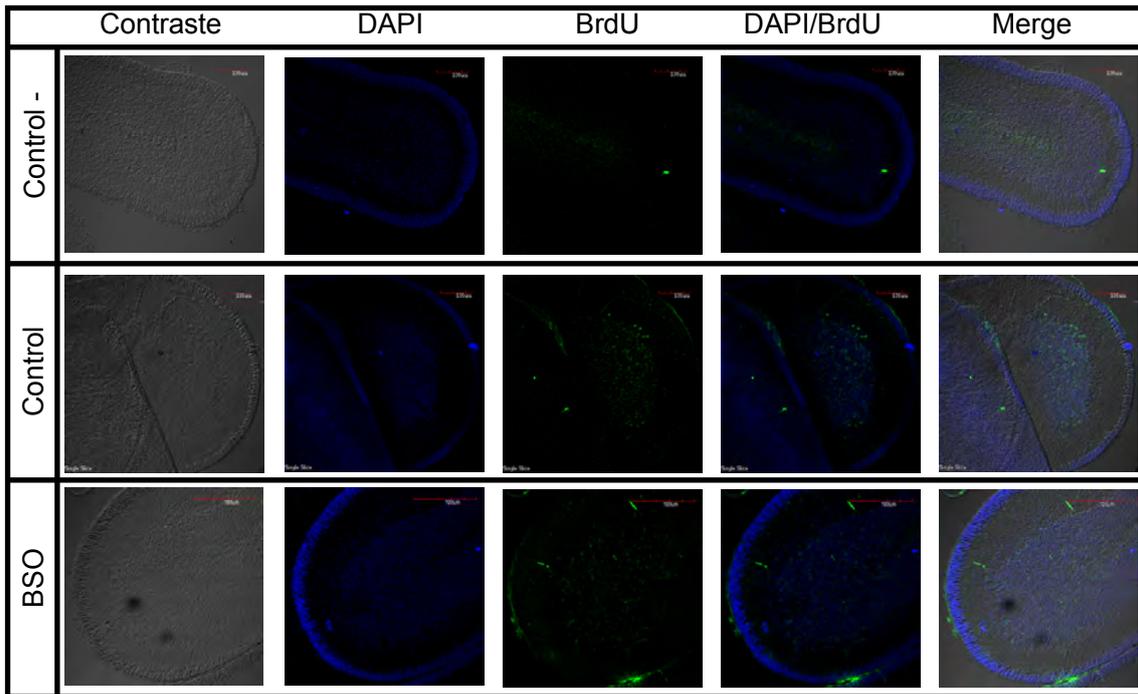


Figura 15. Imágenes representativas tomadas del ápice de la folia 6 de ratas de 12 DPN, a nivel del vermis del cerebelo. Las ratas tratadas con BSO presentan una menor marca, así como un menor número de células positivas a BrdU. La distribución de esta marca se localiza en toda la capa granular interna. Con el fin de hacer más evidentes las diferencias, se incluyen imágenes obtenidas por microscopía confocal (panel superior), así como imágenes adquiridas con microscopía de epifluorescencia (panel inferior).

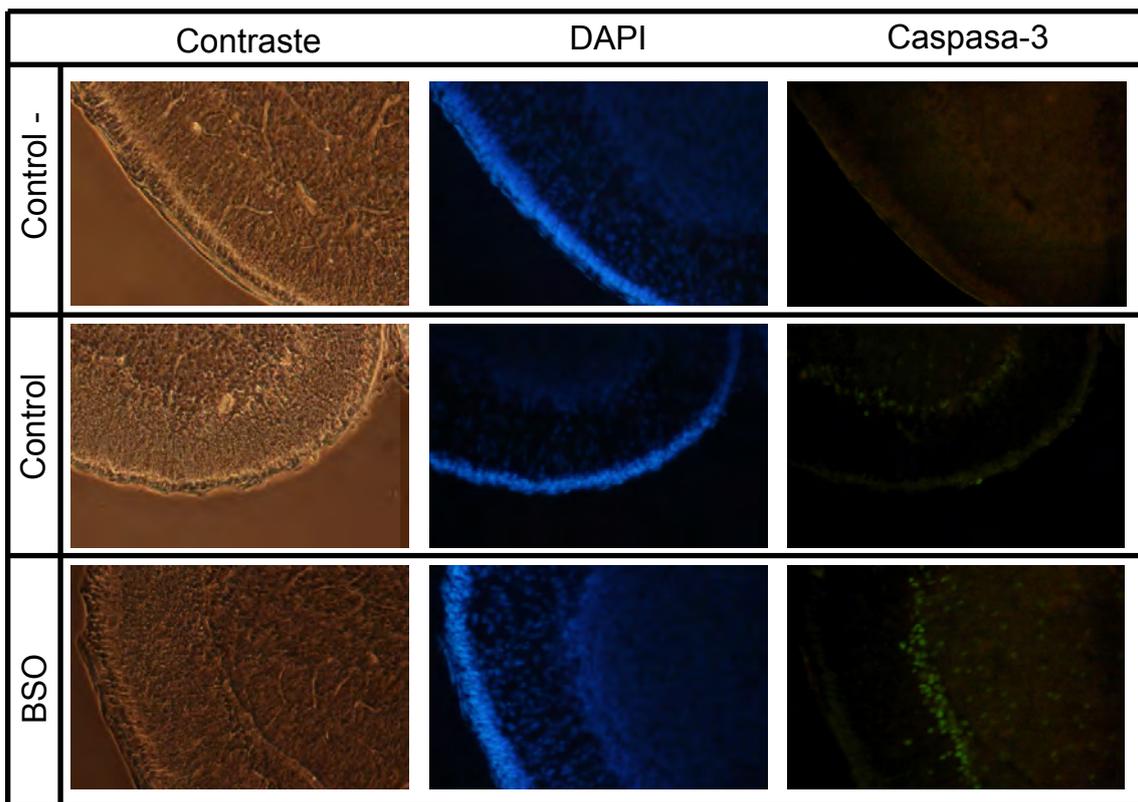
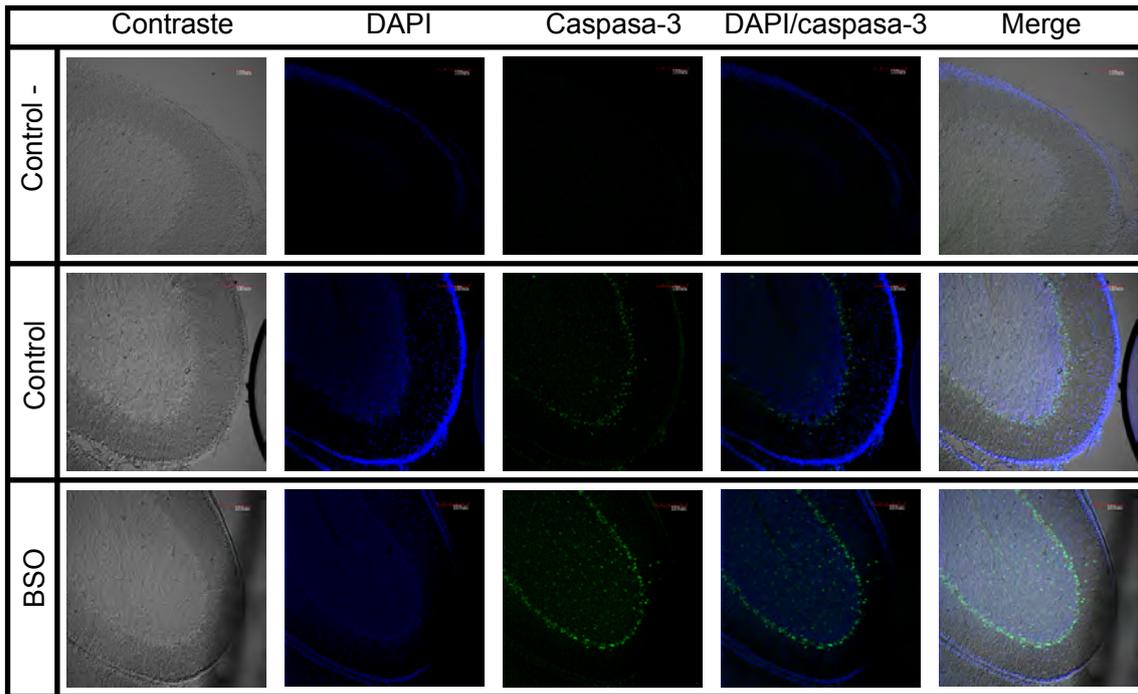


Figura 16. Imágenes representativas tomadas del ápice de la folia 6 de ratas de 16 DPN, a nivel del vermis del cerebelo. Las ratas tratadas con BSO presentan una mayor marca, así como un mayor número de células positivas a caspasa-3 activa. Nótese la distribución de la marca en una fina línea localizada en el borde de la capa granular interna, así como algunas neuronas positivas en el interior de la misma. Con el fin de hacer más evidentes las diferencias, se incluyen imágenes obtenidas por microscopía confocal (panel superior), así como imágenes adquiridas con microscopía de epifluorescencia (panel inferior).

9.2.3. Repercusión de las alteraciones observadas en el cerebelo por la disminución en los niveles de GSH sobre el equilibrio de las ratas

El cerebelo es la estructura que controla la agudeza y coordinación de los movimientos, así como el balance. Por lo tanto, el incremento en el número y magnitud de errores presentes observado por el tratamiento con BSO debería repercutir en forma directa en alguna de estas tareas. Debido a ello, decidimos evaluar el equilibrio de las ratas tratadas con BSO utilizando la prueba de la barra de equilibrio (Beam walking) (Carter et al, 2001). Para ello, se hizo caminar a las ratas por 2 barras de distinto diámetro. Una cuadrada de 12 mm de diámetro (menor dificultad) y una cilíndrica de 11 mm de diámetro (mayor dificultad). Los resultados de la primera barra se ilustran en la figura 17 e indican que las ratas tratadas con BSO requieren de un tiempo mayor para poder atravesar por completo la barra de equilibrio, y que en el transcurso de esta tarea, se resbalan con mayor frecuencia hacia el lado derecho, pero no hacia el lado izquierdo, que las ratas tratadas con solución salina.

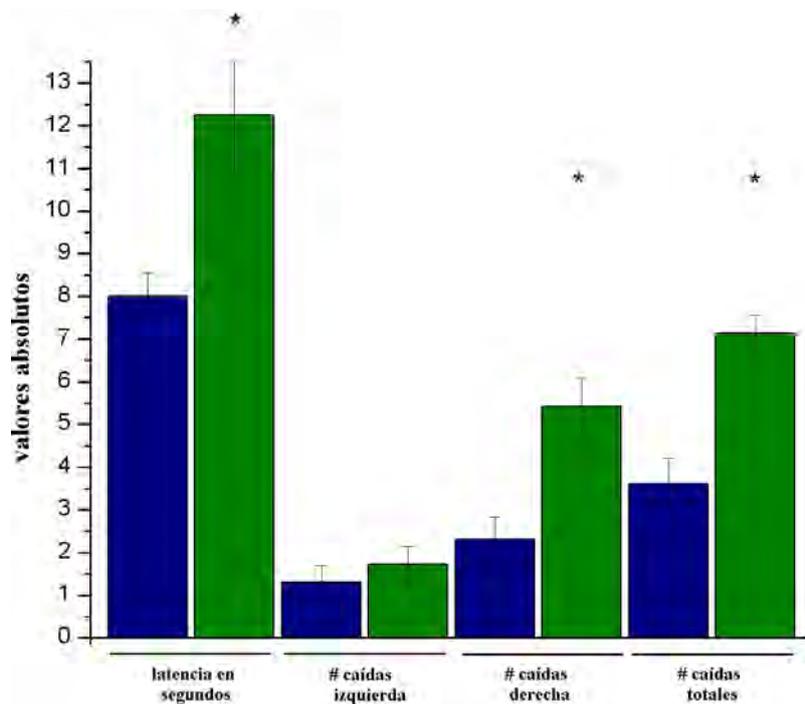


Figura 17. Prueba de equilibrio en ratas tratadas con BSO (verde) y solución salina fisiológica (morado). Los resultados denotan los segundos promedio que las ratas tardaron en completar la prueba, así como el número de veces que estas resbalaron hacia el lado derecho o izquierdo. Las barras representan el error estándar obtenido (n=6 por cada categoría). T de student $p < 0.05$ vs. el control de cada categoría.

En algunos casos, tanto las ratas tratadas con BSO, como las ratas control, se impulsaron únicamente con las patas delanteras, mientras que la parte trasera se fue deslizando por la barra. No obstante, la latencia y frecuencia de esto fue mayor en las ratas tratadas que en las ratas control. Lamentablemente, estos experimentos no fueron contundentes debido a que la repetición de los mismos no generó datos representativos.

En relación a la segunda barra, únicamente el 50% de las ratas control fue capaz de terminar la prueba en forma satisfactoria. En este caso la latencia promedio fue de 10 segundos y las caídas no se cuantificaron, ya que en la mayoría de las ocasiones, las ratas deslizaron su parte trasera durante toda la prueba. Ninguna de las ratas tratadas con BSO fue capaz de completar la prueba.

10. DISCUSIÓN

El glutatión ha demostrado ser partícipe de distintos eventos celulares, ya sea en una forma indirecta, vía la regulación de una amplia gama de ERO, o *per se* al interaccionar con proteínas vía la S-glutathionilación. De esta forma existen varias opciones de cómo puede participar o regular los procesos en los que se le ha atribuido algún rol. Dado que en el sistema nervioso, este antioxidante es el más prominente en la regulación de ERO, resulta importante estudiar el papel que juega en algunos aspectos del desarrollo del sistema nervioso.

Este proyecto tuvo como finalidad estudiar el rol del GSH en el desarrollo del sistema nervioso, tomando como modelo al cerebelo y las NGC. Los resultados obtenidos se enfocaron principalmente en la muerte neuronal *in vitro*, y en segunda instancia y en forma preliminar, en aspectos de proliferación y migración *in vivo*.

10.1. Efecto de la disminución del GSH en la generación de ERO y su repercusión en la viabilidad celular

La cantidad de ERO presente en una célula es regulada por su tasa de síntesis y degradación. Asimismo, esta última es regulada por la concentración celular de antioxidantes específicos a esa especie reactiva. En estos experimentos, la disminución en los niveles de GSH indujo un incremento en las ERO en una forma inversamente proporcional. No obstante, al analizar los resultados en forma de gráficas, se puede observar un desfase entre estos dos elementos, siendo primero la disminución del GSH y en segunda instancia el incremento en las ERO.

De esta forma, a las 12 hrs de tratamiento se observan disminuciones importantes de GSH, pero sólo ligeros incrementos en las ERO que se vuelven significativos hasta las 36 hrs. Esto indica que en forma basal y en ausencia de estímulos que incrementen a las ERO, la disminución en los niveles de GSH *per se* facilita un lento incremento de ERO.

Por otro lado, el no haber obtenido diferencias en los niveles de GSH al utilizar distintas concentraciones de BSO, pero sí una tendencia en el incremento de ERO,

sugiere un posible efecto de toxicidad por parte del BSO y por lo tanto contradice estudios que indican que es posible utilizar concentraciones elevadas de este fármaco sin obtener efectos tóxicos importantes (Watababe et al, 2003).

Al relacionar los niveles de ERO con la viabilidad celular, se ve que los niveles de ERO no incrementan en forma importante a tiempos cortos (4-24 hrs), y que en la misma forma, la viabilidad celular tampoco disminuye en forma importante. A tiempos largos (36 hrs), los niveles de ERO presentan un incremento pero la muerte celular no lo hace sino hasta las 48 hrs de tratamiento con BSO; tiempo en el cual, las células se encuentran totalmente muertas.

Esto indica que las concentraciones elevadas de ERO registradas por el DHE ejercen un efecto en el deterioro de la viabilidad celular observado tiempo después probablemente por la activación de elementos que activan la cascada apoptótica. Un ejemplo de esto es la oxidación de grupos sulfhidrilo específicos capaces de promover la inducción del poro de transición (Kowaltowski et al, 2001). Por lo tanto, la relación entre el GSH-ERO-viabilidad es una escalera en la que debe ocurrir un evento primero, para que tiempo después ocurra el siguiente.

Alternativamente, es probable que otros elementos estén jugando parte en este efecto. Por ejemplo, se ha reportado que el estado redox del GSH puede afectar la transcripción de algunos genes. Dentro de estos casos, la transcripción de NFκB y de genes relacionados con su activación ha demostrado ser susceptible a este tipo de regulación (Faruqi R M. et al, 1997, Fratelli M. et al, 2005). Importantemente, la carencia de dicho factor de transcripción está relacionado con la inducción de la apoptosis de CGNs, sugiriendo que su presencia es necesaria para la supervivencia de las CGNs (Piccioli et al, 2001).

En forma adicional, en cultivos de CGNs se ha comprobado que la pérdida del GSH mitocondrial produce un incremento en las ERO en tan solo 2 horas y que éste va seguido de una muerte con cualidades necróticas aproximadamente 4-8 horas después (Wüllner et al, 1999). Respuestas similares se han encontrado en otros tipos celulares y han demostrado que el GSH mitocondrial está asociado a la preservación de la viabilidad celular y el abatir sus niveles genera una mayor disfunción y pérdida de la

viabilidad celular en células sometidas a una variedad de fuentes de estrés oxidante (Meredith y Reed, 1982; Colell et al, 1998, 2001). En forma especulativa, esto puede indicar que el tratamiento con BSO disminuye los niveles de GSH citoplasmático, reduciendo en forma paulatina los niveles de GSH presente en los organelos. Este efecto puede dar como resultado un incremento en las ERO que daña a varios elementos de la mitocondria como su ADN u otros elementos presentes en este organelo como el complejo I mitocondrial (Jha et al, 2000).

10.2. La carencia de GSH facilita la acumulación de ERO e induce la muerte neuronal

Los estímulos pro-oxidantes K5 y ST han sido caracterizados en forma previa y su mecanismo de acción se conoce relativamente bien. Ambos estímulos inducen la apoptosis en cultivos de CGNs debido a una elevación en las ERO que parece preceder este tipo de muerte (Morán et al., 1999; Valencia y Morán, 2001; Bobba et al, 2008; Prehn et al, 1997; Deshmukh y Johnson, 2000). La generación de estas ERO, tienen un patrón bien definido y es dependiente de los distintos homólogos de la NADPH oxidasa (NOX). En el caso del K5, se sabe que la producción de ERO es independiente de la NOX2 (Gomez-Gamboa y Morán, 2009) y que su incremento más importante ocurre a las 4.5 hrs de tratamiento. En el caso de la ST, las ERO presentan un fuerte incremento a las 6 hrs (Coyoy et al, 2008; Valencia y Morán, 2001) y un segundo pico a las 24 hrs (Figura 10, ver controles), los cuales parecen ser dependientes de la actividad de la NOX2. Posteriormente a este incremento, los niveles de ERO presentan un decremento (Figura 10, ver controles) probablemente asociado a la disminución en la actividad de la NADPH oxidasa (Coyoy et al, 2008), de la lipoxigenasa (Bobba et al, 2008) y a un probable incremento en la expresión de algunos antioxidantes (Valencia y Morán et al, datos no publicados). En contraste, si bajo estas condiciones se disminuyen en forma previa los niveles de GSH, el patrón se pierde y los niveles de ERO no presentan decremento alguno, sino un incremento lineal que llega a su pico más elevado al cabo de las 12 horas de tratamiento con ambos estímulos pro-oxidantes. Esta elevación en la concentración de ERO repercute en forma paralela sobre la viabilidad celular, induciendo la muerte neuronal en tiempos cortos (4.5 hrs – 12 hrs).

Una hipótesis factible formulada a partir de lo anterior, pero que tendrá que ser validada, es que al someter a las NGC a los estímulos pro-oxidantes utilizados, el GSH presenta un aumento en su expresión que apoya a la disminución en los niveles de ERO observados después de los picos de ERO. En este caso, lo anterior no ocurre debido al tratamiento con BSO, y en esta forma, se observa un incremento lineal en los niveles de ERO y muerte celular.

Resultados previos indican que el uso de antioxidantes protege de la muerte apoptótica inducida por K5 y ST en neuronas (Valencia y Morán, 2001; Pong K et al, 2001; Prehn et al, 1997). De esta forma, el GSH debe a mortiguar los efectos pro-oxidantes del K5 y ST, evitando la activación de caspasas, la translocación de la fosfatidil serina y la condensación de la cromatina; mientras que su ausencia produce el incremento observado en los niveles de ERO que adelanta la muerte neuronal por varias horas.

Anteriormente, nuestro laboratorio realizó experimentos de esta índole (Valencia A. y Morán J., 2001), añadiendo 5-10 mM de GSH en paralelo al cambio de las NGC a K5, encontrando únicamente protección marginal. No obstante ésta no es una evidencia que descarte la hipótesis anterior, ya que la célula no posee transportadores que ingresen este tiol. El GSH añadido en esta forma, debe ser transformado a los aminoácidos que lo conforman para que estos puedan ingresar a la célula y aportar así, a la síntesis del GSH (Dringen, 2000; Dickinson y Forman, 2002), o en forma alternativa, estar esterificado.

Por otro lado, el análisis cualitativo de la cantidad de fluorescencia obtenida indicó que la mayor señal se encuentra a menor tiempo de exposición a K5 o ST (4.5 hrs, 6 hrs y 12 hrs) y que en forma posterior disminuye en forma gradual y continua llegando a ser mínima a las 24 hrs. En forma paralela pero inversamente proporcional, se observó la disminución gradual y continua de la viabilidad celular, la cual llegó a su mínimo a las 24 horas de tratamiento, indicando que las ERO están directamente relacionadas con la disminución observada en la viabilidad celular.

En conjunto, estos resultados indican que la disminución del GSH *per se* genera un incremento en las ERO, pero no una muerte significativa. No obstante, si bajo estas condiciones las células presentan un incremento importante de ERO, se produce un a

disminución muy importante en la viabilidad celular. Por lo tanto, el GSH actúa como una barrera frente a las ERO generadas bajo un estímulo pro-oxidante que evita la muerte apoptótica.

10.3. El rol del GSH en la muerte de las CGNs radica en evitar la acumulación de H_2O_2

Los resultados anteriores comprobaron que la disminución de los niveles de GSH potencia la acumulación de ERO y que esto correlaciona con la muerte neuronal. No obstante, obtener una comprobación de este efecto es primordial para poder asegurar que las ERO observadas y no el GSH *per se* son responsables de regular la muerte neuronal.

Debido a lo anterior, escogimos en forma cuidadosa tres antioxidantes. Uno con la capacidad de eliminar al $O_2^{\cdot-}$ (Mn(III)TMPyP), que es una de las dos principales ERO formadas por el metabolismo, otro que tuviera la capacidad de contener contra esta misma ERO pero también con el H_2O_2 (EUK 134), la segunda ERO principalmente generada por el metabolismo y finalmente un compuesto antioxidante y precursor del GSH (NAC).

En estos experimentos se analizó si el uso de los antioxidantes es capaz de revertir los efectos en la viabilidad y producción de ERO obtenidos por el tratamiento con K5 o ST en células cuyo GSH ha sido disminuido en forma previa. Los resultados obtenidos fueron variados y sirvieron para inferir y sugerir lo que puede estar haciendo el GSH para limitar el efecto de estímulos pro-oxidantes como el K5 y ST.

El primer antioxidante a discutir es el Mn(III)TMPyP. Este antioxidante disminuyó las ERO producidas por el K5 y ST (datos preliminares no mostrados), pero esto en vez de disminuir la muerte, la potenció en forma importante. En contraste, estudios previos demostraron que la adición de la forma citoplasmática Cu/Zn SOD y mitocondrial Mn SOD protegen muy eficientemente de la muerte celular inducida por K5 (Valencia y Morán, 2001) y ST (Prehn et al, 1997) e inhiben la activación de la caspasa 3 (Valencia y Morán 2004). Esto sugiere que el tratamiento con BSO puede ser responsable de este efecto.

Una forma factible de interpretar este resultado, es que el Mn(III)TMPyP disminuye en forma eficiente la concentración de $O_2^{\cdot -}$, produciendo H_2O_2 que normalmente debería ser reducido por el GSH/GSHPx a H_2O . Dado que los niveles del GSH están disminuidos por el tratamiento con BSO, el H_2O_2 tiende a incrementar su concentración y su descomposición vía la reacción de Fenton, incrementa a su vez la producción de OH^{\cdot} , una molécula mucho más dañina para la célula. En forma adicional, el H_2O_2 y el $O_2^{\cdot -}$ pueden interactuar con el NO para generar aniones citotóxicos como el peroxinitrito ($ONOO^-$). Este último puede reaccionar con el dióxido de carbono, provocando daño proteínico vía la formación de nitrotirosinas y la oxidación de lípidos. Una alternativa menos probable y no estudiada es que el BSO pueda estar interactuando con el Mn(III)TMPyP, generando un complejo tóxico para la célula.

Cabe mencionar que el DHE principalmente detecta el $O_2^{\cdot -}$, y en forma secundaria, cuando hay presencia de iones metálicos de transición o de actividad de peroxidasa, especies como el H_2O_2 (Hernández-García et al. 2010). Ya que el Mn(III)TMPyP dismuta a la especie principalmente detectada y que el H_2O_2 generado no es detectado en forma eficiente por este método, se puede sugerir que los niveles de ERO observados por este tratamiento fueron sumamente bajos debido al método utilizado. Una opción más factible es que simplemente las neuronas analizadas estaban muertas y por lo tanto, metabólicamente inactivas. Esta opción indica que la muerte ocurrió horas antes del análisis con la DHE.

Cualquiera que sea la opción, se demuestra que el H_2O_2 participa en la muerte de las NGC bajo estas condiciones. En forma consistente, estudios previos demostraron que al someter a las NGC a H_2O_2 se induce la muerte en forma acelerada. La muerte detectada en estos experimentos, no presenta parámetros de muerte apoptótica como la condensación y fragmentación nuclear, ni la activación de caspasas, sugiriendo una muerte necrótica (Valencia y Morán, 2001, 2004). Lo anterior sugiere que los resultados observados con el tratamiento con BSO y Mn(III)TMPyP ocurren por la acumulación de esta ERO. En esta forma, un aumento en la producción de H_2O_2 puede generar efectos aun más dañinos en células que no tengan GSH para contender con éste.

La hipótesis anterior se ve apoyada en parte, por los resultados obtenidos con EUK 134 (Figura 11), el cual puede reducir tanto al $O_2^{\cdot-}$ como al H_2O_2 . En este caso, la administración previa de este antioxidante no fue capaz de reducir en forma significativa la generación de $O_2^{\cdot-}$ en las células tratadas con K5, pero sí en las tratadas con ST. No obstante, en ambos casos, se recuperó el decremento en la viabilidad celular.

De esta forma, si tomamos en cuenta que los análogos de la SOD y EUK 134 han probado ser útiles en contrarrestar los efectos inducidos por la ST y K5 en neuronas cuyos niveles de GSH son normales (Resultados del laboratorio; Pong et al. 2001; Prehn et al, 1997 Valencia y Morán, 2001, 2004), pero sólo el EUK 134 es capaz de hacerlo cuando los niveles de GSH son abatidos, podemos concluir que el medio por el cual este tiol contiene contra estos estímulos radica principalmente, en su capacidad de reducir el H_2O_2 .

Finalmente, el tercer antioxidante a discutir es el NAC, el cual ha sido utilizado en forma rutinaria en estudios donde los niveles de GSH se encuentran comprometidos y el cual funciona como precursor del glutatión. Debido a lo anterior, este antioxidante era un candidato importante para disminuir la generación de ERO en las NGC tratadas con BSO. En forma interesante, este tratamiento únicamente fue capaz de recuperar la alterada viabilidad celular inducida por el ST, pero no por el K5. Anteriormente, se estudió la protección del NAC frente al K5 (Valencia y Morán 2001) y ST (Prehn et al, 1997) y se encontraron los mismos resultados. No obstante, en estos últimos experimentos los niveles de GSH no fueron disminuidos y la viabilidad celular se vio afectada en una magnitud mucho menor.

Estos resultados apoyan la importancia del GSH como antioxidante y en forma interesante, indican que las diferencias observadas entre ambos estímulos pro-apoptóticos, se deben al antioxidante utilizado y no al GSH. De esta forma, la capacidad del NAC de disminuir la cantidad de $O_2^{\cdot-}$ presente en las células tratadas con ST repercute en forma directa sobre la recuperación de la viabilidad celular; mientras que su restringida capacidad de hacerlo en neuronas tratadas con K5, produce una restricción similar en su supervivencia.

En forma previa, se han reportado diferencias en los mecanismos de muerte generados por el K5 y la ST en neuronas. Algunos ejemplos son:

- a) La producción de ERO por parte de la ST parece ser dependiente del homólogo de la NADPH oxidasa 2 (NOX2), mientras que el de K5 parece ser independiente de ella y requiere de otros miembros de la familia NOX (Gomez-Gamboa y Morán, 2009).
- b) Bajo estos dos estímulos apoptóticos, las CGN disminuyen su volumen celular por mecanismos distintos. En el caso de K5 es dependiente de iones K^+ y Cl^- , mientras que el de la ST únicamente es dependiente de Cl^- (Hernández-Enríquez et al, 2010).
- c) La ruta de señalización de estos estímulos pro-oxidantes es distinta. La apoptosis inducida por K5 parece ser dependiente de JNK y mediada por ERO, mientras que el incremento en ERO mediado por ST no activa dicha ruta (Ramiro-Cortés y Morán, 2009).
- d) Los cambios morfológicos en la muerte mediada por estos estímulos son distintos. La muerte neuronal inducida por K5 a 12 hrs presenta la pérdida del soma, pero presencia de procesos neuríticos; mientras que la muerte mediada por ST 500 nM presenta el fenotipo opuesto (Ortega y Morán, 2011).

Este último punto nos llevó a analizar la morfología de los cultivos y, en la mayoría de los casos, observamos resultados similares. Adicionalmente, en la mayoría, mas no en todos los cultivos tratados con los antioxidantes (EUK 134 en el caso de K5 y ST; NAC únicamente en el caso de ST) se revertieron los efectos, sugiriendo que estas diferencias pueden deberse a las ERO presentes en dicha situación a la fuente que las produce (NOX e específicas). Los casos más inconsistentes ocurrieron con la ST y probablemente se deba a una diferencia en su concentración final en distintos cultivos neuronales. En forma previa se ha demostrado diferentes concentraciones de ST pueden provocar efectos variables en células de una misma o distinta población neuronal en relación al tiempo, mecanismo y por lo tanto, morfología y tipo de muerte neuronal (Deshmukh y Johnson, 2000; Pong et al, 2001, Belmokhtar, et al 2001).

Así, las diferencias en los efectos producidos por el K5 y el ST se deben a los mecanismos y rutas de señalización que activan y/o a la producción de distintas fuentes de ERO (posiblemente diferentes homólogos de la NADPH oxidasa) (Gomez-Gamboa y Morán, 2009). Por lo tanto, estos resultados indican que la condición específica del estímulo dictamina como señalizará y cómo será la muerte celular.

Dado lo anterior, los resultados obtenidos demuestran que la generación de ERO está directamente relacionada con la supervivencia neuronal y que dentro de ellas, el H_2O_2 y el $O_2^{\cdot-}$ juegan un papel importante en la muerte de NGC con niveles de GSH abatidos. Adicionalmente, sugieren que la supervivencia neuronal bajo estas condiciones depende en primer término, de la reducción de H_2O_2 , y en segunda instancia, de la reducción del $O_2^{\cdot-}$. De esta forma, la efectiva protección por el EUK 134, que tiene la capacidad de reducir ambas especies reactivas, disminuyó en forma efectiva la muerte celular inducida por el K5 y la ST, aun cuando el $O_2^{\cdot-}$ detectado por el DHE no se redujo en forma significativa, mientras que al utilizar al Mn(III)TMPyP, cuyas propiedades incluyen la reducción del $O_2^{\cdot-}$, se incrementó la muerte.

Esto apoya la importancia del GSH (ya sea *per se* o por la glutatión peroxidasa) como una poderosa defensa frente al H_2O_2 y sugiere que al abatir su expresión hay un incremento en la concentración de esta ERO que conlleva a daños celulares o eventos de señalización que pueden repercutir en el desarrollo neuronal. Apoyando esto último, se ha propuesto que dentro de las tres principales ERO generadas por el metabolismo ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 y $OH\cdot$), únicamente el H_2O_2 es un elemento potencial de señalización. Esto debido a su producción y degradación enzimática, así como de su vida media estable. Dichas propiedades le confieren a esta molécula, especificidad en tiempo y espacio que le permiten interactuar con sus blancos y desatar procesos de señalización por medio de la oxidación específica de grupos tioles (Forman et al, 2010).

En resumen, los experimentos *in vitro* demuestran que la inhibición de la síntesis de GSH *per se*, no compromete la viabilidad celular (tiempos cortos 1-24 hrs) ni genera un incremento importante de ERO. No obstante, hace susceptible a las neuronas al daño mediado por el estrés oxidante generado por una fuente exógena como el K5 ó ST.

Cuando esto ocurre, se producen picos significativos de ERO que se acumulan en forma gradual y continua debido a la falta de GSH que las reduzca. Esto provoca daños acumulativos en la célula o un proceso de señalización que resulta en la muerte celular, disminuyendo la viabilidad celular. De esta forma, al someter a las células a un estímulo pro-oxidante, se genera un incremento de ERO tan rápido que elimina a casi toda la población neuronal.

En esta forma, los resultados obtenidos sugieren que la generación de picos de ERO producidas en forma natural por fuentes endógenas de ben a fectar la viabilidad celular de células cuyo contenido de GSH es disminuido. Extrapolando estos resultados, generamos la hipótesis de que en la misma forma en que la disminución del GSH afecta la viabilidad celular debido a un incremento en las ERO, otros procesos del desarrollo regulados por estas últimas deben de ser igualmente afectados. Lo anterior nos llevó a estudiar *in vivo*, si la migración, la proliferación y la muerte neuronal se ven afectados al inhibir la síntesis del GSH.

10.4. La carencia de glutatión favorece las generación de alteraciones durante el desarrollo del cerebelo

La cantidad de ERO generada en un tiempo y sitio dado juega un papel importante en los procesos de desarrollo. Así, concentraciones bajas de H_2O_2 promueven eventos de proliferación y diferenciación, mientras que concentraciones elevadas promueven la muerte (Hernández-García et al, 2010). Dado que los estudios *in vitro* sugieren una acumulación de estas ERO en neuronas con niveles bajos de GSH, esperamos encontrar diferencias *in vivo* en el cerebelo de la rata al administrar una dosis diaria de BSO 3mmol.

La disminución en los niveles de GSH generada por este tratamiento fue muy eficiente, siendo esta del 84.29 %. Esta disminución generó un aumento importante en la tasa y magnitud de errores observados en las ratas. Los errores más notorios a nivel morfológico se presentaron en las folias V y VI (fisura primaria); VIII y XIX (fisura secundaria), y constaron de fusiones, supresiones, aislamientos y cambios en el grosor de las capas de la corteza cerebelar, así como de una desorganización en la orientación y posición de sus células.

Alteraciones similares a estas fueron reportadas como eventos naturales que ocurren entre el 20-40% de la población de ratas Wistar, acoplándose a lo observado en este estudio (Griffin et al 1980; Necchi et al, 2000; Cerri et al, 2010). Los grupos de trabajo de estas dos últimas referencias analizaron la población de ratas a partir de los 4 DPN y hasta los 22 DPN, con intervalos de 2 DPN y reportaron que la aparición de estos errores ocurre a partir de los 10 DPN, mientras que nosotros pudimos captarlos tanto en las ratas control como en las ratas tratadas con BSO a partir de los 8 DPN. Esto puede sugerir que la generación de estos errores comienza a los 8 DPN como ligeras fusiones en tre las capas granulares externas de las folias V y VI; VIII y IX que progresan generando alteraciones más evidentes en días posteriores.

Dentro de las alteraciones observadas en nuestro trabajo, es de notar la carencia y alteración del posicionamiento de las células de Purkinje y de sus arborizaciones. Este punto es de importancia debido a que estas células son las únicas neuronas que llevan información fuera del cerebelo y por lo tanto, alteraciones en sus conexiones deben repercutir en forma importante sobre las funciones del cerebelo. En forma complementaria a lo observado por nosotros, Necchi et al, (2000) utilizaron un acercamiento inmunohistoquímico que les permitió comprobar en forma fehaciente que las células de Purkinje conectan con las masas de células granulares ectópicas y que incluso en ocasiones, en los sitios de fusión de las fisuras, los árboles dendríticos de las células de Purkinje llegan a invadir a la folia vecina (Necchi et al, 2000, Cerri et al, 2010).

Estas alteraciones sugieren una relación entre las CGNs localizadas en forma ectópica y las células de Purkinje. Desde hace más de 3 décadas se ha estudiado la relación entre ambos tipos celulares y se ha llegado a la conclusión que estos se desarrollan en forma simbiótica. Alteraciones que afecten la viabilidad, morfología o actividad eléctrica de cualquiera de las afectará a la otra. Así, la carencia de CGNs afecta el crecimiento de las dendritas de las células de Purkinje debido a que las primeras proveen de factores tróficos necesarios para la diferenciación de las últimas (Altman, 1982). Por ejemplo, el disminuir la población de CGNs por medio del uso de drogas antiproliferativas que afectan a la población de CGNs mitóticamente activa, provoca una disminución en la expansión de la capa granular interna y de la capa

molecular, así como un mal posicionamiento de los somas de las células de Purkinje y alteraciones en sus dendritas (Woodward et al 1975).

A su vez, se ha demostrado que la proliferación de las CGNs y la foliación del cerebelo requieren de las células de Purkinje, ya que si éstas se abaten, ambos procesos se detienen (Fedderden et al 1992, Smeyne et al 1995) debido en parte a que la tasa de división de las CGN de la E GL es controlada por las células de Purkinje. Así la población de CGNs de los ratones *staggerer* está comprometida y el 25% de las células de Purkinje presentan una reducción importante en su árbol dendrítico (Herrup y Mullen, 1979). En forma adicional, los ratones *weaver* presentan una degeneración de la mayoría de las CGNs, mientras que las células de Purkinje se mantienen relativamente estables (Rezai y Yoon, 1972).

En forma importante, estudios en este último mutante de mostraron que la alteración en la migración de las CGN se debe a fuertes irregularidades presentes en los procesos de la glia radial de Bergmann (Rakic y Sidman, 1973). Esta glia, (Rakic, 1971) junto con los axones de CGNs de la capa granular interna generados en forma previa, proveen del substrato para la migración de las CGNs de la capa granular externa (Komuro y Rakic, 1998), sugiriendo que las células ectópicas observadas se deben a alteraciones en la glia radial de Bergmann, y que estas provocan los errores observados en las células de Purkinje.

Lo anterior es de esperar ya que la glia radial de Bergmann se localiza en la misma capa de las células de Purkinje y que mantiene una estrecha relación con ellas y con las CGNs. Se ha reportado que los procesos de diferenciación de la glia radial de Bergmann se correlacionan con la migración, de ndritogénesis, sinaptogénesis y maduración de las células de Purkinje. A su vez, la plasticidad morfológica y molecular de esta neuroglia parece ser regulada por la diferenciación de las mismas células de Purkinje (Yamada y Watanabe 2002). Por lo tanto, la generación de alteraciones en cualquiera de estas tres células afectará a las demás.

Ejemplo de lo anterior es lo encontrado por Cerri et al (2010), donde las fibras de la glia radial de Bergmann son irregulares, desorganizadas e interrumpidas y carecen de contactos con las CGN en los puntos de fusión de las fisuras primaria y secundaria

del cerebelo (Cerri et al, 2010) y se correlacionan con errores en la arquitectura del cerebelo (Qu and Smith, 2005; Yue et al., 2005; Weller et al., 2006).

Las evidencias anteriores parecen explicar porque el tratamiento con BSO incrementa la tasa de error y la malformación de los errores en el cerebelo de la rata. El BSO se comenzó a inyectar en forma crónica a partir de los 2 DPNs y hasta el momento del sacrificio. Esto debió haber potenciado la muerte de las células de Purkinje que normalmente ocurre durante la primer semana postnatal (Jankowski et al, 2009) debido a los efectos deletéreos provocados por el incremento esperado en las ERO o en forma alternativa por un retraso en la diferenciación de las mismas.

10.5. El tratamiento con BSO induce la expresión de la caspasa-3 y disminuye la migración de las CGNs

Los estudios inmunohistoquímicos realizados en ratas tratadas crónicamente con BSO indican que estas ratas presentan un incremento en la cantidad de caspasa-3 activa (mayor fluorescencia), así como en el número de células positivas a la misma. Esta marca se localizó principalmente y en forma consistente en células de tamaño reducido situadas entre la capa granular interna y la capa de células de Purkinje.

Esto sugiere que la muerte apoptótica que normalmente ocurre a los 16 DPN y que funciona para eliminar a las neuronas que no establecieron una conexión correcta con sus blancos se ve incrementada en las CGNs. Esto puede deberse a dos razones: La primera, es que la carencia de GSH produce un incremento en la generación de ERO que repercute en forma directa sobre su viabilidad celular en forma similar a los resultados obtenidos *in vitro*. Lamentablemente, esto no lo pudimos comprobar durante la realización de esta tesis. La segunda causa posible es que la diferenciación de las células de Purkinje se haya visto retrasada debido a la alterada migración observada en las CGNs.

Lo anterior se vio comprobado por el marcaje específico del BrdU de las células en estado proliferativo, que en el caso del cerebelo únicamente está conformado por las células de la capa granular externa CGNs. De esta forma, el menor número de células marcadas con BrdU, así como la menor fluorescencia obtenida de las mismas en las

ratas tratadas con BSO y sacrificadas a los 12 DPN, indicó una menor tasa de migración hacia la capa granular interna. Esto sugiere que la disminución en los niveles de GSH está alterando en alguna forma la migración de estas células y que al existir un menor número de CGNs que hagan contacto con las células de Purkinje, se ve afectada su diferenciación, generando el fenotipo observado en los somas y árboles dendríticos de estas células.

En forma especulativa, esta disminución en la migración se podría deber a la sobre expresión de la caspasa 3, la cual ha demostrado ser un substrato utilizado para la diferenciación de la glia radial de Bergmann (Oomman et al, 2004, 2005, 2006). Por lo tanto, las alteraciones en su expresión podrían estar afectando la diferenciación de estas células repercutiendo en la migración de las CGNs.

Dadas las evidencias anteriores, es posible que la disminución en los niveles de GSH por medio del tratamiento crónico con BSO induzca una mayor tasa de error y una mayor magnitud de los mismos, al provocar un incremento en la expresión de la caspasa-3 en el borde de la capa granular interna y de la capa de células de Purkinje, que disminuye la población de las CGNs y de las células de Purkinje, así como a una migración reducida y aberrante probablemente debida a modificaciones en la glia radial de Bergmann. En conjunto, estas alteraciones repercuten en el posicionamiento de las células y por lo tanto en el patrón de las capas de la corteza cerebelar, modificando así, tanto la morfología del cerebelo, como las conexiones neuronales.

En forma importante, este último punto se pudo comprobar al someter a las ratas tratadas a la prueba de la barra de equilibrio, en la cual se observó una alteración en la coordinación fina de los movimientos que se vio reflejada tanto en un mayor número de errores, como en un mayor tiempo para completar dicha prueba. En forma interesante las ratas tratadas con BSO tuvieron una mayor tendencia a las caídas hacia el lado derecho, pero no hacia el lado izquierdo en relación a las ratas control. Por lo tanto, la potenciación de los errores morfológicos y de conexiones observados en este y otros estudios (Necchi, et al, 2001; Cerri et al, 2010, Skata-Haga et al, 2001) generada por la disminución en los niveles de GSH repercuten en la coordinación motora y del balance.

11. CONCLUSIÓN

Se demostró que uno de los mecanismos por el cual el GSH regula la muerte neuronal es el control de los niveles de ERO en un rango estricto. Otras evidencias apuntan a funciones del GSH en el control de la tasa de recambio de ATP mitocondrial, regulación de canales iónicos, de caspasas, et c, que llevan a la muerte. No obstante, gran parte de estos procesos, mas no todos, resultan de la desregulación de los niveles de ERO debido a la carencia del GSH y por lo tanto, son efectos secundarios de este.

Esta tesis demostró que el tratamiento de cultivos primarios de CGN con BSO no provoca un incremento en los niveles de ERO ni afecta la viabilidad a tiempos cortos (4-24 hrs), por lo que este acercamiento puede ser utilizado para estudiar la repercusión de disminuir los niveles de GSH en estas neuronas. No obstante, a tiempos largos (36-48 hrs) el BSO induce un incremento importante en la generación de ERO y en forma posterior, una disminución en la viabilidad celular.

Aunque la disminución en los niveles de GSH no altera la generación de ERO ni la viabilidad celular en un estado basal, si hace susceptible a las neuronas al estrés mediado por estímulos pro-oxidantes como el K5 ó la ST. Bajo estas condiciones, el GSH no ejerce resistencia alguna frente a la acumulación de ERO, generando un rápido incremento en el H₂O₂ que provoca una muerte exacerbada en tiempos cortos.

In vivo, el tratamiento crónico con 3 mmol/Kg diarios disminuye en forma efectiva los niveles de GSH provocando un incremento en la tasa y magnitud de los errores normalmente presentes en el cerebelo. Esto parece deberse a una mayor activación de la caspasa-3 que se traduce en la muerte de CGNs, así como a una migración reducida y de carácter aberrante.

Estas alteraciones provocan un mal posicionamiento de CGNs y alteran la morfología de las células de Purkinje, provocando conexiones aberrantes que a nivel funcional, se reflejan en la coordinación fina de los movimientos y del equilibrio

12. REFERENCIAS

Alavez S, Blancas S, Morán A. (2006). Effect of N-methyl-D-aspartate receptor blockade on caspase activation and neuronal death in the developing rat cerebellum. *Neurosci. Lett.* 404:176-181.

Alessio M, Cerella C, Amici C, Pesce C, Coppola S, Fanelli C, De Nicola M, Cristofanon S, Clavarino G, Bergamaschi A, Magrini A, Gualandi G, Gibelli L. (2004). Glutathione depletion up-regulates Bcl-2 in BSO resistant cells. *FASEB J.* 18:1609-1611

Altman J. (1972). Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. 3. Maturation of the components of the granular layer. *J. Comp. Neur.* 145:465-514.

Altman J. (1982). Morphological development in the rat cerebellum and some of its mechanisms. In: *The cerebellum—New vistas*. Berlin: Springer. p 8–49.

Altman J, Bayer SA (1985). Embryonic development of the rat cerebellum. III. Regional differences in the time of origin, migration, and settling of Purkinje cells. *J Comp Neurol.* 231:42–65

Anathy V, Asif S, Guala A, Avermans M, Reynaert N, Ho Y, Budd R, Janssen-Heininger Y. (2009). Redox amplification of apoptosis by caspase dependent cleavage of glutaredoxin 1 and S-glutathionylation of Fas. *J. Cell Biol.* 184:241-252

Andersen BB, Gundersen HJ, Pakkenberg B. (2003). Aging of the human cerebellum: a stereological study. *J. Comp. Neurol.* 466:356–365.

Armstrong JS, Jones DP. (2002). Glutathione depletion enforces de mitochondrial permeability transition and causes cell death in Bcl-2 overexpressing HL60 cells. *FASEB J* 16:1263-1265

Arsénio Núñez ML, Sotelo C. (1985). Development of the spinocerebellar system in the postnatal rat. *J Comp Neurol.* 237: 291-306

Andersen J. (2004). Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med.* 10:S18-S25

Arsenio Núñez ML, Sotelo C. (1985). Development of the spinocerebellar system in the postnatal rat. *Comp. Neur.* 237:291-306.

Ayer A, Tan S, Gran C, Meyer A, Dawes I, Perrone G. (2010). The critical role of glutathione in maintenance of the mitochondrial genome. *Free radic biol med.* 29: 1956-1968

Baader SL, Sanlioglu S, Berrebi AS, Parker-Thornburg J, Oberdick J. (1998) Ectopic overexpression of Engrailed-2 in cerebellar Purkinje cells causes restricted cell loss and retarded external germinal layer development at lobule junctions. *J Neurosci* 18:1763–1773

Belmokhtar C A, Hillion J, Ségal-Bendirdjian E. (2001). Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Oncogene.* 20:3354-3362.

Benson RSP, Heer S. (1996). Characterization of cell volume loss in CEM-C7A cell during dexamethasone induced apoptosis. *Am. J. Physiol.* 39:1190-1203

Bienert GP, Moller AL, Kristiansen KA, Schulz A, Moller IM, Schjoerring JK, Jahn TP. (2007). Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *J. Biol. Chem.* 282, 1183–1192.

Bobba A, Atlante A, Petragallo V, Marra E. (2008). Different sources of reactive oxygen species contribute to low potassium-induced apoptosis in cerebellar granule cells. *Int J mol med.* 21:737-745

Burek MJ, Openheim RW (1996). Programmed cell death in the developing nervous system. *Brain Pathol.* 6: 427-446

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

Carter RJ, Morton J, Dunnet SB. (2001). Motor coordination and balance in rodents. *Curr protoc neurosci*. Chapter 8: unit 8.12

Castagné V, Rougemont M, Cuenod M, D'Orléans L. (2004). Low brain glutathione and ascorbic acid associated with dopamine uptake inhibition during rat's development induce long-term cognitive deficit: relevance to schizophrenia. *Neurobiol Dis*. 15: 93–105.

Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK (2008). Caspases – an update. *Comp. Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 151:10-27

Circu ML, Aw TY. (2008). Glutathione and apoptosis. *Free Radic Res*. 42: 689-706

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

Coyoy A, Valencia A, Guemez-Gamboa A, Morán J. (2008). Role of NADPH oxidase in the apoptotic death of cultured cerebellar granule neurons. *Free radical biomed* 45:1056-1064

Davies KJ. (1999). The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress. *IUBMB Life* 48, 41–47.

Dahmane N, Altaba A. (1999). Sonic hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum. *Development* 126: 3089-3100

Dickinson DA, Forman HJ. (2002). Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem pharmacol*. 64:1019-1026

Dröge W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev*. 82, 47–95.

Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Colombo R, Milzani A. (2007). S-glutathionylation in protein redox regulation. *Free Radic Biol Med*. 43: 883-898

- Dalton TP, Chen Y, Schneider SN, Nebert DW, Shertzer HG. (2004). Genetically altered mice to evaluate glutathione homeostasis in health and disease. *Free radic biol med.* 37:1511-1526
- Dringen R. (2000). Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol.* 62:649-671
- Elmore S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 35:495-516
- Faruqi RM, Poptic EJ, Faruqi TR, Motte DL, DiCorleto PE. (1997). Distinct mechanisms for N-acetylcysteine inhibition of cytokine-induced E-selectin and VCAM-1 expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 273:H817-H826.
- Ferguson SA. (1996). Neuroanatomical and functional alteration resulting from early postnatal cerebellar insults in rodents. *Pharmacol Biochem Behav* 4:663-671.
- Filomeni G, Rotilio G, Ciriolo MR. (2002). Cell signalling and the glutathione redox system. *Biochem pharmacol.* 64: 1057-1064
- Floyd RA. (1999). Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 222:236-245.
- Fonnum F, Lock EA. (2004). The contributions of excitotoxicity, glutathione depletion and DNA repair in chemically induced injury neurons: exemplified with toxic effects in cerebellar granule cells. *J neurochem.* 88: 513-531
- Forman HJ, Maiorino M, Ursini F. (2010). Signaling functions of reactive oxygen species. *Biochemistry.* 29:835-842
- Franco R, Cidlowski JA. (2009). Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. *Cell death and differentiation* 16, 1303-1314

Franklin C C, Krejsa C M, Pierce R H, White CC, Fusto N, Kavanagh T J. (2002). Caspase-3-dependent cleavage of the glutamate-L-cysteine ligase catalytic subunit during apoptotic cell death. *Am J Pathol.* 160: 1887-1894

Fratelli M, Goodwin LO, Orom UA, Lombardi S, Tonelli R, Mengozzi M, Ghezzi P. (2005). Gene expression profiling reveals a signaling role of glutathione in redox regulation. *PNAS* 102: 13998-14003.

Friedlander R M. (2003). Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *N.Engl. J. Med.* 348:1365-1375

Funato Y, Michiue T, Aoshima M, Miki H. (2006). The thioredoxin-related redox-regulating protein nucleoredoxin inhibits Wnt-beta-catenin signalling through Dishevelled. *Nat. Cell Biol.* 8, 501–508.

Garcia J., Han D., Sancheti H., Yap L., Kaplowitz, Cadenas E. (2010). Regulation of mitochondrial glutathione redox status and protein glutathionylation by respiratory substrates. *J Biol Chem.* 285: 39646-39654

Garrido M., Tereshchenko Y., Zhevtsova Z., Taschenberger G., Bähr M., Kügler S. (2011). Glutathione depletion and overproduction both initiate degeneration of dopaminergic neurons. *Acta neuropathol.* 121:475-485

Ghibelli L, Fanelli C, Rotilio G, Lafavia E, Coppola S, Colussi C, Civitareale P, Ciriolo MR: Rescue of cells from apoptosis by inhibition of active GSH extrusion. *FASEB J* 1998, 12:479–486

Goodlett C R (2008). The cerebellum. In: *Neuroscience in Medicine.* Totowa, NJ, Humana Press. P 221-247

Goldman EH, Chen L, Fu H. (2004). Activation of apoptosis signal regulation kinase 1 by reactive oxygen species through dephosphorylation at serine 967 and 14-3-3-3 dissociation. *J. Biol Chem.* 279:10442-10449

Goldowitz D, Hamrer K. (1998). The cells and molecules that make a cerebellum. *Trends Neurosci.* 21: 575-582

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

Halliwell B. (1992). Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem.* 59:1609-1623.

Hernández-Henríquez B, Arellano RO, Morán J. (2010). Role of ionic fluxes on cell death and apoptotic volume decrease in cultured cerebellar granule neurons. *Neuroscience* 167:298-311

Hernández-Enríquez B, Guemez-Gamboa A, Morán J. (2011). Reactive oxygen species are related to ionic fluxes and volume decrease in apoptotic cerebellar granule neurons: role of Nox enzymes. *J Neurochem.* 117: 654-664

Heneka M, Löschmann P, Schulz J, Weller M, Klockgether T. (1999). Glutathione depletion and neuronal cell death: the role of reactive oxygen intermediates and mitochondrial function. *Brain Res.* 826: 53-62

Hoser M, Baader SL, Bösl MR, Ihmer A, Wegner M, Sock E. (2007). Prolonged glial expression of sOx4 in the CNS leads to architectural cerebellar defects and ataxia. *J neurosci,* 27:5495-5505

Jha N, Jurma O, Lalli G, Liu Y, Pettus EH, Greenamyre JT, Liu RM, Forman HJ, Andersen JK. (2000). Glutathione depletion in PC12 results in selective inhibition of mitochondrial complex I activity. *J Biol Chem* 275: 26096-26101

Jain A, Martensson J, Stole E, Auld P, Meister A. (1991). Glutathione deficiency leads to mitochondrial damage in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 1913-1917

Janáky R, Ogita K, Pasqualott BA, Bains JS, Oja SS, Yoneda Y, Shaw CA. (2001). Glutathione and signal transduction in the mammalian CNS. *J Neurochem.* 73: 889-902

Jankowski J, Holst M I, Liebig C, Oberdick J, Baader S L. (2004). Egrailed-2 negatively regulates the onset of perinatal Purkinje cell differentiation. *J Comp Neurol* 472:87–99

Jankowski J, Miething A, Schilling K, Baader SL. (2009). Physiological Purkinje cell death is spatiotemporally organized in the developing mouse cerebellum. *Cerebellum* 8:277-290

Ishikawa Y, Satoh T, Enokido Y, Nishio C, Ikeuchi T, Hatanaka H. (1999). Generation of reactive oxygen species, release of L-glutamate and activation of caspases are required for oxygen-induced apoptosis of embryonic hippocampal neurons in culture. *Brain Res.* 824:71-80.

Kamata H, Honda SI, Maeda S, Chang L, Hirata H, Karin M. et al., (2005a). Reactive oxygen species promote TNF α -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell* 120, 649–661

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

Komuro H, Rakic P. (1993). Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science.* 260:95-97

Komuro H, Rakic P. (1998). Distinct modes of neuronal migration in different domains of developing cerebellar cortex. *J Neurosci* 18: 1478–1490.

Kowaltowski A, Castilho R F, Vercesi A E. (2001). Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS letters* 495: 12-15

Kushima Y, Tsukui H, Enokido Y, Nishio C, Hatanaka H. (1990). High oxygen atmosphere for neuronal cell culture with nerve growth factor. I. Primary culture of basal forebrain cholinergic neurons from fetal and postnatal rats. *Brain Res.* 536:16-22.

Lafarga M, Andres MA, Calle E, Berciano MT. (1998). Reactive gliosis of immature Bergmann glia and microglial activation in response to cell death of granule cells

precursors induced by methylazoxymethanol treatment in developing rat cerebellum. *Anat Embryol* 198:111–122.

Limón-Pacheco J H, Gonsebatt M A (2007). New Perspectives on Brain Damage on Brain Cell Damage, Neurodegeneration and neuroprotective strategies. Santamaría A., Jiménez-Capdeville M. (ed). Research signpost, Kerala. pp: 173-188.

Limón-Pacheco J H, Hernández N A, Fanjul-Moles M L, Gonsebatt M E. (2007). Glutathione depletion activates mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways that display organ-specific responses and brain protection in mice. *Free Radic. Biol. Med.* 43:1335-1347

Mares V, Lodin Z. (1970). The cellular kinetics of the developing mouse cerebellum II. The function of the externa granular layer in the process of gyrification. *Brain res.* 23: 343-352

Martensson J, Jain A, Stole E, Frayer W, Auldt P, Meister A. (1991). Inhibition of glutathione synthesis in the newborn rat: a model for endogenously produced oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 9360-9364

Martensson J, Meister A. (1992). Glutathione deficiency increases hepatic ascorbic acid synthesis in adult mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:11566-11568.

Mattson MP, Guthrie PB, Hayes BC, Kater SB. (1989). Roles for mitotic history in the generation and degeneration of hippocampal neuroarchitecture. *J. Neurosci.* 9: 1223-12230.

Mattson MP, Lovell MA, Furukawa K, Markesbery WR. (1995). Neurotrophic factors attenuate glutamate-induced accumulation of peroxides, elevation of intracellular Ca²⁺ concentration, and neurotoxicity and increase antioxidant enzyme activities in hippocampal neurons. *J. Neurochem.* 65: 1740-1751.

Maeno E., Ishizaki Y. (2000). Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci.* 97:9487-9492

Mattson M P. (1998). Free radicals, calcium, and the synaptic plasticity-cell death continuum: emerging roles of the transcription factor NF kappa B. *Int Rev Neurobiol.* 42:103-68.

Morán J, Alavez S, Rivera-Gaxiola M, Valencia A, Hurtado S. (1999). Effect of NMDA antagonists on the activity of glutaminase and aspartate aminotransferase in the developing rat cerebellum. *Int. J. Dev. Neurosci.* 17:55-65

Mosishima N , N akanishi K , T akenouchi H , Shibata T , Y asuhiko 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.

Ohkuma S , K atsura M , C hen. DZ, G uo J L, K uriyama K. (1995). Hydroxyl radical scavengers enhance nitric oxide-evoked acetylcholine release from mouse cerebral cortical neurons. *Mol. Brain Res.* 34, 347-350.

Oja SS, Janáky R, Varga V, Saransaari P. (2000). Modulations of glutamate receptor functions by glutathione. *Neurochem int.* 37:299-306

Okada Y, Maeno E. (2001). Apoptosis cell volume regulation and regulatory chloride channels. *Comp Biochem and Physiol. Part A.* 130: 377-383

Ona VO, Li M, Vonsattel JP, Andrews LJ, Khan SQ, Chung WM, Frey AS, Menon AS, Li X J, Stieg P E, Y uan J , Penney J B, Y oung A B, C ha J H, F riedlander R M. (1999). Inhibition of caspase-1 slows disease progression in a mouse model of Huntington's disease. *Nature* 299: 263-267

Petrushanko I, Bogdanov N , B ulygina E , G renacher B , L einsoo T , B o ldyrev A , G assmann M , B ogdanova A . (2005). Na-K-ATPase in rat cerebellar granule cells is redox sensitive. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290: R916-R925

Piccioli P , P orcile C , S tanzione S , B isaglia M , B ajetto A , B onavia R , F lorido T , S chettini G . (2001). Inhibition of nuclear factor- κ B activation induces apoptosis in cerebellar granule cells. *J Neurosci Res* 66: 1064-1073

Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, De Tata V, Casini A. (2003). The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem Pharm.* 66: 1499-1503

Qu Q, Smith FI. (2005). Neuronal migration defects in cerebellum of the *lrg* (*myd*) mouse are associated with disruptions in Bergmann glia organization and delayed migration of granule neurons. *Cerebellum* 4:261–270.

Rahman I, Kode A, Biswas S. (2007). Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat protoc.* 1 : 3159-3165

Rakic P. (1971). Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electronmicroscopic study in *Macacus Rhesus*. *J Comp Neurol* 141:283–312.

Rakic P, Sidman RL. (1973). *Weaver* mutant mouse cerebellum: Defective neuronal migration secondary to abnormality of Bergmann glia. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 70:240.244

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

Renovell A, Giner J, Portoles M. (1996). Loss of granule neurons in the aging human cerebellar cortex. *Int. J.Dev. Biol.* 40: 193S–194S.

Rezaei Z, Yoon CH. (1972). Abnormal rate of granule cell migration in the cerebellum of *Weaver* mutant mice. *Dev Biol.* 29:17-26

Renovell A, Giner J, Portoles M. (1996). Loss of granule neurons in the ageing human cerebellar cortex. *Int J Dev Biol. Suppl* 1: 193S-194S

Rio C, Rieff HI, Qi P, Khurana TS, Corfas C. (1997). Neuregulin and *erbB* receptors play a critical role in neuronal migration. *Neuron* 19:39-50

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.

Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J. (2001). Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem.* 11:173-186

Sastry PS, Rao KS. (2000). Apoptosis and the nervous system. *J. Neurochem.* 74: 1-20

Scarpa A, Rogo P, Viglino R, Stevanato F, Bracco L, Battistin. (1987). Age dependence of the level of the enzymes involved in the protection against active oxygen species in the rat brain. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 185:129-133

Schulz JB, 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.* 16:4696-4706.

Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. (1991) Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kB transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* 10, 2247–2258.

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

Schroder CP, Godwin AK, O'Dwyer PJ, Tew KD, Hamilton TC, Ozols RF. (1996) Glutathione and drug resistance. *Cancer Invest* 14:158–168

Smeyne RJ, Chu T, Lewin A, Bian F, Crisman SS, Kunsch C, Lira SA, Oberdick. (1995). Local control of granule cell generation by cerebellar purkinje cells. *Mol cell neurosci.* 6:230-251

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

Tanaka M, Momoi T, Marunouchi T. (2000). In situ detection of activated caspase-3 in apoptotic granule neurons in the developing cerebellum in slice cultures and in vivo. *Dev. Brain Res.* 121:223-228.

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

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.

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

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: 13301-13304

Vesce S, Jakobsons M, Johnson-Cadwell L, Nicholls D. (2005). Acute glutathione depletion restricts mitochondrial export in cerebellar granule neurons. *J Biol Chem.* 290: 38720-38728

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

Wang, X, Pal R, Chen XW, Limpeanchob N, Kumar KN, Michaelis E. K. (2005). High intrinsic oxidative stress may underlie selective vulnerability of the hippocampal CA1 region. *Brain Res.* 140, 120–126.

Wang, X, Pal R, Chen XW, Kumar KN, Kim OJ, Michaelis EK (2007). Genome-wide transcriptome profiling of region-specific vulnerability to oxidative stress in the hippocampus. *Genomics* 90, 201–212.

Wang X, Zaidi A, Pal R, Garrett AS, Bracer R, Chen XW, Michaelis ML, Michaelis EK. (2009). Genomic and biochemical approaches in the discovery of mechanisms for selective neuronal vulnerability to oxidative stress. *BMC Neurosci.* 19: 10-12.

Wang X, Michaelis EK (2010). Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Front aging neurosci.* 2;12.

Watanabe T, Sagisaka H, Arakawa S, Shibaya Y, Watanabe M, Igarashi I, Tanaka K, Totsuka S, Takasaki W, Manabe S. (2003). A novel model of continuous depletion of glutathione in mice treated with L-buthionine (S,R)-sulfoximine. *J Toxicol Sci.* 28: 455-469

Wild A C, Mulcahy R T. (2000). Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase subunit gene expression: insights into transcriptional control of antioxidant defenses. *Free Radic. Res.* 32:281-301

Williams DL. Oxidation, antioxidants and cataract formation: a literature review. *Vet ophthalmol.* 9:292-298

Wüllner U, Seyfried J, Groscurth P, Beinroth S, Winter S, Gleichmann M, Heneka M, Löschmann P, Schulz JB, Weller M, Klockgether T. (1999). Glutathione depletion and neuronal cell death: the role of reactive oxygen intermediates and mitochondrial function. *Brain res.* 823: 53-62

Yamada K, Watanabe M. (2002). Cytodifferentiation of Bergmann glia and its relationship with Purkinje cells. *Anat Sci Int.* 77: 94-108

Yan XX, Najbauer J, Woo CC, Dashtipour K, Ribak CE, Leon M, (2001). Expression of active caspase-3 in mitotic and postmitotic cells of the rat forebrain, *J. Comp. Neurol.* 433: 4 – 22.

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

Yue Q, Groszer M, Gil JS, Berk AJ, Messing A, Wu H, Liu X. (2005). PTEN deletion in Bergmann glia leads to premature differentiation and affects laminar organization. *Development* 132:3281–3291.

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

Zhuang S, Demiris 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

Zhuang S, Demiris JT, Kochevar IE. (2001). Protein kinase C inhibits singlet oxygen-induced apoptosis by decreasing caspase-8 activation. *Oncogene.* 20:6764-6776

Zimmermann AK, Loucks FA, Schroeder EK, Bouchard RJ, Tyler KL, Linseman DA. (2007). Glutathione binding to the Bcl-2 homology-3 domain groove: A molecular basis for Bcl-2 antioxidant function at mitochondria. *J Biol Chem.* 282: 29296–29304.