



Memoria del 46.º Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM

Papel de las especies reactivas de oxígeno en el desarrollo del sistema nervioso central.

Role of reactive oxygen species in the development of central nervous system.

Morán Andrade, Julio^{1*} y Olguín-Albuerne, Mauricio¹

1. Departamento de Neuropatología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM

*Correspondencia. Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Circuito Exterior s/n, Cd. Universitaria, Col. Copilco, Coyoacán, CDMX, CP 04510 Tel. +52 (55) 5622-5616, jmoran@ifc.unam.mx

Resumen

Las especies reactivas de oxígeno son moléculas altamente reactivas que pueden tener efectos nocivos en las células y en los organismos y su sobreproducción se ha asociado a numerosas patologías y al envejecimiento. Sin embargo, recientemente se ha sugerido que estas moléculas participan en la regulación de la fisiología celular y de múltiples eventos patofisiológicos. Se sabe que estas especies reactivas participan en la modulación de la respuesta inmune de los neutrófilos y macrófagos, la regulación del tono vascular y de la concentración de oxígeno, la producción de óxido nítrico y la muerte celular programada, entre otros. En el sistema nervioso central, también se ha sugerido un papel de las especies reactivas de oxígeno en procesos como la diferenciación neuronal, el crecimiento neurítico, la orientación axonal, la proliferación y la muerte celular programada (apoptosis), entre otros. El objetivo de esta revisión es resumir y discutir los avances en el estudio de la participación de estas moléculas en los diferentes procesos del desarrollo del sistema nervioso central.

Palabras clave: especies reactivas de oxígeno, peróxido de hidrógeno, NOX, señalización redox, sistema nervioso.

Abstract

Reactive oxygen species are highly reactive molecules that can induce harmful effects in cells and organisms. Its overproduction has been linked to several diseases and aging. More recently, it has been shown that these molecules could participate in the regulation of the cell physiology and some pathophysiological processes. It is now accepted that reactive oxygen species regulate the immune response of neutrophils and macrophages, the regulation of vascular tone, the regulation of the concentration of oxygen, nitric oxide production and programmed cell death, among others. In the central nervous system, it has also been suggested a role of these molecules, particularly in most of the developmental events, including neuronal differentiation, neuritic growth, axonal guidance, proliferation and programmed cell death (apoptosis). Here we review and summarize some of the studies about the participation of reactive oxygen species in different events of the central nervous system development.

Key words: reactive oxygen species, hydrogen peroxide, NOX, redox signaling, nervous system.

Especies reactivas de oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son moléculas que se originan a partir de la reducción parcial de la molécula de oxígeno (O_2). Éstas pueden dividirse en dos grupos principales: los radicales libres y las moléculas no radicales. En los sistemas biológicos existen diferentes ERO; sin embargo, las más relevantes son el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$); las cuales - en este mismo orden - son producidas por la reducción secuencial del oxígeno [1-3].

Anión superóxido

El anión superóxido se forma por la reducción univalente de la molécula de oxígeno a través de diferentes enzimas dentro de la célula. Es considerado como una ERO primaria, ya que a partir de ésta pueden formarse otras ERO. Una vez formado, éste dismuta rápidamente a peróxido de hidrógeno por mecanismos no enzimáticos; sin embargo, en presencia de la enzima superóxido dismutasa, la velocidad está limitada solo por el coeficiente de difusión de la molécula. El poco anión superóxido que no dismuta es menos reactivo con las proteínas, el ADN y los lípidos, y reacciona principalmente con el óxido nítrico para formar peroxinitrito y con los metales en transición, por lo que prácticamente sólo reacciona con proteínas que contienen centros hierro-azufre [3-5].

Radical hidroxilo

El radical hidroxilo tiene una vida media muy corta (de aproximadamente 1×10^{-9} s) y prácticamente reacciona con cualquier molécula cercana al sitio donde se originó. El radical hidroxilo se forma a partir del peróxido de hidrógeno al reaccionar con un metal en transición, generalmente hierro, cuya disponibilidad en las células es altamente regulada. También puede formarse cuando el anión superóxido reacciona con el peróxido de hidrógeno. Debido a su alta reactividad y baja especificidad, se considera que el radical hidroxilo es una molécula muy tóxica para las células [4,5].

Peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno es una molécula que se forma mayoritariamente por la reducción secuencial del O_2 por dos electrones. Se forma primero el anión superóxido y posteriormente ocurre una segunda reducción del O_2 . En las células puede ser formado por algunas enzimas; sin embargo, la mayor parte del

peróxido de hidrógeno se genera a través de la dismutación del anión superóxido. El peróxido de hidrógeno es más estable que el anión superóxido y el radical hidroxilo y puede difundir libremente a través de las membranas lipídicas aunque su difusión es favorecida por la presencia de acuaporinas [3, 4, 6].

Los niveles intracelulares de peróxido de hidrógeno están fuertemente regulados por diferentes sistemas antioxidantes, cuya finalidad es degradar al peróxido de hidrógeno en agua y, por otro lado, mantener el ambiente reducido de la célula. Existen diferentes enzimas que se encargan de dismutar al peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular y cuya distribución dentro de la célula es específica, encontrándose en los peroxisomas la catalasa mientras que en el citoplasma como en mitocondrias encontramos a la glutatión peroxidasa (GPX) y a la peroxirredoxina (PRX) [3, 7].

Tanto la glutatión peroxidasa como la peroxirredoxina emplean a las formas reducidas del glutatión (GSH) y de la tiorredoxina (Trx) para catalizar la dismutación del peróxido de hidrógeno a agua. El resultado es la formación de las formas disulfuro del glutatión (GSSG) y disulfuro de la tiorredoxina ($TrxS_2$), también llamados glutatión oxidado y tiorredoxina disulfuro, respectivamente. Tanto el glutatión oxidado como la tiorredoxina disulfuro vuelven a sus formas reducidas a través de las enzimas: reductasa de glutatión (GR) y reductasa de tiorredoxina (TrxR) [3,4].

Generación de especies reactivas de oxígeno

En las células, las ERO pueden ser formadas a través de diferentes mecanismos (Tabla1). Uno de ellos es a través de la cadena de transporte de electrones de la mitocondria [8-10], en donde los electrones obtenidos a partir de moléculas reducidas pasan a un aceptor final que es la molécula de oxígeno, con la intención de generar un gradiente de protones que será utilizado en la generación de moléculas de ATP. Durante este proceso, los electrones fluyen a través de una cadena de complejos enzimáticos I-IV, en donde al final las moléculas de oxígeno son reducidas completamente a H_2O . Sin embargo, durante dicho proceso puede ocurrir una fuga de electrones a nivel de los complejos I y III, reduciendo parcialmente al O_2 y produciendo anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) [3]. El porcentaje de electrones fugados en las mitocondrias de mamíferos se ha estimado que está en un rango de 0.16% a un 2%. Además, dentro de la mitocondria, las ERO son también generadas por las enzimas monoamino oxidasas y p66shc [4, 11].

Por su parte, las NADPH oxidasas (NOX 1-5) y las oxidasas duales (DUOX 1-2) son otra fuente importante de generación de ERO en las células. Esta familia de complejos enzimáticos membranales, se distingue por producir anión superóxido y peróxido de hidrógeno como su principal función y no como un subproducto. Se activan en respuesta a una gran variedad de moléculas como: factores de crecimiento, citosinas, agonistas de receptores acoplados a proteínas G, neurotrofinas y receptores glutamatérgicos tipo NMDA. Su actividad está regulada por las diferentes subunidades acopladoras y activadoras siendo una de ellas RAC 1 y 2; en el caso de NOX 4 presenta una actividad constitutiva, mientras que NOX 5 y DUOX 1 y 2 son reguladas por calcio. Se expresan en diferentes tejidos y su distribución subcelular es diversa, pudiéndose encontrar en núcleo, retículo endoplasmático, endosomas, lamelipodios y en caveolas, así como en balsas lipídicas de la membrana plasmática [12-14].

Señalización redox

De entre todas las ERO -y debido a su vida media, reactividad y capacidad de difusión- el peróxido de hidrógeno constituye la principal molécula señalizadora en los procesos de regulación redox. Por el contrario, el anión superóxido y el radical hidroxilo son moléculas con una vida media muy corta, no son permeables a la membrana plasmática y tienen una alta reactividad, por lo que su participación en la señalización redox es muy reducida [15-18].

Está bien documentada la participación de las ERO en la modulación de diversos elementos involucrados en las vías de señalización. Por ejemplo, se sabe que el peróxido de hidrógeno induce la activación de varias proteínas cinasas de tirosina y proteínas cinasas de serina/treonina; y por el contrario, es responsable de la inactivación de proteínas fosfatasa de tirosina y proteínas fosfatasa de serina/treonina. Además, modula la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} , los receptores IP3 y rianodina, así como la activación e inactivación de algunos factores de transcripción [2,19]. Varios trabajos y revisiones han abordado este tema [1, 4, 15-17, 20].

Aunque se tiene mucha información sobre este tema, se desconocen los mecanismos moleculares que median dichos procesos. En este sentido, existe una serie de condiciones que deben cumplirse para que el peróxido de hidrógeno pueda actuar en la señalización redox:

- Primero, su producción debe ser restringida a un espacio y tiempo específicos. De esta forma el

peróxido de hidrógeno sería capaz de modular eventos particulares de las vías de señalización en regiones específicas de la célula [12, 21]. Hay que tener en cuenta que el ambiente de la célula es altamente reducido, por lo que el peróxido de hidrógeno no podría viajar largas distancias sin que éste fuese degradado por una enzima antioxidante.

- Segundo, su producción debe ser controlada, de lo contrario, se produciría un daño inespecífico a diversos componentes de la célula a través de la formación del radical hidroxilo.

Mecanismos de señalización

Las modificaciones a las proteínas provocadas por las ERO varían según el tipo de reacción, lo cual determina a su vez el grado de reversibilidad. Como se mencionó anteriormente, existen básicamente dos formas en las que el peróxido de hidrógeno interacciona con las proteínas. La primera es la oxidación de determinados aminoácidos, siendo la cisteína el más importante, aunque otros aminoácidos también son susceptibles de ser oxidados como la tirosina y el triptófano (4). La segunda es la modificación de los pares proteína-glutatión, proteína-tiorredoxina y proteína-glutarredoxina [22]. Estas oxidaciones pueden provocar cambios conformacionales en las proteínas, modificar las interacciones entre ellas o con otras proteínas o afectar los sitios catalíticos de las enzimas [1, 3, 7, 16, 17].

Como se comentó, el peróxido de hidrógeno reúne las características idóneas para actuar como una señal intracelular a través de su interacción con residuos de aminoácidos (básicamente de cisteína) de las proteínas blanco. Para que los residuos de cisteínas de las proteínas puedan reaccionar con el peróxido de hidrógeno existen dos consideraciones espaciales que se deben tener en cuenta. La primera es que los residuos de cisteína deben ser accesibles al peróxido de hidrógeno y la segunda es la naturaleza de los aminoácidos aledaños a la cisteína, ya que si éstos poseen carga positiva, pueden neutralizar la carga negativa del grupo tiol de las cisteínas (R-SH), lo que disminuye su pKa y favorece la forma desprotonada o tiolato (R-S⁻); la cual es mucho más reactiva al peróxido de hidrógeno que el grupo tiol. Para que esto ocurra, el pKa de los residuos de cisteína en las proteínas debe ser más bajo o alrededor del pH intracelular [22, 17]. En estas condiciones, aproximadamente la mitad de los grupos tiol se encuentran en su forma desprotonada. Por lo anterior, las proteínas que posean cisteínas expuestas y con valores de pKa más bajos a la media (8.0-8.5), serán

más susceptibles de una modificación por el peróxido de hidrógeno [22].

Tabla 1. Fuentes de generación de especies reactivas de oxígeno descritas en los distintos tipos celulares del sistema nervioso

<i>Fuente</i>	<i>Neuronas</i>	<i>Astroцитos</i>	<i>Oligodendrocitos</i>	<i>Microglia</i>	<i>Referencia</i>
Xantina oxidasa	x	x		x	[55] [56]
Monoamino oxidasa	x (MAO-A/B)	x (MAO-B)		x (MAO-B)	[57] [58]
MICAL	x		x		[47] [59]
Citocromos P450	x	x	x	x	[60]
Ciclooxigenasa	x	x	x	x	[56] [61]
Lipooxigenasa	x	x		x	[62] [63]
NOX 1	x	x		x	[64] [21]
NOX 2	x	x		x	[64] [21]
NOX 3	x				[65]
NOX 4	x	x		x	[64] [21]
DUOX1	x	x			[66] [64]
DUOX2	x	x			[66] [64]
Mitocondria	x	x	x	x	[8] [9]

Distintas fuentes de generación de especies reactivas de oxígeno en la célula. De entre éstas, la mitocondria representa una de las fuentes más importantes junto con las NADPH-oxidasas (NOX), cuya única función es producir especies reactiva de oxígeno. MAO-A, MAO-B, monoamino oxidasa A y B.

Las reacciones entre los grupos tiol con peróxido de hidrógeno llevan a la formación de un ácido sulfénico (R-SOH) (Figura 1). A partir de aquí pueden ocurrir diferentes reacciones en ausencia de glutatión, tiorredoxina y glutarredoxina:

- 1) algunos aminoácidos adyacentes pueden favorecer la estabilización del intermediario sulfonato (R-SO⁻), como ocurre en el caso de las proteínas OxyR y Orp1; sin embargo, este estado es inestable y usualmente es finalmente reducido.
- 2) el ácido sulfénico formado es altamente reactivo, por lo que si en la proteína existe un grupo tiol adyacente, éste lo reducirá y se formará un enlace disulfuro.
- 3) si existiese un nitrógeno próximo al ácido sulfénico se formará una sulfenil amida (R-SN-R'-R'').
- 4) el ácido sulfénico puede ser oxidado nuevamente por el peróxido de hidrógeno, formando ácido sulfínico (R-SO₂H). La formación de este ácido puede ser importante en la regulación redox de algunas proteínas como en la peroxirredoxina. A pesar de ser estable, este ácido puede ser nuevamente reducido a ácido sulfénico por una familia de proteínas llamadas sestrinas (23).

- 5) si el ácido sulfínico es oxidado por el peróxido de hidrógeno, se formará ácido sulfónico (R-SO₃H).

Hasta el momento, no se conoce ninguna enzima que pueda reducir al ácido sulfónico (Figura 1) (17, 24).

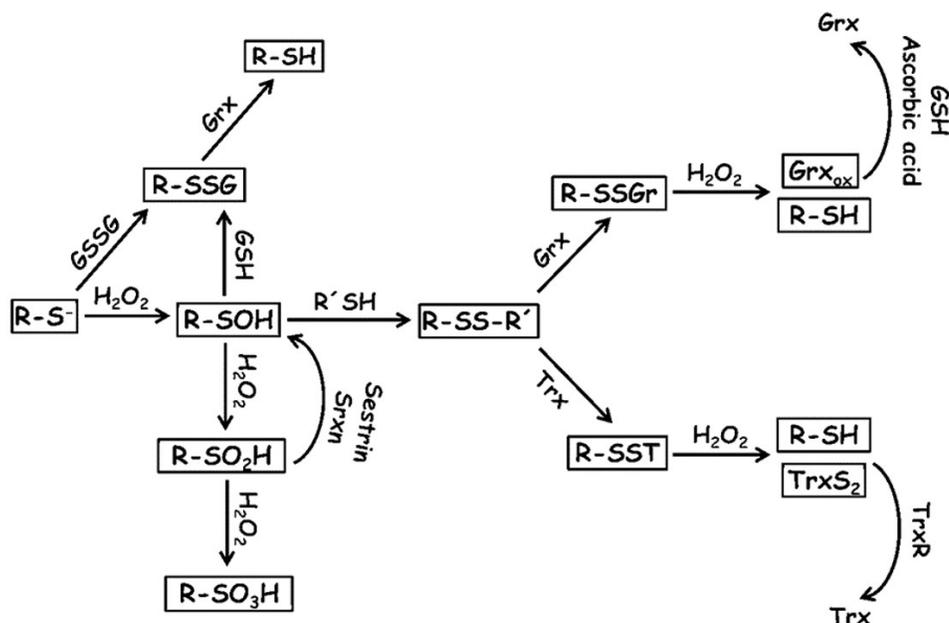


Figura 1. Mecanismos de señalización redox a través de reacciones de óxido-reducción de las proteínas. Cuando un grupo tiolato (R-S-) de una cisteína reactiva reacciona con H₂O₂ se produce ácido sulfínico (R-SOH), el cual si vuelve a oxidarse por H₂O₂ forma ácido sulfínico (RSO₂H). Una posterior reacción de este grupo con H₂O₂ forma ácido sulfónico (R-SO₃H). Todas las reacciones, salvo la última, son reversibles. Tanto las tiorredoxinas como las glutarredoxinas son capaces de reducir los enlaces disulfuro entre las proteínas oxidadas a través de la formación de enlaces disulfuro intermoleculares. Estas últimas pueden ser disociados por el H₂O₂. Modificado de [67].

Por otra parte, el ácido sulfénico en presencia de glutatión reducido, forma un enlace disulfuro entre el glutatión y el residuo de cisteína, formando una proteína glutatiónilada. Por el contrario, si el glutatión se encuentra oxidado, se puede formar el mismo enlace con un grupo tiol de un residuo aminoácido de una proteína. Además, los enlaces disulfuro formados entre cisteínas pueden ser reducidos por tiorredoxina y glutarredoxina independientemente, formando un enlace disulfuro entre la proteína y la tiorredoxina (o entre la proteína y la glutarredoxina, respectivamente). Ambos procesos ocurren y pueden ser importantes en la regulación de la actividad de las proteínas, como es el caso de Ask1 y CRMP2. A su vez, los enlaces entre proteína-tiorredoxina y proteína-glutarredoxina pueden ser rotos por el peróxido de hidrógeno, estableciendo así una serie de reacciones reversibles que son controladas por el estado redox general de la célula o - más específicamente- en un punto concreto de la célula [25, 26].

Desarrollo del Sistema Nervioso Central y ERO

El desarrollo del Sistema Nervioso Central (SNC) comprende diferentes procesos que ocurren de manera muy organizada en un tiempo y espacio específicos. Esto incluye la proliferación, diferenciación,

migración, crecimiento y establecimiento de contactos sinápticos y muerte programada. Estos procesos continúan ocurriendo aun después de haberse completado el desarrollo. Todos estos eventos son regulados por diversas moléculas que actúan como organizadores o indicadores del destino de cada célula. En particular, se ha demostrado recientemente en modelos de desarrollo del sistema nervioso que las ERO actúan como moléculas señal, ya sea directamente o a través de vías de señalización [14-18] (Figura 2).

Proliferación

Diferentes evidencias indican que la proliferación de células precursoras neurales (CPN) es favorecida por la generación de ERO. En CPN derivadas de hipocampo embrionario, se generan ERO en condiciones basales. A su vez, estas ERO promueven la proliferación de estas células ya que al disminuirlas con diferentes antioxidantes e inhibidores de la NOX, se reduce la proliferación [27]. Cuando estas CPN son mantenidas en cultivos de baja densidad, se incrementa tanto la generación de ERO como la proliferación, lo que se revierte por un tratamiento con antioxidantes [28]. En este sentido, la administración *in vivo* del antioxidante ácido α -lipoico reduce la

proliferación celular en la zona subgranular dentada del hipocampo [28].

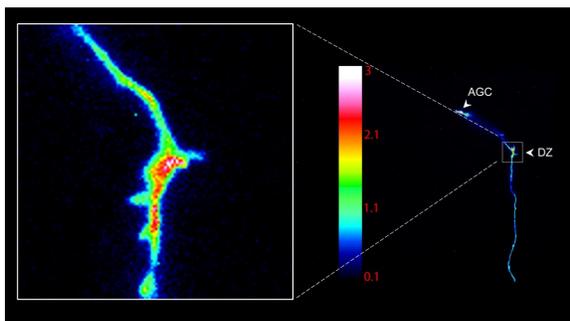


Figura 2. El peróxido de hidrógeno es producido de manera diferencial en las distintas partes de la neurona. La micrografía muestra una neurona transfectada con un sensor de peróxido de hidrógeno (HyPer). Las flechas indican los sitios de mayor crecimiento axonal: cono de crecimiento (AGC) y zona dinámica (DZ). Estos sitios coinciden con las zonas de mayor concentración de peróxido de hidrógeno. La barra indica los niveles relativos de peróxido. El recuadro muestra una ampliación de una de las zonas de alto crecimiento (DZ). Modificado de [68].

No sólo en este modelo las ERO regulan la proliferación, en cultivos de neuroesferas obtenidos de la zona subventricular de embriones y adultos de ratón, una condición de bajos niveles de ERO favorece su autorrenovación. Por el contrario, una disminución de la formación de neuroesferas por bajas concentraciones de factor de crecimiento epidermal lleva a una reducción de la generación de ERO. Si ésta se restablece por inductores de ERO, la formación de neuroesferas se restablece también [29]. Interesantemente, la mayor parte de las CPN se encuentran en las neuroesferas provenientes de las células con mayor cantidad de ERO [29]. En congruencia con estos estudios, se ha visto que las células con mayor generación de ERO poseen una mayor capacidad de autorrenovación que las células con bajos niveles de ERO.

Por otra parte, se ha detectado que la enzima NOX 2 parece tener un papel importante en la proliferación. Al adicionar Factor Neurotrófico Derivado de Cerebro (BDNF) a los cultivos de la zona subventricular, se incrementan los niveles de ERO y se favorece la formación de neuroesferas; si al mismo tiempo se adiciona un antioxidante o un inhibidor de la NOX, los niveles de ERO disminuyen y por consiguiente la formación de neuroesferas. Consistente con esto, los cultivos de la zona subventricular de ratones deficientes de NOX 2, desarrollan una menor cantidad de neuroesferas y poseen menores niveles de ERO que los cultivos obtenidos a partir de ratones silvestres [29].

In vivo, la mayor generación de ERO está concentrada a zonas neurogénicas como la capa glomerular del bulbo olfatorio, el giro dentado y la zona subventricular [29, 30]. La inhibición farmacológica de la NOX disminuye significativamente la generación de ERO y la proliferación en la zona subventricular. Acorde a esto, los ratones deficientes de NOX 2, poseen un menor número de células proliferando en la zona subventricular en comparación con los animales silvestres. Además, la migración de las células hacia el bulbo olfatorio también se ve afectada [29]. Además, el peróxido de hidrógeno formado induce la oxidación de la fosfatasa PTEN en estas células. En los ratones *knock out* para PTEN, ni el peróxido de hidrógeno ni el BDNF estimularon la formación de neuroesferas. Así, el efecto de las ERO en las células precursoras neuronales parece estar mediado por la inactivación redox de PTEN [29]. En este sentido, se sabe que el peróxido de hidrógeno active la vía PI3K/Akt/mTOR a través de la inactivación de PTEN [31].

Diferenciación neuronal

En diferentes modelos de diferenciación, las ERO tienen una participación clave, ya que si éstas son inhibidas, el proceso de diferenciación no se completa. Uno de los modelos más utilizados para el estudio de la diferenciación es la línea celular PC 12, en donde se ha observado que cuando la neurotrofina NGF se une a su receptor TrkA, se desencadena una vía de señalización que activa la vía RAS-MAPK; esto conduce a la activación sostenida de Erk1/2, que es necesaria para que ocurra el crecimiento neurítico, así como la expresión de diferentes marcadores neuronales. Por otra parte, la activación del receptor TrkA también conduce a la activación de la fosfolipasa C γ , que a su vez activa a la proteína PKC, lo cual contribuye a la activación de Erk1/2 vía Raf [20, 32-34].

La activación de receptores tirosina cinasas como de Erb 3 y 4 por neuroregulinas o la activación de TrkA por NGF, inducen un incremento rápido de ERO que es esencial para que se lleve a cabo el proceso de diferenciación neuronal, ya que si estas ERO son inhibidas por antioxidantes e inhibidores de la NOX o por la supresión de esta, no se produce el crecimiento neurítico ni el aumento de expresión de diversos marcadores neuronales. Esta generación de ERO induce la activación de TrkA, fosfolipasa C γ , PI3K [20], RAS, Erk 1/2 [32, 35], aumenta la fosforilación de tirosinas y activa al factor de transcripción AP-1, lo que a su vez, conduce la expresión de genes implicados en la diferenciación neuronal [34].

Las ERO generadas por el estímulo de NGF, son producidas específicamente por la enzima NOX, ya que el dominante negativo de RAC1 (DN RAC) inhibe la activación de AP-1 y el crecimiento neurítico [34]. Aunque la generación de ERO es indispensable para que se active la vía RAS-MAPK, es precisamente la activación de RAS otro factor que desencadena una producción de ERO, por lo que RAS podría actuar como un punto de control en cuanto a la generación de ERO en las células PC 12 [35].

La inducción de ERO por sí sola es suficiente para desencadenar los procesos de diferenciación neuronal. Por ejemplo, en el neuroblastoma SH-SY5Y, los ácidos retinóico y docosahexaenóico inducen la diferenciación neuronal, a través de la generación de ERO [36, 37]. Estas ERO también pueden producirse en ausencia de un factor, esto puede lograrse adicionando oxidantes directamente al cultivo o modificando las concentraciones de oxígeno. En condiciones de hiperoxia las concentraciones de ERO aumentan y a su vez, éstas inducen una activación sostenida de la vía MAPK, mientras que la presencia de antioxidantes en estas condiciones inhibe la diferenciación neuronal inducida por hiperoxia [38].

No se conoce con exactitud sobre qué puntos específicos de las vías de señalización están actuando las ERO, sin embargo una posibilidad es que sea a través de la inhibición de las proteínas fosfatasa de tirosina, ya que la fosforilación de tirosinas y la fosforilación del receptor TrkA aumentan en respuesta a las ERO inducidas por NGF y disminuyen en condiciones antioxidantes. Al mismo tiempo, las ERO podrían estar activando a una proteína cinasa en particular. Ambas posibilidades podrían estar actuando en conjunto.

Por lo anterior, modelos en los que sólo se adicionan condiciones oxidantes podrían arrojar información sobre los procesos que están siendo regulados por las ERO. Cuando se adiciona la enzima oxidasa de xantina y su sustrato (xantina de sodio) se generan ERO, específicamente anión superóxido y peróxido de hidrógeno. Este sistema induce el crecimiento neurítico de las células PC 12 y el aumento de expresión de MAP2, GAP 43 y neurofilamento L. Lo mismo ocurre cuando se adiciona un catalizador de la oxidación de proteínas, el cloruro de cobalto. La inducción de la diferenciación neuronal bajo estas condiciones sólo puede ser interrumpida por inhibidores de PKC ϵ , por lo que la regulación redox de esta enzima es trascendental para que se lleve a cabo el proceso de diferenciación [32, 39].

Por otro lado, en cultivos primarios de células precursoras neurales, parece ser que los niveles de ERO están directamente relacionados con el destino final de la célula. En cultivos de CPN obtenidas de corteza, las células que poseen altas concentraciones de ERO se diferencian a neuronas, las cuales poseen niveles más altos de ERO que sus células progenitoras [40]. Lo mismo ocurre en los cultivos de CPN obtenidas de la zona subventricular en donde si se produce un aumento de ERO se incrementa significativamente la formación de neuronas. Por el contrario, la inhibición de la NOX disminuye el número final de neuronas. Además, los cultivos derivados del ratón deficiente de NOX 2, producen significativamente menos neuronas [29].

La participación de las ERO en la diferenciación de las CPN corticales podría estar regulando diferentes características del proceso de diferenciación. Cuando las CPN son seleccionadas por su baja producción de ERO, éstas producen atrociitos, oligodendrocitos y neuronas. Estas neuronas son de dos tipos: a) el tipo 1 es predominante en número, poseen morfología piramidal, múltiples neuritas de tamaño similar y disparan un único potencial de acción. b) el tipo 2 son neuronas con un soma redondo, poseen pocas neuritas, expresan calretinina en el núcleo y disparan potenciales de acción repetidos. Las condiciones antioxidantes invierten la proporción de estas células, aumentando el número de neuronas tipo 2 [30].

Todas estas evidencias sugieren que existe una fuerte relación entre un incremento de la generación de ERO y la adquisición de un fenotipo neuronal. Sin embargo, resulta difícil discernir que tanto contribuyen a los incrementos de ERO observados *in vivo* los procesos de proliferación y diferenciación. Por otro lado, existe controversia acerca de si las células progenitoras generan una mayor cantidad de ERO en comparación con las células diferenciadas [28-30, 33, 40, 41]. Una posible respuesta a esto podría encontrarse en la relación entre la distribución subcelular de la generación de estas ERO y en los tiempos en los cuales éstas se generan (Figura 2). Por ejemplo, en la línea celular PC 12, los estímulos que producen una exposición prolongada de ERO, como la inducida por NGF y neuroregulina, promueven la diferenciación neuronal; mientras que inductores que causan una producción corta de ERO, como EGF, promueven proliferación y no diferenciación [20, 35, 42].

Crecimiento y orientación axonal

El cono de crecimiento axónico es una estructura altamente especializada que se encuentra en las puntas de axones y dendritas, cuya función es la orientación y el crecimiento axonal y dendrítico (figura 3). El cono de crecimiento axónico se compone de una región periférica (región P), una región de transición (región T) y una región central (región C) (Figura 3a). La

región P se compone de filopodios y lamelipodios, la región T por arcos de actina y la región C, se compone por haces de microtúbulos. Los filopodios y lamelipodios son estructuras formadas por filamentos de actina (Figura 3b). Estas estructuras son altamente dinámicas y sufren continuamente protrusiones y retracciones, mientras que en la región C se encuentran las vesículas y organelos [43].

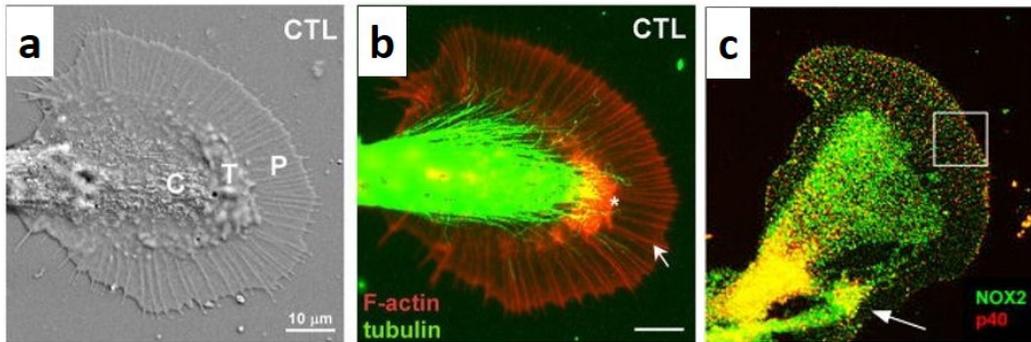


Figura 3. Estructura del cono de crecimiento y distribución de NOX2. (a) imagen de un cono de crecimiento de *Aplysia* mostrando los dominios central (C), de transición (T) y periférico (P), así como lamelipodios y filopodios localizados en la zona P. (b) Imagen superpuesta de fibras de microtúbulos (verde) y de F-actina (rojo) en los filopodios y entre los filopodios en el dominio P. El dominio C es rico en organelos y microtúbulos. (c) Superposición de NOX2 (verde) y p40 (subunidad necesaria para activar NOX, rojo). La localización de NOX2 es más fuerte en el dominio C y el inicio del axón. Se observa poca superposición de NOX2 y p40 en la periferia del cono de crecimiento pero más co-localización en el inicio del axón (flecha). Adaptado de [43].

Para que se lleve a cabo el crecimiento axonal, se requiere que la región P avance, seguida subsecuentemente del avance de la región C y la consolidación de un segmento estable del eje neurítico. Este proceso es altamente regulado por señales extracelulares que orientan y dirigen la migración de los axones en crecimiento. El resultado de estos procesos es el establecimiento de circuitos neuronales.

La participación de las ERO en el crecimiento axonal, es un proceso que se ha estudiado en los conos de crecimiento axónico de neuronas de *Aplysia*. En este modelo, los conos de crecimiento expresan NOX2 (Figura 3c) y poseen altas concentraciones de ERO principalmente acumuladas en la región C lo que favorece el crecimiento axonal, ya que si son inhibidas con antioxidantes o con inhibidores de la NOX o de la lipooxigenasa, el crecimiento axonal se reduce [43, 15].

Las ERO modulan diferentes aspectos de la dinámica del citoesqueleto de actina. Esta regulación está influida por dos aspectos, los niveles de ERO y la fuente de generación, lo cual podría estar relacionada con la localización de la generación de ERO. En este sentido se sabe que los niveles fisiológicos de ERO promueven el ensamble y protrusión de los filamentos de actina, mientras que la inhibición de NOX produce

una reducción del ensamble de actina en los filopodios y el desensamble de los haces y redes de actina. A su vez, la inhibición de la lipooxigenasa no influye en el ensamble de actina en los filopodios sino en los arcos de actina, lo que podría estar regulando a contractibilidad de dichos arcos en la región T [43].

Otra de las proteínas implicadas en la regulación del citoesqueleto en respuesta a señales extracelulares es la familia de proteínas MICAL, que son enzimas que catalizan reacciones redox para controlar la dinámica del citoesqueleto a través de su actividad de flavin monooxigenasa [44, 45]. MICAL induce la generación de peróxido de hidrógeno en respuesta a señales específicas implicadas en el crecimiento axonal como la semaforina 3A [46, 47].

La orientación del crecimiento axonal es un proceso dirigido por señales extracelulares; en respuesta a éstas, los conos de crecimiento axónico pueden ser atraídos o repelidos. La semaforina 3A es una molécula que regula el crecimiento repulsivo de los axones. Ésta actúa a través de la fosforilación de CRMP2 [48, 49]. Interesantemente, la fosforilación de CRMP2 es regulada específicamente por ERO en un mecanismo complejo que involucra a la tiorredoxina [50-52].

El peróxido de hidrógeno producido por MICAL en respuesta a semaforina 3A oxida a CRMP2, lo cual induce la formación de un enlace disulfuro entre las cisteínas 504 de dos CRMP2 [51]. El enlace disulfuro del homodímero es reducido por la tioredoxina, lo cual genera un enlace entre la tioredoxina y una molécula de CRMP2 [51]. La formación de este complejo es crucial para la fosforilación de CRMP2 por GSK-3. Una vez fosforilada, CRMP2 induce el colapso del cono de crecimiento axónico.

Finalmente, es sabido que los niveles de calcio intracelular en el cono de crecimiento axónico son reguladores clave de la movilidad de esta estructura [53]. La regulación del calcio intracelular en el cono de crecimiento axónico podría estar regulada por ERO. En neuronas de *Aplysia*, los niveles de calcio en el cono de crecimiento axónico se elevan en respuesta a serotonina en una forma dependiente de la concentración de ERO producidas por la NOX. Si se inhibe la producción de ERO con antioxidantes o si se inhibe a la enzima con inhibidores o con el dominante negativo de RAC1, no se incrementan los niveles de calcio en respuesta a serotonina. La elevación del calcio en respuesta a serotonina baja estas condiciones, puede restablecerse si se adicionan exógenamente bajas concentración de peróxido de hidrógeno. La modulación de las ERO en este modelo va en función de la oxidación directa de los receptores IP3 y rianodina en el retículo endoplasmático, disminuyendo su umbral de apertura [53, 54].

Referencias

- Pourova, J., Kottova, M., Voprsalova, M. y Pour, M. (2010) *Acta Physiol (Oxf)*. 198, 15-35.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M. y Telsler, J. (2007) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 44-84.
- Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C. (2015) *Free radicals in Biology and Medicine*, 5th Ed. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Dröge, W. (2002) *Physiol Rev.* 82, 47-95.
- Rhee, S.G. (2006) *Science*. 312, 1882-1883.
- Giorgio, M., Trinei, M., Migliaccio, E. y Pelicci P.G. (2007) *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8, 722-728.
- Salmon, A.B., Richardson, A. y Pérez, V.I. (2010) *Free Radic Biol Med.* 48, 642-655.
- Andreyev, A.Y., Kushnareva, Y.E., Murphy, A.N. y Starkov, A.A. (2015) *Biochemistry (Mosc)*. 80, 517-531.
- Angelova, P.R. y Abramov, A.Y. (2016) *Free Radic. Biol. Med.* 100, 81-85.
- Cid-Castro, C., Hernández-Espinosa, D.R. y Morán, J. (2018) *Cell Molecular and Neurobiology*. 38, 995-1007.
- Fridovich, I. (2004) *Aging Cell*. 3, 13-16.
- Bedard, K. y Krause, K.H. (2007) *Physiol Rev.* 87, 245-313.
- Brown, D.I. y Griendling, K.K. (2009) *Free Radic Biol Med.* 47, 1239-53.
- Nayernia, Z., Jaquet, V. y Krause, K.H. (2014) *Antioxid. Redox Signal.* 20, 2815-2837.
- Olguín-Albuerne, M. y Morán J. (2015) *ASN Neuro* 13: 7(2).
- Olguín-Albuerne, M. y Morán J. (2017) *Antioxidants & Redox Signaling*. 28,1603-1625.
- Olguín-Albuerne, M., Zaragoza-Campillo, M.A. and Morán, J. Role of reactive oxygen species as signaling molecules in the regulation of physiological processes of the nervous system. En: Catala A., editor. *Reactive Oxygen Species, Lipid Peroxidation and Protein Oxidation*. Nova Science Publishers. New York, USA; 2015. P. 169-203.
- Zaragoza-Campillo, M.A. y Morán, J. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017:8930406. (2017).
- Tonks, N.K. (2005) *Cell*. 121, 667-670.
- Kamata, H., Oka, S., Shibukawa, Y., Kakut, J. y Hirata H. (2005) *TrkA. Arch Biochem Biophys.* 434, 16-25.
- Sorce, S. y Krause, K.H. (2009) *Antioxid Redox Signal.* 11, 2481-2504.
- Holmgren, A., Johansson, C., Berndt, C., Lönn, M.E., Hudemann, C., Lillig, C.H. (2005) *Biochem Soc Trans.* 33, 1375-1377.
- Jönsson T.J. y Lowther W.T. (2007) *Subcell Biochem.* 44, 115-41.
- Finkel, T. (2011) *J Cell Biol.* 194, 7-15.
- Rinna A., Torres M. y Forman H.J. (2006) *Free Rad Biol Med.* 41, 86-91.
- Forman H.J., Fukuto J.M. y Torres M. (2004) *American J of Cell Phys.* 287, C246-256.
- Yoneyama, M., Kawada, K., Gotoh, Y., Shiba, T. y Ogita, K. (2010) *Neurochem. Int.* 56, 740-746.

Conclusiones

Existe una gran cantidad de estudios que demuestran que las ERO participan como señales en la regulación de una gama muy amplia de procesos fisiológicos, incluyendo el desarrollo del sistema nervioso. Debido a la naturaleza de las especies reactivas de oxígeno, su estudio resulta complicado; sin embargo, la generación de nuevas estrategias experimentales en distintos modelos ha permitido avanzar en el conocimiento de este campo. A partir de estos estudios se sabe que la acción de las ERO en estos procesos no depende solo de su concentración, sino de otros factores como el contexto celular, su compartimentalización celular y la disponibilidad, localización y capacidad redox de los blancos moleculares. Diversos estudios demuestran que la habilidad de señalización de las ERO se basa en su capacidad de reaccionar con ciertas proteínas en dominios particulares. También queda claro que esta habilidad requiere de la participación de elementos claves con capacidad de oxidoreducción como es el caso de peroxirredoxinas, tioredoxinas, glutarredoxinas, y nucleoredoxinas, entre otros.

Agradecimientos

Se agradece el apoyo recibido por el Proyecto IN212019 del PAPIIT-DGAPA, UNAM y 285184 de CONACYT

28. Limoli, C.L., Rola, R., Giedzinski, E., Mantha, S., Huang, T.T. y Fike, J.R. (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101, 16052-16057.
29. Le Belle, J.E., Orozco, N.M., Paucar, A.A., Saxe, J.P., Mottahedeh, J., Pyle, A.D., Wu, H. y Kornblum, H.I. (2011) *Cell Stem Cell.* 8, 59-71.
30. Tsatmali, M., Walcott, E.C., Makarenkova, H. y Crossin, K.L. (2006) *Mol Cell Neurosci.* 33, 345-357.
31. Leslie, N.R. (2006) *Antioxidants & redox signaling.* 8, 1765-74.
32. Gopalakrishna, R., Gundimeda, U., Schiffman, J.E. y McNeill, T.H. (2008) *J Biol Chem.* 283, 14430-14444.
33. Cassano S., Agnese S., D'Amato V., Papale M., Garbi C., Castagnola P., et al. (2010) *J Biol Chem.* 285, 24141-24153.
34. Suzukawa K., Miura K., Mitsushita J., Resau J., Hirose K., Crystal R. y Kamata T. (2000) *Transplantation.* 69, 1501-1503.
35. Goldsmit, Y., Erlich, S. y Pinkas-Kramarski R. (2001) *Cell Mol Neurobiol.* 21, 753-69.
36. Nitti, M., Furfaro, A.L., Cevasco, C., Traverso, N., Marinari, U.M., Pronzato, M.A. y Domenicotti, C. (2010) *Cell Signal.* 22, 828-35.
37. Wu, H., Ichikawa, S., Tani, C., Zhu, B., Tada, M., Shimoishi, Y., Murata, Y. y Nakamura, Y. (2009) *Biochim Biophys Acta.* 1791, 8-16.
38. Katoh, S., Mitsui, Y., Kitani, K. y Suzuki, T. (1999) *Biochem. J.* 338, 465-470.
39. Kotake-Nara, E. y Saida, K. (2007) *Neurosci Lett.* 422, 223-7.
40. Tsatmali, M., Walcott, E.C. y Crossin, K.L. (2005) *Brain Res.* 1040, 137-150.
41. Madhavan, L., Ourednik, V. y Ourednik, J. (2006) *Stem Cells.* 24, 2110-2119.
42. Ibi, M., Katsuyama, M., Fan, C., Iwata, K., Nishinaka, T., Yokoyama, T. y Yabe-Nishimura, C. (2006) *Free Radic Biol Med.* 40, 1785-1795.
43. Munnamalai V. y Suter D.M. (2009) *J of Neurochem.* 108, 644-661.
44. Van Battum, E.Y., Gunput, R.A., Lemstra, S., Groen, E.J., Yu, K.L., Adolfs, Y., Zhou, Y., Hoogenraad, C.C., Yoshida, Y., Schachner, M., Akhmanova, A. y Pasterkamp, R.J. (2014) *Nat Commun* 5, 4317-4327.
45. Vitali, T., Maffioli, E., Tedeschi, G. y Vanoni, M.A. (2016) *Arch Biochem Biophys* 593, 24-37.
46. Pasterkamp, R. J. (2012) *Nat Rev Neurosci* 13, 605-18.
47. Pasterkamp, R.J., Dai, H.N., Terman, J.R., Wahlin, K.J., Kim, B., Bregman, B.S., Popovich, P.G., Kolodkin, A.L. (2006) *Mol Cell Neurosci.* 31, 52-69.
48. Brown, M., Jacobs, T., Eickholt, B., Ferrari, G., Teo, M., Monfries, C., Qi R.Z., Leung, T., Lim, L., Hall, C. (2004) *J Neurosci* 24, 8994-9004.
49. Zhang, J., Khvorostov, I., Hong, J.S., Oktay, Y., Vergnes, L., Nuebel, E., Wahjudi, P.N., Setoguchi, K., Wang, G., Do, A., Jung, H.J., McCaffery, J.M., Kurland, I.J., Reue, K., Lee, W.N., Koehler, C.M. y Teitell M.A. (2011) *EMBO J* 30, 4860-4873.
50. Brautigam, L., Schutte, L.D., Godoy, J.R., Prozorovski, T., Gellert, M., Hauptmann, G., Holmgren, A., Lillig, C.H. y Berndt, C. (2011) *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 20532-20537.
51. Morinaka, A., Yamada, M., Itofusa, R., Funato, Y., Yoshimura, Y., Nakamura, F., Yoshimura, T., Kaibuchi, K., Goshima, Y., Hoshino, M., Kamiguchi, H., Miki, H. (2011) *Sci Signal.* 4, 170.
52. Gellert, M., Venz, S., Mitlohner, J., Cott, C., Hanschmann, E.M., Lillig, C.H. (2013) *J Biol Chem.* 288, 35117-35125.
53. Zhang, X.F. y Forscher, P. (2009) *Mol. Biol. Cell.* 20, 3700-3712.
54. Joseph, S.K., Nakao, S.K. y Sukumvanich, S. (2006) *Biochem J.* 393, 575-82.
55. Manning, P., Cookson, M.R., McNeil, C.J., Figlewicz, D. y Shaw, P.J. (2001) *Brain Res.* 911, 203-10.
56. Widmer, R., Engels, M., Voss, P. y Grune, T. (2007) *Free Radic Res.* 41, 145-152.
57. Luque, J.M., Kwan, S.W., Abell, C.W., Da Prada, M. y Richards, J.G. (1995) *J Comp Neurol.* 363, 665-680.
58. Ekblom, J., Jossan, S.S., Orelund, L., Walum, E. y Aquilonius S.M. (1994) *J Neural Transm Supp* 41, 253-258.
59. Goldberg, J.L., Vargas, M.E., Wang, J.T., Mandemakers, W., Oster, S.F., Sretavan, D.W., Barres, B.A. (2004) *J Neurosci.* 24, 4989-4999.
60. Sehgal, N., Agarwal, V., Valli, R.K., Joshi, S.D., Antonovic, L., Strobel, H.W. y Ravindranath, V. (2011) *Biochem Pharmacol.* 82, 53-64.
61. Carlson, N.G., Rojas, M.A., Redd, J.W., Tang, P., Wood, B., Hill, K.E. y Rose, J.W. (2010) *J Neuroinflammation.* 7:25-32.
62. Chen, H., Dzitoyeva, S. y Manev, H. (2010) *Neuroscience.* 171, 383-9.
63. Prasad, V.V., Nithipatikom, K. y Harder, D.R. (2008) *Neurochem Int.* 53, 220-9.
64. Reinehr, R., Görg, B., Becker, S., Qvartskhava, N., Bidmon, H.J., Selbach, O., Haas, H.L., Schliess, F. y Häussinger, D. (2007) *Glia.* 55, 758-771.
65. Mukherjea, D., Jajoo, S., Kaur, T., Sheehan, K.E., Ramkumar, V. y Rybak, L.P. (2010) *Antioxid Redox Signal.* 13, 589-598.
66. Bhatt, L., Groeger, G., McDermott, K. y Cotter, T.G. (2010) *Mol Vis.* 16, 283-93.
67. Zaragoza-Campillo, M.A. Tesis doctoral. Posgrado en Ciencias Bioquímicas, México, 2019.
68. Olguín-Albuerne, M. Tesis doctoral. Posgrado en Ciencias Biomédicas, México, 2015.



DR. JULIO MORÁN ANDRADE

Es biólogo egresado de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Realizó estudios de posgrado en la UNAM y llevó a cabo estancias posdoctorales en el Medical Research Council en Londres y en el Panum Institute en Dinamarca, así como una estancia sabática en el Children's Hospital of Philadelphia.

Es investigador del Instituto de Fisiología Celular desde 1989, donde actualmente es Investigador Titular C.

Es profesor de la Facultad de Ciencias de la UNAM donde imparte la materia de Neurobiología

desde hace 32 años.

El Dr. Morán tiene el nivel 3 en el Sistema Nacional de Investigadores y es PRIDE D. Es investigador en el área de neurociencias. Su trabajo se centra en el desarrollo del sistema nervioso y los mecanismos moleculares y celulares de la muerte neuronal programada.

Su producción consiste en 101 artículos publicados en revistas internacionales especializadas, un libro editado y 15 capítulos de

libros. Su trabajo ha sido citado más de 3,000 veces. Ha dirigido 23 tesis de licenciatura, una de especialización, 8 de maestría y 12 de doctorado.

Es miembro activo de siete sociedades científicas nacionales e internacionales. Es miembro de comisiones dictaminadoras y evaluadoras de diversos Institutos y Facultades de la UNAM y de comités editoriales de dos revistas científicas internacionales.