



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**"PARTICIPACIÓN DE Bcl-2, BAX Y CITOCROMO C EN LA
MUERTE OBSERVADA EN CULTIVOS DE CÉLULAS
GRANULARES DEL CEREBELO"**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGA**

PRESENTA:

DANIELA PEDROZA PÁEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JULIO EDUARDO ROQUE MORAN ANDRADE



MÉXICO, D.F.



283293



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.



INSTITUTO NACIONAL
DE ESTUDIOS PROFESIONALES
DE LA FACULTAD DE CIENCIAS



MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

Participación de Bcl-2, Bax y citocromo c en la muerte observada en cultivos de células granulares del cerebelo

realizado por Daniela Pedroza Páez

con número de cuenta 9450332-4, pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dr. Julio Eduardo Roque Morán Andrade

Propietario

Q. Silvestre de Jesús Alavez Espidio

Propietario

Dra. Silvia Devars Ramos

Suplente

Biol. Miguel Angel Palomino Garibay

Suplente

Biol. Andrea Caballero Benítez

Consejo Departamental de Biología

Edna María Suárez
Dra Edna María Suárez

Este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Julio Morán Andrade en el laboratorio 224-N del Departamento de Neurociencias, en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se recibió apoyo del donativo 400346-S-25521N de CONACYT.

Daniela Pedroza Páez fue becaria del Programa de Becas para tesis de Licenciatura (Fundación UNAM).

A mi ma y mi pa por aguantarme y quererme como soy. A ellos, a mis hermanos (Luis, Aleja, Jorge, Eduardo y Alejo) y agregados (Fernando, Natalia, Xochitl, Nicolasa y los Danys) por hacer de esta familia un hogar agradable y reconfortante. A Fernando, Alejo, Mariano y Juan Pablo por ser la alegría de mi vida. A mis abuelos.

A mis sinodales Dr. Julio Morán, M. En C. Silvestre Alavéz Espidio, Dra. Silvia Devars, Biol Andrea Caballero y Biol. Miguel Angel Palomino por su asesoría y apoyo.

A Andy, Toño, Lupita, Clau, Sugela, Marce y Alette, por hacer la vida del laboratorio un espacio tan agradable y por su gran ayuda y amistad.

A Silver por haberme formado como maestro y como amigo.

A Julio por darme su apoyo y confianza.

A mis invaluable amigos de la fac., especialmente a Maika, Vero, Héctor, Rodrigo, Pili, Omar, Luis, Dulce, Lalo, Rosa, Laura, Norman, Joaco y demás.

A las chanas, sobre todo a Heidi, Katja, Katia y Ale.

A Ale, Mary y Caro por ser parte de mi vida.

A Uriel por sus oraciones

INDICE

I.- INTRODUCCION

1.- ASPECTOS BÁSICOS	1
1.1 Desarrollo del cerebelo	1
1.2 Histogénesis del cerebelo	5
2.- MUERTE CELULAR PROGRAMADA DURANTE EL DESARROLLO	9
2.1 Caracterización morfológica y bioquímica	9
2.2 Genes involucrados en la regulación de la muerte	11
2.3 Participación de proteínas de la familia Bcl-2 en la muerte apoptótica	15
2.4 La liberación del citocromo c de la mitocondria como parte del proceso apoptótico.	17
3. - FACTORES TROFICOS DURANTE EL DESARROLLO	21
3.1 Aminoácidos como factores tróficos	22
3.1.1 Receptor tipo NMDA	23
II.- ANTECEDENTES	26
III.- OBJETIVOS	29
IV.- METODOLOGIA	30
V.- RESULTADOS	34
VI.- DISCUSION	52
VII.- CONCLUSIONES	60
VIII.- BIBLIOGRAFIA	62

I.- INTRODUCCIÓN

1- ASPECTOS BÁSICOS

Las funciones del sistema nervioso están determinadas en gran medida por su citoarquitectura, la cual define la distribución y las interacciones entre los diferentes tipos celulares que lo componen. La organización de las complejas redes de conexiones neuronales adquiere su arreglo básico principalmente durante las etapas embrionarias y en algunos casos en etapas postnatales tempranas y es el resultado del desarrollo de las poblaciones neuronales y gliales a través de los procesos sofisticados, ocurridos durante la neurogénesis. Durante el desarrollo del sistema nervioso es de suma importancia la recepción de señales externas que funcionarán en un proceso de selección, ya sea como un estímulo degenerativo o como un estímulo trófico, definiendo para cada neurona su muerte y remoción o su sobrevivencia y establecimiento como parte estructural y funcional definitiva dentro del sistema nervioso de un organismo.

El cerebelo es una estructura del sistema nervioso que muestra divisiones estructurales y funcionales definidas, las cuales están relacionadas con diferentes partes del cerebro en un sistema integral de entrada y salidas de señales. El cerebelo está involucrado en funciones motoras, controlando la coordinación, la velocidad y la precisión de las contracciones musculares de los miembros y de los ojos, así como el equilibrio y postura del cuerpo. La conformación de la corteza cerebelar por pocos tipos neuronales y su arreglo en capas conspicuas, aunado al conocimiento que actualmente se tiene sobre los eventos que ocurren durante el desarrollo del cerebelo, hacen del cerebelo un modelo accesible e interesante para el estudio de los procesos del desarrollo en el sistema nervioso central.

1.1 Desarrollo del cerebelo

El desarrollo del sistema nervioso comienza a partir de una capa de células neuroectodermales que forman una estructura aplanada sobre la superficie dorsal del embrión llamada placa neural. Posteriormente, los márgenes de la placa neural se elevan para formar los pliegues neurales, los cuales se pronuncian más y se doblan hacia la línea media, donde se fusionan desde la región anterior, hasta la posterior, para formar el tubo neural. El tubo neural se compone de una capa interna, que forma la pared del lumen,

llamada zona ventricular y dos capas concéntricas más superficiales, la zona intermedia y la zona marginal. En etapas posteriores del desarrollo se forman tres vesículas en el extremo rostral del tubo neural que van a dar origen a diferentes estructuras del cerebro adulto, llamadas prosencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo. El rombencéfalo, a su vez, da origen al metencéfalo y al mielencéfalo.

El cerebelo se origina a partir de la placa alar de la porción metencefálica del tubo neural, como un engrosamiento bilateral que forma los llamados labios rómbicos, los cuales posteriormente se fusionan sobre la línea media dorsal, regidos por un gradiente rostral a caudal, formando el vermis. Posteriormente los elementos laterales se desarrollan en los hemisferios cerebelares, por lo que en el plano longitudinal, el cerebelo adulto presenta una estructura en la región media, llamada vermis y los hemisferios cerebelares localizados a ambos lados del vermis (figura 1). En etapas posteriores del desarrollo del cerebelo aparecen 2 fisuras transversales que dividen al cerebelo en 3 lóbulos. La fisura posterolateral divide al cerebelo en el lóbulo floculonodular y el cuerpo cerebelar, el cual es dividido a su vez, por la fisura primaria en el lóbulo anterior y el lóbulo posterior (figura 1).

El cerebelo adulto está constituido en la región externa por la corteza cerebelar y hacia el interior por la materia blanca y tres núcleos profundos, de los cuales salen las aferentes del cerebelo, principalmente hacia la corteza cerebral y el tallo cerebral. La corteza cerebelar está compuesta por cinco tipos neuronales: las células en canasta, las células estrelladas, las células de Golgi, las células de Purkinje y las células granulares, las cuales se distribuyen en tres capas corticales. En la capa más externa o capa molecular se encuentran las células en canasta y las células estrelladas, las cuales funcionan como interneuronas inhibitorias, así como los axones de las células granulares y los árboles dendríticos de las neuronas de Purkinje. La capa de neuronas de Purkinje se compone de somas de las células de Purkinje, que se arreglan en una hilera. En la capa más interna o granular se localizan las neuronas granulares y los somas de las células de Golgi (Figura 2 A).

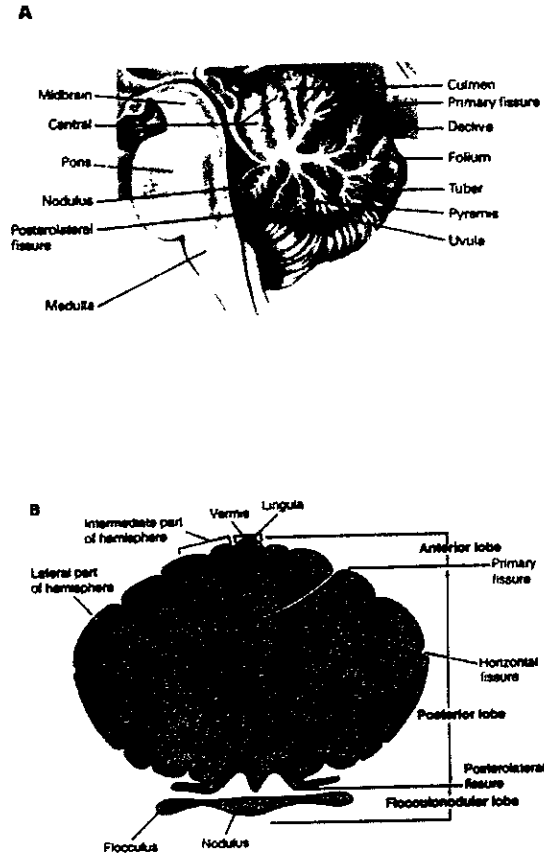


Figura 1

A. Sección medio-sagital a través del tallo cerebral y cerebelo, que muestra las estructuras foliadas del cerebelo (Kandel, 1991)

B. La fisura primaria divide al cuerpo del cerebelo en lóbulos anterior y posterior. La fisura posterolateral separa el lóbulo floculonodular. El cerebelo tiene tres regiones funcionales: el vermis central y las zonas lateral e intermedia en cada hemisferio.

La entrada de información hacia el cerebelo llega a través de dos tipo de contactos aferentes, de tipo excitador. Las fibras trepadoras provienen del núcleo olivar y forman sinapsis, que utilizan el ácido aspártico o el glutámico como neurotransmisor, con las fibras dendríticas de las células de Purkinje. Por otro lado, las fibras musgosas que se originan en algunos núcleos del tallo cerebral y de neuronas de la médula espinal que dan origen a los tractos espinocerebelares, forman contactos en la capa granular con las dendritas de las neuronas granulares y con axones de las células de Golgi, formando los glomérulos cerebelares (figura 2 B).

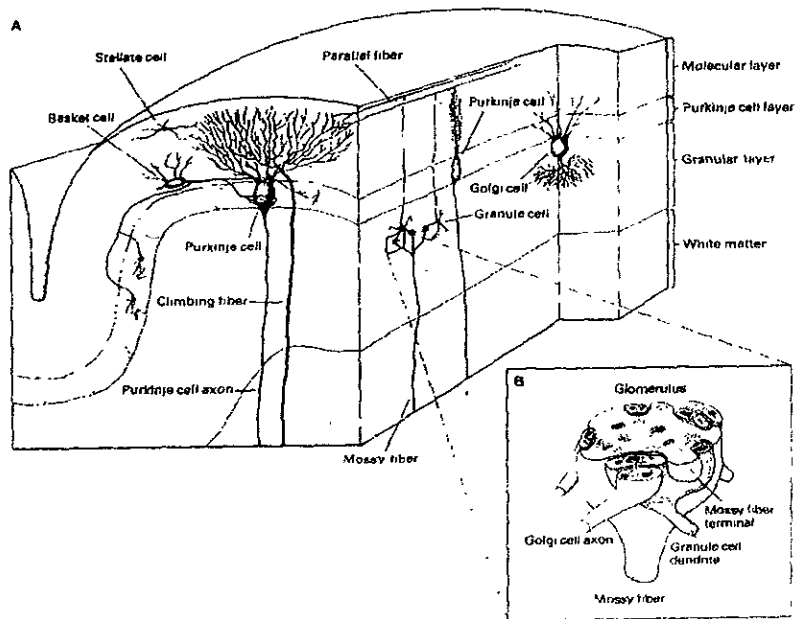


Figura 2

Organización de las células que conforman la corteza cerebelar en 3 capas (Kandel, 1991).

A: corte vertical de un folium cerebelar. B: glomérulo cerebelar en la capa granular, en el que una fibra musgosa hace contacto con los axones de las células de Golgi y las células granulares.

La única salida de información de la corteza cerebelar se lleva a cabo a través de los axones de las células de Purkinje, los cuales se dirigen hacia la materia blanca, y establecen sinapsis de tipo inhibitorio que utilizan el ácido gamma-aminobutírico (GABA)

como neurotransmisor. La aferencia de información al cerebelo determina la actividad de las neuronas de Purkinje a través de la conexión directa de las fibras trepadoras y de la acción indirecta de las fibras musgosas a través del contacto con las células granulares. Esta actividad también es modulada a través de los contactos con las células en canasta y las células estrelladas, las cuales funcionan como interneuronas inhibitorias.

1.2 Histogénesis del cerebelo

Durante el desarrollo del sistema nervioso se pueden reconocer una serie de eventos básicos, por los que pasan todas las poblaciones neuronales, que son: la proliferación, la migración, la diferenciación, la formación de procesos y establecimiento de sinapsis y la muerte celular. Los tiempos y factores involucrados en estos eventos son distintos para cada tipo celular.

Las neuronas que forman la corteza del cerebelo se originan a partir de dos zonas de proliferación separadas. Las células de Purkinje, las células de Golgi y algunos tipos de células gliales provienen de células de la matriz ventricular en el labio rómbico que migran hacia la parte externa en dirección de la pia madre, para formar la capa del manto de la placa cerebelar (en el caso de la rata esto ocurre antes del día embrionario 17). En etapas posteriores del desarrollo, de esta capa migran hacia la parte interna del cerebelo las células que originan a las células de Golgi, mientras que las células que se diferencian en las neuronas de Purkinje migran menos profundamente para constituir la capa de células de Purkinje. Las células granulares, las células en canasta y las células estrelladas se derivan de células germinales que tienen su origen en el labio rómbico y que migran a través de la superficie externa de las placas cerebelares, para establecer la capa granular externa, constituida por células en proliferación. Después del nacimiento del organismo, las células originadas a partir de esta capa migran hacia la región más profunda de la corteza cerebelar y esta capa desaparece. Algunas células migran sólo hasta la capa molecular y se diferencian en las células en canasta y las estrelladas, mientras que las células precursoras de las neuronas granulares atraviesan la capa molecular y la capa de neuronas de Purkinje para formar la capa granular interna, en donde se diferencian, al igual que las células de Golgi.

Las células de Purkinje:

Estas células se originan antes de que se produzcan los otros tipos neuronales, en el caso de la rata en los días embrionarios 12 a 15 y posteriormente migran y se alinean en una capa de una célula de grosor en el día postnatal 4. Las neuronas de Purkinje comienzan a diferenciarse entre los días 4 a 20 postnatales y su árbol dendrítico se extiende en toda la capa molecular (Figura 3). Estas neuronas reciben contactos de cuatro tipos neuronales, los cuales se establecen en diferentes regiones celulares (Figura 4). Dos de estas conexiones sinápticas son de tipo excitador, como es el caso del contacto que establecen las fibras trepadoras con el soma y a lo largo del árbol dendrítico de las células de Purkinje (en los días 5 a 7 postnatales) y el que establecen las fibras paralelas de las células granulares sobre las espinas dendríticas (a partir del día 15 postnatal). Las otras dos, son sinapsis inhibitorias que forman los axones de las células estrelladas sobre sus dendritas primarias y secundarias y las células en canasta sobre su soma. Los axones de las células de Purkinje son la única salida de información del cerebelo y se dirigen principalmente a núcleos cerebelares centrales y núcleos vestibulares, donde establecen sinapsis de tipo inhibitorio, que utilizan GABA como neurotransmisor. De esta manera, la célula de Purkinje tiene que integrar la información que entra a la corteza cerebelar, la cual recibe directa o indirectamente a través de los diferentes componentes de la red cerebelar, para definir su actividad y codificar el mensaje que transmitirá a su célula blanco.

Las neuronas estrelladas:

Estas interneuronas se localizan en la parte externa de la capa molecular y hacen sinapsis con las dendritas de las neuronas de Purkinje, inhibiéndolas probablemente mediante la liberación de GABA (Figura 4). Se diferencian en la rata entre los días postnatales 8 a 11.

Las neuronas en canasta:

En la rata, estas células se diferencian de las células germinales de la capa molecular externa en los días 6 a 7 postnatales y posteriormente se conectan con el soma de las células de Purkinje y ejercen su inhibición mediada por GABA (Figura 4).

Las neuronas de Golgi:

La mayoría de estas células se producen después del nacimiento. En el cerebelo adulto, su soma se encuentra en la capa granular y su árbol dendrítico se extiende hasta la capa molecular, donde recibe la aferencia de tipo excitador de las fibras paralelas de las células granulares. En la capa granular su terminal forma sinapsis, que utilizan al GABA como neurotransmisor, con dendritas de las células granulares, dentro de los glomérulos cerebelares (Figura 4).

Las neuronas granulares:

Son las células más pequeñas (5 a 8 μ de diámetro) y numerosas en el cerebelo (aprox. 10^{11}), que ocupan aproximadamente 1/3 de la masa total del cerebelo. Las células precursoras de las células granulares en proliferación forman una capa que llega a cubrir toda la superficie externa del cerebelo en los días embrionarios 13 a 16. En las ratas recién nacidas esta zona proliferativa alcanza un grosor de 4 a 5 células y bajo ésta se forma, días más tarde, una capa de células no mitóticas premigratorias de 2 a 3 células de grosor, que aumenta de tamaño entre los 7 y 10 días. A partir del día 11 se observa una reducción del tamaño de la zona proliferativa y más tarde de la zona premigratoria y finalmente desaparece entre los días 20 a 25 (Figura 3). Los somas de las células precursoras de las células granulares migran de la zona premigratoria a través de la capa molecular y la capa de células de Purkinje para formar la capa granular interna. Este proceso tiene una duración de aproximadamente 3 días. El movimiento de estas células se relaciona con interacciones con los procesos de la glia de Bergman y parece estar influenciado por el efecto de las concentraciones extracelulares de glutamato sobre los receptores de tipo NMDA (N-metil-D-aspartato) que se expresan tempranamente en las células granulares. Durante la segunda semana postnatal se forma la masa de células granulares en la capa granular interna y durante la tercera semana sus axones en la capa molecular se bifurcan en forma de "T", originando dos fibras delgadas (0.2 μ) y largas (1.6 mm) en la rata. Entre la segunda y tercera semana postnatal estas fibras establecen conexiones de tipo excitador, utilizando ácido glutámico como neurotransmisor, con las espinas dendríticas de las células de Purkinje y con dendritas de las células estrelladas, en canasta y Golgi (Figura 4). A partir de los 5 días postnatales comienzan a entrar las aferencias a la capa granular y alrededor de los 12 empiezan a formarse las sinapsis con las neuronas granulares, constituyendo los glomérulos, los cuales incrementan su complejidad en la tercera semana postnatal.

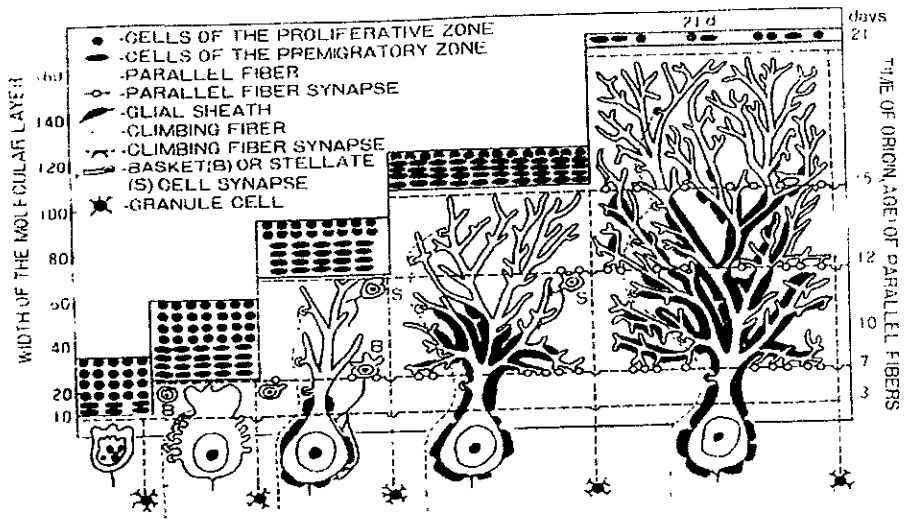


Figura 3

Desarrollo de las neuronas de la corteza del cerebelo y formación de las capas a través del tiempo (Ito, 1984).

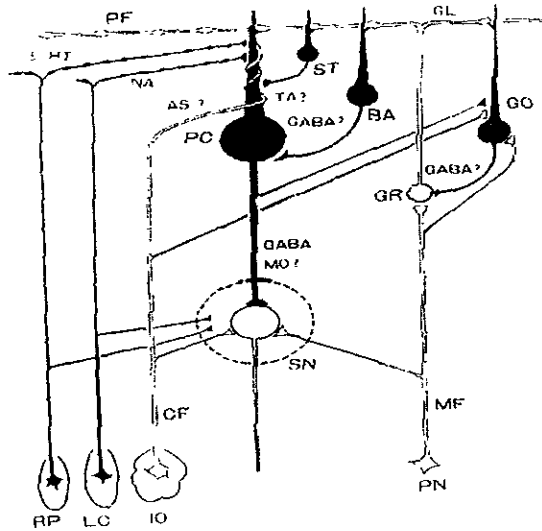


Figura 4

Tipos celulares que componen la corteza cerebelar y sus aferencias y posibles neurotransmisores que utilizan (Ito, 1984). PC, células de Purkinje; GO, células de Golgi; BA, células en canasta; PF, fibras paralelas; MF, fibras musgosas; CF, fibras trepadoras; SN, célula nuclear, vestibular o cerebelar; PN, neurona precerebelar que emite la fibra musgosa; IO, olivar inferior; LC, locus coeruleus; RP, núcleo raphe.

En el transcurso de la neurogénesis se observa la sobreproducción de varios tipos neuronales, seguida por la muerte de un gran porcentaje de la población, lo cual se ha interpretado como una estrategia evolutiva determinante para establecer el número correcto de neuronas y las conexiones apropiadas que finalmente permanecerán como constituyentes del sistema nervioso maduro (Oppenheim, 1991). De esta manera, se ha observado que durante el desarrollo del cerebelo hay una considerable pérdida (20-30%) de neuronas granulares en etapas postnatales, como parte del modelaje de la red neuronal en la corteza cerebelar (Wood et al, 1993).

En las últimas décadas se ha estudiado esta muerte masiva ocurrida durante el desarrollo del sistema nervioso y se ha encontrado que, a diferencia de la muerte necrótica, la cual ocurre en casos patológicos como resultado de daño celular extremo, esta muerte es de tipo apoptótica (Raff et al, 1993).

2.- MUERTE CELULAR PROGRAMADA DURANTE EL DESARROLLO

2.1 Caracterización morfológica y bioquímica

En términos generales se pueden distinguir dos tipos de muerte celular en los organismos: la necrosis y la apoptosis (Figura 5). La **necrosis** es un tipo de muerte celular que se caracteriza por la dilatación del retículo endoplásmico, incremento en el volumen mitocondrial, e hinchamiento celular que resulta en la ruptura osmótica de la célula, que al liberar su contenido al espacio extracelular, daña a las células adyacentes, provocando un proceso inflamatorio. Por otra parte, la **apoptosis** es un proceso de muerte celular programada, que ocurre de manera natural en todos los organismos, tanto en el desarrollo, como en el estado adulto. El desarrollo normal de los organismos depende de que ciertas células mueran de manera apoptótica en procesos que incluyen: la regresión de órganos vestigiales, como en el caso de la pérdida de la cola en embriones de vertebrados en desarrollo y el ajuste del tamaño de poblaciones celulares después de un periodo inicial de producción excesiva, como en el caso del sistema nervioso.

En el transcurso de la neurogénesis se observa la sobreproducción de varios tipos neuronales, seguida por la muerte de un gran porcentaje de la población, lo cual se ha interpretado como una estrategia evolutiva determinante para establecer el número correcto de neuronas y las conexiones apropiadas que finalmente permanecerán como constituyentes del sistema nervioso maduro (Oppenheim, 1991). De esta manera, se ha observado que durante el desarrollo del cerebelo hay una considerable pérdida (20-30%) de neuronas granulares en etapas postnatales, como parte del modelaje de la red neuronal en la corteza cerebelar (Wood et al, 1993).

En las últimas décadas se ha estudiado esta muerte masiva ocurrida durante el desarrollo del sistema nervioso y se ha encontrado que, a diferencia de la muerte necrótica, la cual ocurre en casos patológicos como resultado de daño celular extremo, esta muerte es de tipo apoptótica (Raff et al, 1993).

2.- MUERTE CELULAR PROGRAMADA DURANTE EL DESARROLLO

2.1 Caracterización morfológica y bioquímica

En términos generales se pueden distinguir dos tipos de muerte celular en los organismos: la necrosis y la apoptosis (Figura 5). La **necrosis** es un tipo de muerte celular que se caracteriza por la dilatación del retículo endoplásmico, incremento en el volumen mitocondrial, e hinchamiento celular que resulta en la ruptura osmótica de la célula, que al liberar su contenido al espacio extracelular, daña a las células adyacentes, provocando un proceso inflamatorio. Por otra parte, la **apoptosis** es un proceso de muerte celular programada, que ocurre de manera natural en todos los organismos, tanto en el desarrollo, como en el estado adulto. El desarrollo normal de los organismos depende de que ciertas células mueran de manera apoptótica en procesos que incluyen: la regresión de órganos vestigiales, como en el caso de la pérdida de la cola en embriones de vertebrados en desarrollo y el ajuste del tamaño de poblaciones celulares después de un periodo inicial de producción excesiva, como en el caso del sistema nervioso.

La **apoptosis** se ha caracterizado en base a ciertos cambios morfológicos y bioquímicos específicos. Entre los cambios morfológicos asociados a este tipo de muerte se ha descrito la compactación de la cromatina nuclear, la condensación del citoplasma, que provoca el encogimiento de la célula, la fragmentación del núcleo en paquetes discretos y la formación de porciones de membrana plasmática que contienen en su interior material nuclear y organelos, llamados cuerpos apoptóticos. Los cuerpos apoptóticos resultantes de este proceso de muerte fisiológica pueden ser integrados por las células adyacentes (principalmente macrófagos) y degradados en su interior, por lo que la muerte apoptótica de una célula no tiene efectos dañinos sobre las células adyacentes. Los cambios bioquímicos relacionados con la apoptosis son: la activación de una transglutaminasa específica, la activación de proteasas de cisteína tipo ICE/ced-3 y la fragmentación por endonucleasas del ácido desoxiribonucleico (ADN) nuclear en las regiones de unión entre los nucleosomas, formando fragmentos de múltiplos de aproximadamente 185 pb, lo cual puede ser visualizado en forma de una escalera en un gel de agarosa.

La muerte apoptótica es un proceso activo determinado por un programa genético, el cual puede ser activado como respuesta a cierta señal externa, como la privación de algún factor de crecimiento u hormona, la exposición a determinadas concentraciones de compuestos tóxicos o radiaciones, o la unión del ligando a receptores relacionados con la promoción de la muerte (Fas/Apo1 y el receptor a TNF), entre otras. La misma señal puede causar la sobrevivencia o la muerte, dependiendo del estado de maduración celular y/o las características de la señal (concentración, duración, etc.). La regulación precisa del proceso apoptótico es esencial para el desarrollo óptimo de los organismos, ya que se ha encontrado que alguna falla en esta regulación puede llevar a la etiología de varias enfermedades, como el cáncer, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), enfermedades autoinmunes y enfermedades neurodegenerativas.

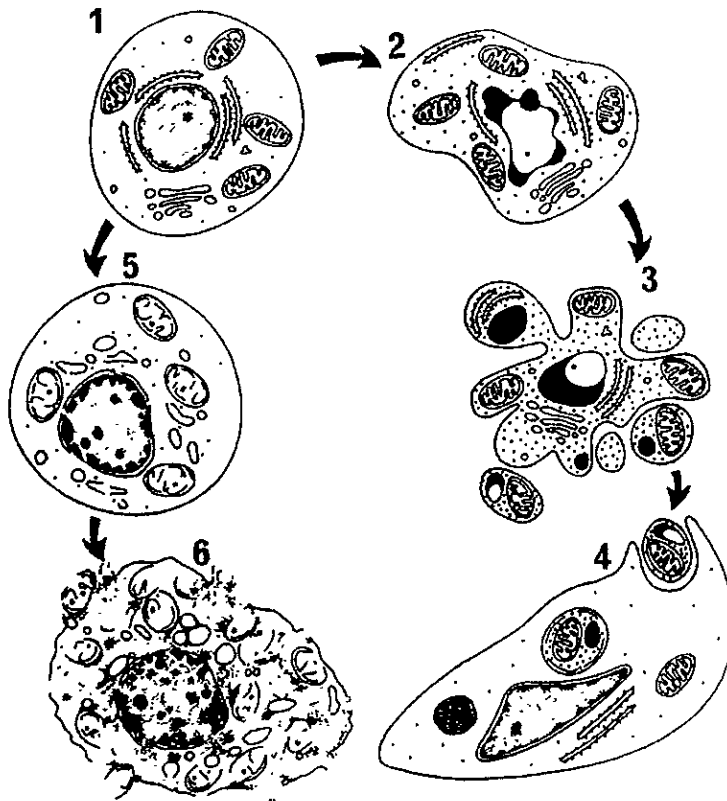


Figura 5

Secuencia de cambios morfológicos en la apoptosis (derecha) y necrosis (izquierda). (1) Célula normal. (2) Compactación y segregación de la cromatina, condensación del citoplasma y convulsión de los lineamientos del núcleo. (3) Fragmentación nuclear y formación de protuberancias en la superficie celular, las cuales se separan para producir los cuerpos apoptóticos, que son fagocitados y digeridos por células adyacentes (4). (5) señales de necrosis temprana en una célula dañada irreversiblemente, aglutinación de la cromatina en masas, hinchamiento de organelos y aparición de densidades floculantes en la matriz de la mitocondria. (6) Las membranas se rompen y la célula se desintegra (Tomei, 1991).

2.2 Genes involucrados en la regulación de la muerte apoptótica

Se ha encontrado, que el proceso de muerte apoptótica es un evento conservado a través de la evolución animal, ya que se han identificado algunos componentes génicos involucrados en los mecanismos moleculares de la muerte y su regulación, que muestran

homologías en diferentes especies. La muerte apoptótica se caracterizó por primera vez en el modelo del desarrollo del nemátodo *Caenorhabditis elegans*, en el cual se describieron 3 genes que afectan directamente el proceso de muerte: *ced-3*, *ced-4* y *ced-9*. El producto de *ced-3* es una proteasa de cisteína que fragmenta proteínas después de un residuo de aspartato, cuya actividad es necesaria en la ejecución de la muerte. Se han encontrado en células de mamíferos una serie de proteasas homólogas a *Ced-3*, que forman parte de la familia de proteasas de cisteína tipo-ICE (llamadas así, ya que su prototipo es la enzima convertidora de interleucina-1 β), actualmente denominadas caspasas, las cuales se activan en diferentes modelos de muerte apoptótica (revisión en Martin, S. & Green, D, 1995; Alnemri E., 1997; Thornberry, N. & Lazebnik, Y., 1998). Estas proteínas son sintetizadas como zimógenos y son activadas al ser procesadas por otras proteasas o por sí mismas, dando lugar a dos subunidades que forman la proteasa activa. Se ha encontrado como un evento crucial en el proceso de muerte provocado por diferentes estímulos, la participación de varias proteasas de esta familia en una cascada proteolítica, en la cual se activan unas proteasas a otras, a la vez que fragmentan otras proteínas celulares (Figura 6). Se han identificado varios sustratos que son fragmentados por diferentes caspasas durante la apoptosis. Entre estos sustratos se encuentran proteínas citosólicas como: la gelsolina, la proteína cinasa C β 1, la fosfolipasa A2, la α fodrina y proteínas de unión a elemento regulador de esteroides (SREBPs) y proteínas nucleares como

la poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP), la lamina B, la topoisomerasa 1 y la histona H1. Las alteraciones provocadas en algunos sustratos, debido a la fragmentación de las caspasas, se han podido relacionar con algunos de los cambios morfológicos y bioquímicos característicos de la apoptosis. Tal es el caso del factor de fragmentación del ADN (DFF), o inhibidor de DNAsa activada por caspasa (ICAD), el cual al ser fragmentado por la caspasa-3 pierde su efecto como inhibidor de la desoxiribonucleasa activada por caspasa (CAD), la enzima que parece ser responsable de la degradación internucleosomal del ADN, característica de este tipo de muerte (Enari et al, 1998, Liu et al, 1997, Sakahira et al, 1998).

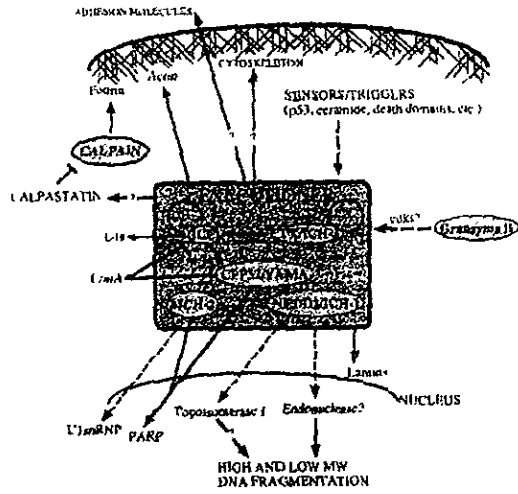


Figura 6

Caspasas como componentes centrales en el proceso apoptótico. Interacciones conocidas (líneas continuas) y putativas (líneas punteadas) entre proteasas y sus sustratos, que se llevan a cabo durante la apoptosis. El cuadro central muestra algunos de los miembros de la familia de las caspasas (Martin & Green, 1995).

El gen *ced-4* codifica una proteína, que al igual que *Ced-3*, es indispensable para la inducción de la muerte, cuya acción se ha situado entre la proteína antiapoptótica *ced-9* y *ced-3*. *Ced-4* es una proteína altamente hidrofóbica de 63 kD cuya función exacta no se conoce. Se propone que *Ced-4* promueve procesamiento de *Ced-3* y que ambas (*Ced-3* indirectamente) son reguladas por *Ced-9*.

Estructuralmente, esta proteína contiene un sitio de unión para nucleótidos, a partir de lo cual se ha sugerido que puede funcionar como ATPasa. Por otro lado se ha observado que presenta similitud estructural con dominios efectores de muerte del tipo de FADD y FLICE, por lo que se sugiere que puede funcionar como proteína adaptadora entre *Ced-3* y *Ced-9* (Bauer et al, 1997). Algunos estudios han demostrado la existencia de una interacción directa de *Ced-9* con *Ced-4* y *Ced-3*, siendo capaz de unirse a ambos simultáneamente, en cuyo caso no se da el procesamiento de *Ced-3* (Spector et al, 1997; Chinnaiyan et al, 1997; Wu et al, 1997).

Basándose en sus características estructurales se ha propuesto que Ced-4 puede funcionar como chaperonina para mantener a Ced-3 inactiva y que la hidrólisis de ATPasa activada por algún estímulo apoptótico produciría la energía necesaria para la activación autocatalítica de Ced-3.

Un estudio encontró que Ced-4 tiene la capacidad de unirse al zimógeno de ced-3 al parecer en dos sitios: el prodominio y el dominio proteasa, de manera que, al unirse Ced-9 a Ced-4 no permite que éste se una al prodominio de ced-3 y aunque sí se una al dominio proteasa, evita su activación (Chaudhary et al, 1998).

Otro grupo de investigación encontró que Ced-4 tiene la capacidad de oligomerizarse, promoviendo de esa manera la proximidad de los dominio proteasa de ced-3, facilitando el autoprosesamiento necesario para su activación (Yang et al, 1998). Ellos proponen que Ced-9 se une a Ced-4 inhibiendo su oligomerización, evitando así el contacto entre las moléculas de Ced-3 y su activación.

Al parecer se ha encontrado el homólogo de Ced-4 en mamíferos al cual denominaron Apaf-1 (factor activador de la apoptosis 1) (Zou et al, 1997). Esta proteína presenta una región con alta similitud con Ced-4, que incluye el sitio de unión a nucleótidos. Esta proteína participa en la activación de la caspasa 3 inducida por el citocromo c en presencia de dATP mediante la activación de la caspasa 9. Yang et al muestran en su trabajo que Apaf- 1, al igual que Ced-4, tiene la capacidad de oligomerizarse y de esa manera, mediante la regulación del citocromo c y el dATP podría promover la activación de la caspasa 9 (Yang et al, 1998).

El gen *ced-9* codifica una proteína que permite la sobrevivencia de determinadas células durante el desarrollo de *C. elegans*, la cual, se sabe actúa en etapas anteriores a la activación de Ced-4 y Ced-3, ya que su sobreexpresión puede evitar la activación de esta proteasa. Aún no se sabe si esta regulación es dependiente de los niveles relativos de expresión de Ced-4 y Ced-9

El homólogo de *ced-9* en mamíferos es el gen *bcl-2*, cuyo producto protéico tiene una función análoga a la del producto del gen *ced-9*, la inhibición de la muerte.

2.3 Participación de proteínas de la familia Bcl-2 en la muerte apoptótica

El gen *bcl-2* se localiza en el cromosoma 18q 21 y su producto es una proteína de 25 kD (239 aminoácidos) que se localiza en la membrana mitocondrial externa (concentrado en zonas de contacto con la membrana interna), en la membrana del retículo endoplásmico y en la membrana nuclear. Bcl-2 tiene un dominio hidrofóbico de 19 aminoácidos que le permite el anclaje a la membrana, mientras que el resto de la proteína queda expuesta a la cara citoplásmica de la membrana. Bcl-2 se encuentra distribuida en el tejido linfoide hematopoiético, epitelial y neural, expresándose en tipos celulares, áreas y tiempos específicos (Merry et al, 1994; Hockenbery et al, 1991).

En el desarrollo del sistema nervioso, *bcl-2* se expresa en las células proliferativas neuroepiteliales de las zonas ventriculares, en las células postmitóticas de la placa cortical y en células del hipocampo, de la médula espinal y del cerebelo. Los niveles de expresión de este gen son altas en etapas de la neurogénesis postnatal en las células granulares del cerebelo y en el giro dentado del hipocampo y van declinando con la edad. En las células de los ganglios simpáticos y sensoriales se mantienen los niveles de Bcl-2 a lo largo de toda la vida del organismo (Merry et al, 1994).

Se ha encontrado que altos niveles de proteína Bcl-2 inhiben la apoptosis provocada por distintos estímulos en diferentes tipos celulares (revisión en Reed, 1997b), incluyendo diferentes tipos de neuronas (revisión en Merry & Korsmeyer, 1997). Sin embargo, no todos los modelos de muerte apoptótica pueden ser rescatados por la sobreexpresión de *bcl-2* (Reed, 1997 b)

Se ha identificado una serie de proteínas con características estructurales muy similares a Bcl-2, en las cuales se reconoce la presencia de por lo menos una de cuatro regiones conservadas denominadas regiones de homología 1, 2, 3 y 4 (BH1, BH2, BH3 y BH4). Estas proteínas tienen un tamaño similar al de Bcl-2 (20-26 kD) y entre ellas se distinguen aquellas que tienen la capacidad de promover la apoptosis (Bax, Bak, Bad, Bcl-x_S) o de suprimirla (Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1) (revisión en White et al, 1996).

Bax parece ser una proteína importante dentro de la familia de Bcl-2, ya que puede interactuar con varios miembros de la familia. Bax es una proteína que consta de 192 aminoácidos (21kD), que presenta 21 % de homología con Bcl-2, principalmente en los dominios BH1 y BH2. Se ha observado, que cuando Bax se sobreexpresa en células a las cuales se les somete a un señal de muerte, el proceso apoptótico se acelera (Oltvai et al, 1993). Esta proteína puede formar homodímeros, o bien, interactuar con Bcl-2 y otras proteínas de la familia, formando heterodímeros, contrarrestando así sus efectos antiapoptóticos (Sedlak et al, 1995; Zha et al, 1996).

La acción de los distintos genes de la familia de bcl-2 presenta diferencias, tanto en su localización en los distintos tejidos, como en las etapas de la vida del organismo en las que se expresan (Hockenbery, 1995; White, 1996). La redundancia en las funciones de los componentes de esta familia podrían explicar que no todos los sistemas apoptóticos puedan ser inhibidos por sobreexpresión de bcl-2 y que no sólo un incremento en esta proteína defina la sobrevivencia de diferentes tipos celulares.

Estudios en los cuales se han utilizado versiones mutadas de miembros de la familia de proteínas tipo Bcl-2 y técnicas de coimmunoprecipitación, han revelado la importancia de las interacciones proteína-proteína en la regulación de la muerte apoptótica (Yin et al, 1994; Zha et al, 1996; Sattler et al, 1997). En este sentido, se propone que las cantidades relativas de proteínas pro y antiapoptóticas y las interacciones selectivas y complejas entre ellas definirán el destino de la célula, es decir, su muerte o su sobrevivencia (Oltvai et al, 1993; revisión en Merry & Korsmeyer, 1997; Chao & Korsmeyer, 1998).

El hecho de que Bcl-2 pueda inhibir la muerte provocada por diferentes estímulos sugiere que esta proteína debe actuar en un nivel en el que convergen diferentes mecanismos de muerte iniciados por una variedad de estímulos, sin embargo, hasta ahora no se conoce la acción concreta de Bcl-2 en la promoción de la sobrevivencia. Se han sugerido diferentes hipótesis acerca de su función, entre las que se encuentra la que presentan los grupos de Hockenbery y Kane (Hockenbery et al, 1993; Kane et al, 1993). Estos grupos proponen que Bcl-2 funciona como quelante de radicales libres reactivos, ya que en los sistemas mostrados en estos trabajos, Bcl-2 bloquea la muerte por daño oxidativo. Sin embargo, otros estudios indican que esta teoría no es del todo válida, ya que se ha

observado la acción anitapoptótica de Bcl-2 en condiciones casi anaeróbeas (Shimizu et al. 1995; Jacobson & Raff, 1995).

Por otra parte, se ha relacionado a Bcl-2 con la regulación de los niveles intracelulares de Ca^{2+} . En este sentido, se ha propuesto que esta proteína actúa amortiguando las alteraciones de la concentración de Ca^{2+} en el citoplasma, ya sea evitando su liberación del retículo endoplásmico o aumentando la capacidad de secuestro de Ca^{2+} citosólico hacia el interior de la mitocondria. (Lahm et al, 1994; Murphy et al, 1996).

La función de Bcl-2 en relación con su localización en el núcleo y en el retículo endoplásmico ha sido poco explorada, pero se ha encontrado que Bcl-2 puede proteger, aún en ausencia del núcleo (Jacobson et al, 1994). En los últimos años se ha prestado mayor atención al papel activo de la mitocondria en la apoptosis, ya que este organelo está relacionado con los cambios metabólicos y producción de radicales libres que se presentan en etapas tempranas de varios sistemas apoptóticos y también porque en la mitocondria se localizan diferentes integrantes de la familia de Bcl-2 (revisión en Kroemer et al, 1997; Green & Reed, 1998). En cuanto a la función de Bcl-2 en relación a su localización en la mitocondria se ha propuesto que su acción no depende del mantenimiento funcional de la cadena respiratoria y que está relacionada con el mantenimiento del potencial de la membrana mitocondrial por medio del reforzamiento en el flujo de protones que ayuda a recobrar el potencial después de la exposición a estímulos que provoquen cambios en el mismo (Jacobson et al, 1993, Shimizu et al, 1998).

En los últimos tres años se han realizado investigaciones que sustentan una nueva teoría sobre la acción de Bcl-2 en relación con la mitocondria, en la cual se propone que Bcl-2 puede prevenir la muerte al bloquear la liberación del citocromo c de la mitocondria (Yang et al, 1997; Kluck et al, 1997).

2.4 La liberación del citocromo c de la mitocondria como parte del proceso apoptótico

El ***citocromo c*** es una proteína de 12 Kd, que es codificada por un gen nuclear y es traducida en el citoplasma para formar el producto llamado apocitocromo c, el cual

posteriormente es transportado a la mitocondria, donde adquiere los grupos hemo, para formar el holocitocromo, o citocromo c funcional. Esta conformación final hace del citocromo c una proteína polar con carga positiva, la cual es incapaz de atravesar la membrana externa de la mitocondria, manteniéndose unida mediante fuerzas electrostáticas a la citocromo oxidasa, en la superficie de la membrana interna que da cara al espacio intermembranal. El citocromo c tiene un papel importante dentro del metabolismo celular, ya que forma parte de la cadena respiratoria, actuando como acarreador de electrones desde el citocromo bc1 (complejoIII) a la citocromo oxidasa (complejo IV).

Recientemente se ha descubierto que, tanto en sistemas no celulares como en células intactas, ocurre una translocación del citocromo c de la mitocondria hacia el citoplasma durante el proceso de muerte apoptótica provocado por una variedad de estímulos (Liu et al, 1996, Kluck et al, 1997a,b; Yang et al, 1997, revisión en Cai et al, 1998). Este parece ser un evento clave durante el programa de muerte ya que esta liberación se ha asociado a la activación de caspasas y a los cambios bioquímicos y morfológicos en el núcleo característicos de este tipo de muerte. Wang y su grupo encontraron que, para activar a las caspasas el citocromo c requiere de ATP y dATP, además de la interacción con los factores citosólicos, conocidos como Apaf-1 (factor apoptótico activador de proteasas 1) y Apaf-3, que actualmente se sabe que es la caspasa 9 (Liu et al, 1996, Zou et al, 1997). Se propone que Apaf-1 pueda ser el homólogo de Ced-4 en sistemas mamíferos, ya que tiene un dominio homólogo a Ced 4 y una región homóloga a Ced-3 (Zou et al, 1997).

Estos resultados apoyan un modelo en el que el citocromo c, al ser liberado de la mitocondria, se une a las secuencias repetidas WD (triptofano-aspartato) que se encuentran en la estructura de Apaf-1, provocando cambios conformacionales en su estructura, lo que le permite unirse a la pro-caspasa 9 y activarla, al parecer facilitando su autoprosesamiento (Figura 7). Ya activada esta proteasa de acción temprana, la caspasa 9 activa a su vez a la caspasa 3, iniciando de esta manera la cascada de proteasas que se encargará de la ejecución subsecuente de la etapa final del programa de muerte (revisión en Reed, 1997, Hengartner, 1997).

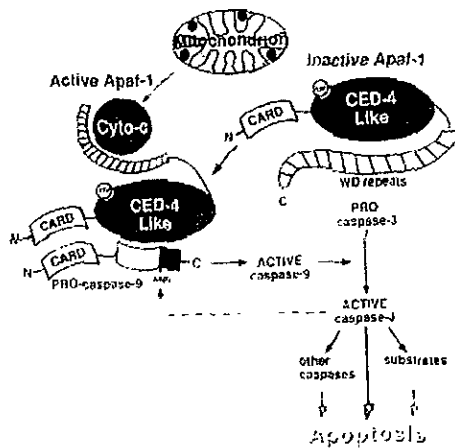


Figura 7

Modelo de activación de caspasas mediada por el citocromo c (Reed, 1997).

Si bien la liberación del citocromo c puede desencadenar la muerte mediante un programa dependiente de la activación de caspasas, también existe la posibilidad de que la salida del citocromo c de la mitocondria provoque la interrupción del proceso respiratorio, lo cual podría tener como consecuencia la disminución de la actividad metabólica y la excesiva producción de radicales libres que podrían llevar a la célula a la muerte de tipo necrótica (Reed, 1997a) (Figura 8).

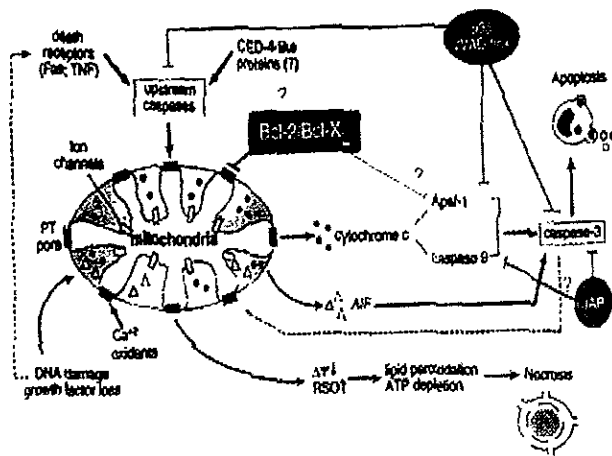


Figura 8

Papel activo de la mitocondria en los patrones de muerte (Reed, 1997).

Hasta ahora no se ha encontrado la señal directa que provoca la liberación del citocromo c, ni la forma en que se lleva a cabo esta translocación. En algunos sistemas apoptóticos estudiados la liberación es precedida por un decremento en el potencial de membrana de la mitocondria, por lo que se ha sugerido que la salida del citocromo c puede estar relacionada con la apertura de poros en la membrana externa, que respondan a la transición de permeabilidad de la membrana (revisión en Kroemer et al, 1997; Reed, 1997a). Se sabe que al abrirse estos poros de transición (PT) se permite el paso de proteínas de <15kD, lo cual podría provocar una alteración osmótica, que induciría el consiguiente hinchamiento de la mitocondria, llevando a la ruptura de la membrana externa y permitiendo, la liberación del citocromo c al citoplasma. Sin embargo, existen sistemas en los que la liberación del citocromo c es independiente de la reducción del potencial de la membrana mitocondrial (Kluck et al, 1997; Yang et al, 1997; Bossy Wetzell et al, 1998). En algunos de estos trabajos se propone que la despolarización de la membrana puede ser un efecto paralelo de la activación de las caspasas, que no tiene relación alguna con la liberación del citocromo c.

Un patrón común encontrado, tanto en sistemas no celulares, como en células de mamíferos intactas es la capacidad de Bcl-2 y Bcl-x de prevenir la liberación de l citocromo c de la mitocondria (Kluck et al, 1997; Yang et al, 1997; Kharbanda et al., 1997). En algunos trabajos se ha observado que Bcl-2 actúa a nivel premitocondrial y mitocondrial, pero no postmitocondrial, es decir, impide la salida del citocromo c de la mitocondria, pero no evita sus efectos, una vez que ya ha sido liberado al citosol (Ellerby et al, 1997). Sin embargo, en trabajos publicados recientemente se sugiere que Bcl-2 puede inhibir la muerte independientemente de que el citocromo c ya haya sido liberado al citosol o de que se microinyecte citocromo c directamente al citoplasma de la célula (Rossé et al, 1998; Shivotovsky et al, 1998). Esto podría sugerir que Bcl-2 lograría inhibir el efecto del citocromo c indirectamente, tal vez interactuando con Apaf -1, evitando que éste se una a la caspasa 9 y la active, de la misma manera como sucede en *C. elegans* al unirse Ced-9 a Ced-4, evitando su interacción con Ced-3 y su activación (Hengartner, 1997).

En base a esta evidencia, una teoría que trata de explicar, tanto la posible causa de la liberación, como su prevención, es la que propone la participación de los miembros de la familia de Bcl-2 en el proceso. Debido a que estas proteínas tienen estructuras parecidas

a las de algunas toxinas bacterianas con capacidad de formar poros (colicinas y toxina difteria), se cree que podrían formar poros en la membrana externa de la mitocondria, que regulen la liberación del citocromo c. Se ha demostrado que, efectivamente, Bcl-2, Bcl-x y Bax tienen la capacidad de formar poros en membranas sintéticas. Bax forma poros con selectividad para aniones en vesículas lipídicas sintéticas y en bicapas lipídicas planares a pH neutral y al parecer, la formación de estos poros puede ser inhibida por la sobreexpresión de Bcl-2 (Antonsson et al, 1997). En el caso de Bcl-2 y Bcl-x los canales formados presentan selectividad para cationes y diferentes estados de conductancia, pero su inserción sólo se logra en un rango de pH ácido, no fisiológico (Minn et al, 1997, Schendel et al, 1997). La modulación en la apertura de los canales formados por Bcl-2 y proteínas relacionadas podría depender de cambios de pH o de interacciones proteína-proteína. Sin embargo, hasta la fecha no se tiene ninguna evidencia de esto en modelos *in vivo*, por lo que queda como una hipótesis a comprobar.

En general, las teorías postuladas recientemente sugieren que Bcl-2 puede actuar ya sea directamente, como formador estructural de un poro o indirectamente, regulando flujos iónicos relacionados con la causa de la liberación.

3.- FACTORES TROFICOS DURANTE EL DESARROLLO

Entre los reguladores de la muerte durante el proceso de neurogénesis se reconoce el importante papel de los factores tróficos. Los factores neurotróficos son sustancias endógenas que son esenciales para la sobrevivencia neuronal y que además pueden regular la diferenciación, el crecimiento y la plasticidad neuronal. Se ha observado que diferentes poblaciones neuronales pueden responder a diferentes factores tróficos en rangos temporales específicos. Entre los factores neurotróficos mejor estudiados se encuentra el factor de crecimiento neuronal (NGF), cuya presencia se sabe, es determinante para la sobrevivencia de neuronas sensoriales, simpáticas y colinérgicas del núcleo basal. Se han encontrado otras moléculas con funciones neurotróficas, las cuales presentan homologías de un 50-60% con el NGF, entre las cuales se encuentra el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y la neurotrofina 3 (NT-3). Se sabe que el BDNF regula la sobrevivencia de neuronas colinérgicas septales y neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra durante el desarrollo.

a las de algunas toxinas bacterianas con capacidad de formar poros (colicinas y toxina difteria), se cree que podrían formar poros en la membrana externa de la mitocondria, que regulen la liberación del citocromo c. Se ha demostrado que, efectivamente, Bcl-2, Bcl-x y Bax tienen la capacidad de formar poros en membranas sintéticas. Bax forma poros con selectividad para aniones en vesículas lipídicas sintéticas y en bicapas lipídicas planares a pH neutral y al parecer, la formación de estos poros puede ser inhibida por la sobreexpresión de Bcl-2 (Antonsson et al, 1997). En el caso de Bcl-2 y Bcl-x los canales formados presentan selectividad para cationes y diferentes estados de conductancia, pero su inserción sólo se logra en un rango de pH ácido, no fisiológico (Minn et al, 1997, Schendel et al, 1997). La modulación en la apertura de los canales formados por Bcl-2 y proteínas relacionadas podría depender de cambios de pH o de interacciones proteína-proteína. Sin embargo, hasta la fecha no se tiene ninguna evidencia de esto en modelos *in vivo*, por lo que queda como una hipótesis a comprobar.

En general, las teorías postuladas recientemente sugieren que Bcl-2 puede actuar ya sea directamente, como formador estructural de un poro o indirectamente, regulando flujos iónicos relacionados con la causa de la liberación.

3.- FACTORES TROFICOS DURANTE EL DESARROLLO

Entre los reguladores de la muerte durante el proceso de neurogénesis se reconoce el importante papel de los factores tróficos. Los factores neurotróficos son sustancias endógenas que son esenciales para la sobrevivencia neuronal y que además pueden regular la diferenciación, el crecimiento y la plasticidad neuronal. Se ha observado que diferentes poblaciones neuronales pueden responder a diferentes factores tróficos en rangos temporales específicos. Entre los factores neurotróficos mejor estudiados se encuentra el factor de crecimiento neuronal (NGF), cuya presencia se sabe, es determinante para la sobrevivencia de neuronas sensoriales, simpáticas y colinérgicas del núcleo basal. Se han encontrado otras moléculas con funciones neurotróficas, las cuales presentan homologías de un 50-60% con el NGF, entre las cuales se encuentra el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y la neurotrofina 3 (NT-3). Se sabe que el BDNF regula la sobrevivencia de neuronas colinérgicas septales y neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra durante el desarrollo.

Las neurotrofinas liberadas por las células que reciben la inervación de las células sensibles al factor, ejercen su efecto a través de su unión a receptores específicos. De manera general, al ser liberado por la célula blanco, el factor neurotrófico se une a receptores que se encuentran en las terminales de las neuronas presinápticas sensibles al factor. Posteriormente, el complejo ligando-receptor es internalizado y la señal es transmitida por transporte retrógrado al soma, donde puede tener efecto sobre la regulación de la síntesis de proteínas estructurales, procesos metabólicos y producción y liberación del neurotransmisor.

En base a las evidencias del efecto de estos factores sobre la sobrevivencia de ciertas poblaciones neuronales, se propone que la regulación de la muerte neuronal durante el desarrollo depende de la competencia de las neuronas por suficientes cantidades de factores tróficos liberados por sus células blanco. De esta manera hay una selección para ajustar el número de neuronas con las células blanco que inervan (Raff et al, 1993). Sin embargo, investigaciones sobre los efectos de la remoción de aferencias y bloqueo de las sinapsis han demostrado la importancia de la influencia de la inervación aferente en la determinación de la sobrevivencia neuronal, mediada por la regulación de flujos iónicos a través de la membrana de la neurona receptora que afectan su actividad eléctrica. Esta implicación es apoyada también por el hecho de que se encuentren, en etapas tempranas del desarrollo, neurotransmisores en el medio extracelular y que las células expresen receptores para ellos. En este sentido, se ha evidenciado la función neurotrófica de ciertos neurotransmisores durante el desarrollo del sistema nervioso, como es el caso del ácido gamma aminobutírico (GABA) y algunos aminoácidos excitadores (Meier et al, 1991; Balázs & Hack, 1990; Leslie, F., 1993).

3.1 Aminoácidos como factores tróficos

Entre los años 60s y 70s se sugiere que además del papel como principal neurotransmisor inhibitor, el GABA tiene otra función trófica en el desarrollo y diferenciación de neuronas del sistema nervioso central. De esta manera, el GABA afecta la sobrevivencia y diferenciación de neuronas del ganglio cervical superior y de la corteza cerebral *in vivo* y de neuronas de retina, corticales, tectales y granulares del cerebelo en cultivo (Hansen et al, 1987; Meier et al, 1991). En cultivos de células granulares del

cerebelo el GABA tiene efecto sobre la expresión de los receptores a GABA y de otras proteínas celulares (Meier et al, 1991).

Por otro lado, se ha comprobado la acción trófica del ácido glutámico sobre diferentes poblaciones de neuronas del hipocampo, del cerebelo y de la médula en cultivo, la cual es dependiente de la edad de las células, la concentración del neurotransmisor y el tiempo de exposición, entre otros factores. El glutamato es el aminoácido excitador predominante en el sistema nervioso de mamíferos y sus receptores se encuentran ampliamente distribuidos. Existen 4 tipos de receptores a glutamato: tres de tipo ionotrópico y uno de tipo metabotrópico, acoplado a proteínas G. Los receptores ionotrópicos utilizan al glutamato como ligando endógeno, pero se clasifican desde el punto de vista farmacológico, de acuerdo a su principal agonista. De esta manera, se dividen en los que reconocen al N-metil-D-aspartato (NMDA) como agonista, (receptores tipo NMDA), y los que no (receptores tipo no-NMDA), que incluyen el receptor de ácido kaínico y el receptor de AMPA (ácido propiónico alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol).

3.1.1 Receptor tipo NMDA

El receptor tipo NMDA es un complejo protéico acoplado a un canal iónico permeable a sodio y potasio y a iones divalentes, particularmente a calcio (Figura 9). El receptor tipo NMDA es el único receptor ionotrópico cuya actividad puede ser regulada por factores extracelulares. Este receptor presenta varios sitios de modulación que influyen en la probabilidad de apertura del canal, entre los que se distinguen 2 sitios de reconocimiento para los coagonistas, el glutamato y la glicina. La activación del receptor requiere de la unión de ambos agonistas para la apertura del canal. También presenta un sitio de unión a poliaminas, las cuales a bajas concentraciones aumentan la probabilidad de apertura del canal, mientras que a altas concentraciones provocan un bloqueo del canal, dependiente de voltaje. Dentro del canal se encuentra un sitio de unión para magnesio y otro para zinc. La unión de Mg^{2+} extracelular produce un bloqueo dependiente de voltaje, cuando el potencial de membrana se encuentra en reposo (-70 a -50 mV). Para que se permita la activación del receptor por la unión de su ligando, este ion debe ser liberado del sitio de unión mediante la despolarización de la membrana (20-30mV), lo cual provoca la disminución de la afinidad del sitio por el Mg^{2+} . Al igual que en el caso del magnesio, al

unirse a este sitio dentro del canal compuestos como el MK801, la ketamina u otras drogas como la fenilciclidina, se previene el paso de iones a través del canal. Por otro lado, al unirse el Zn^{2+} a su sitio de reconocimiento, se bloquea la respuesta al NMDA independientemente del voltaje, provocando la reducción en el tiempo de apertura del canal.

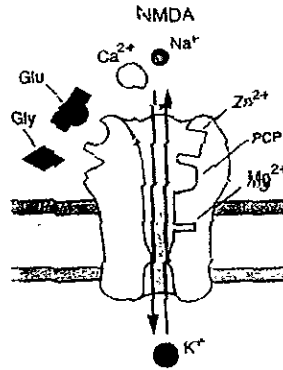


Figura 9

Receptor a glutamato tipo NMDA, el cual regula un canal iónico permeable a Ca^{2+} , K^+ y Na^+ . Presenta los sitios de unión para glicina, Zn^{2+} , poliaminas y Mg^{2+} , los cuales regulan la función del canal iónico (Kandel, 1991).

Los agonistas selectivos del receptor tipo NMDA son el glutamato, el aspartato, el NMDA, el ácido quinolínico (QUIN) y el ácido iboténico. La afinidad del sitio de unión al ligando por NMDA es menor que la del glutamato ($0.5-1 \mu M$), pero es más específica. Los antagonistas son derivados del fosfonato, como el 2-amino-5-fosfonovalerato (2-APV), que actúa como inhibidor competitivo del glutamato, el 7 cloroquinureato, como antagonista competitivo de la glicina y como antagonista específico del sitio modulatorio de poliaminas, el ifenprodil y el eliprodil.

La estimulación del receptor provoca la entrada de Ca^{2+} , la cual puede activar diferentes vías de transducción, como la activación de la PKC, la producción y liberación de ácido araquidónico y el aumento de fosfoinositósios o nucleótidos cíclicos.

Existen distintas isoformas del receptor a NMDA, las cuales se conforman por dos tipos de subunidades: NR1 y NR2 (A, B, C, D). Los diferentes tipo de receptores presentan distintas características farmacológicas y una distribución celular y regional diferencial. Se cree que la subunidad NR1 determina las propiedades básicas del receptor, mientras que las variantes de la subunidad NR2 (A, B, C o D) definen la actividad particular del tipo de receptor.

Se sabe que en el cerebelo, desde etapas tempranas del desarrollo, las neuronas granulares presentan en sus dendritas y en sus somas receptores a glutamato, tanto de tipo NMDA, como tipo no-NMDA. A lo largo del desarrollo de estas células se observan cambios en la expresión de las subunidades que constituyen sus receptores tipo NMDA, los cuales muestran propiedades de cinética y conductancia diferentes. En etapas tempranas del desarrollo se producen hetero-oligómeros NR1/NR2A, los cuales disminuyen en número y son paulatinamente sustituidos por hetero-oligómeros NR1/NR2C, los cuales son detectados en el cerebelo adulto (Perrier & Benavides, 1995). Algunos estudios sugieren que los receptores tipo NMDA que presentan las células granulares juegan un papel importante en la migración y en la transmisión sináptica que se establece entre una población de fibras musgosas de tipo glutamatérgicas y las células granulares, posiblemente afectando su sobrevivencia (Komuro et al, 1993; Burgoyne et al, 1993).

II.- ANTECEDENTES

Los cultivos primarios de células granulares del cerebelo han demostrado ser un modelo adecuado para el estudio de la apoptosis en células del sistema nervioso central, debido al tamaño y la pureza de las poblaciones obtenidas y su fácil manejo (Balász, 1988 a; Morán & Patel, 1988 a; Morán & Rivera Gaxiola, 1992). En este modelo se ha encontrado que el efecto del tratamiento con altas concentraciones de KCl (25mM) o con concentraciones subtóxicas de agonistas del glutamato, como el NMDA (150µM), promueve la sobrevivencia y la diferenciación de estas neuronas (Lasher & Zagon, 1972; Gallo et al, 1987; Balász et al, 1988 a, b Morán & Patel, 1989 a,b; Morán & Rivera Gaxiola, 1992; Burgoyne et al, 1993; Alavez et al, 1996). El efecto de la despolarización crónica de la membrana por exposición a altas concentraciones de potasio y por el tratamiento con aminoácidos excitadores en la sobrevivencia y maduración celular se ha demostrado, no sólo en este tipo neuronal, sino también en cultivos de neuronas provenientes del hipocampo y de la médula espinal. Tratamientos con antagonistas de canales de Ca^{2+} han demostrado que este efecto está mediado por el flujo de iones Ca^{2+} del espacio extracelular, hacia el interior de la célula, que junto con la movilización de calcio de pozas intracelulares resulta en un incremento neto de la concentración citosólica de este ion (Gallo et al, 1987; Balázs et al, 1992a; Simpson et al, 1993; Simpson et al, 1996). Este flujo se lleva a cabo, en el caso del tratamiento con altas concentraciones de potasio, a través de canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje y en el caso del tratamiento con NMDA, a través del canal iónico acoplado a su receptor.

En los cultivos de células granulares del cerebelo, el requerimiento trófico para la sobrevivencia inducida por estos tratamientos está limitado temporalmente a los días 2-3 *in vitro* (DIV) y requiere de una exposición continua. Se propone que este período específico en el que requieren de la estimulación puede estar relacionado con el tiempo *in vivo* que tardan estas células en migrar hacia la capa granular interna del cerebelo, donde reciben los contactos de una población de fibras musgosas de tipo glutaminérgicas, aproximadamente a los 12 días postnatales. De esta manera, la despolarización producida por los tratamientos *in vitro* podría mimetizar el efecto de la aferencia de las fibras musgosas sobre las neuronas granulares a través de los receptores para glutamato localizadas en estas neuronas desde etapas tempranas del desarrollo (Gallo et al, 1987; Burgoyne et al, 1993).

Las altas concentraciones de KCl y el tratamiento con NMDA promueven además de la sobrevivencia, la maduración de las células granulares del cerebelo, ya que inducen el aumento de la expresión de la glutaminasa activada por fosfatos (GAF) y la aspartato aminotransferasa (AAT), enzimas que participan en la síntesis y el metabolismo del glutamato (Morán & Patel, 1988 a,b; Morán & Rivera Gaxiola, 1992), el crecimiento de neuritas (Burgoyne et al, 1993), así como el aumento en la expresión y actividad del receptor tipo NMDA (Van der Valk et al, 1991; Balázs et al, 1992b; Bessho et al, 1994).

Si se trata a las células granulares con glutamato o sus agonistas una vez que las células ya están diferenciadas, su efecto es tóxico y las células mueren de manera necrótica (Dessi et al, 1993). El cambio de un efecto trófico a uno excitotóxico de un mismo estímulo sobre el mismo tipo celular depende de la expresión génica que definirá la respuesta de la célula en el momento específico en el que este estímulo sea recibido. En este caso el efecto del tratamiento con NMDA, ya sea trófico o tóxico, está mediado por la elevación de los niveles de Ca^{2+} intracelular, por lo que se piensa que la respuesta diferencial entre las células inmaduras y las ya diferenciadas podría estar definida ya sea a través de cambios en la expresión y/o actividad de los receptores o de sistemas intracelulares de regulación del Ca^{2+} citoplásmico.

Se ha comprobado que las neuronas granulares que no reciben esta estimulación trófica y se mantienen *in vitro* a bajas concentraciones de potasio (K5) comienzan a morir alrededor de los 5 DIV, con características de una muerte apoptótica, incluyendo la condensación de la cromatina nuclear, la fragmentación de DNA, la activación de caspasas y la formación de cuerpos apoptóticos (Gallo et al, 1987; D'Mello et al, 1993; Yan et al, 1994; Galli et al, 1995) . La muerte de estas células puede disminuir por un tratamiento con inhibidores de síntesis de RNA y proteínas, por lo que se deduce que se requiere la expresión de ciertos genes para la producción *de novo* de ciertas proteínas que forman parte del programa letal.

Otro modelo de estudio de la muerte apoptótica en este tipo neuronal ha demostrado que las neuronas que se desarrollan en condiciones despolarizantes (K25) y que a los 6-7DIV se someten a un cambio de medio con bajas concentraciones de potasio (K5) mueren también apoptóticamente (Gallo et al, 1987; D'Mello et al, 1993; Yan et al, 1994;), debido

a la disminución en la concentración de Ca^{2+} citosólico (Galli et al, 1995). Esta muerte requiere de la síntesis de RNAm y proteínas, actividad de caspasas, formación de radicales libres y disminución de la actividad mitocondrial en etapas tempranas (Schulz et al, 1996; Miller & Johnson, 1996; Chang & Wang, 1997; Armstrong et al, 1997; Atlante et al, 1998).

Una gran parte de la investigación sobre la muerte apoptótica está dirigida al estudio del papel de los integrantes de la familia de proteínas relacionadas con Bcl-2 en la regulación de la apoptosis. Estas proteínas se encuentran ampliamente distribuidas en los diferentes tipos neuronales que constituyen el sistema nervioso y se han encontrado evidencias de su papel como reguladores de la muerte neuronal (revisión en Merry & Korsmeyer, 1997). Algunos estudios han sugerido que Bax tiene un papel activo y crítico en la muerte de diferentes poblaciones neuronales provocadas por diferentes estímulos, así como en la muerte de neuronas del sistema nervioso periférico y central, que ocurre naturalmente durante la neurogénesis (Deckwerth et al, 1996; Miller et al, 1997; White et al, 1998).

Por otro lado, se ha encontrado que la sobreexpresión de Bcl-2 previene la muerte inducida por diferentes estímulos en líneas celulares neuronales y en cultivos primarios de algunas poblaciones neuronales y se sugiere que esta proteína es crítica en el mantenimiento de algunas poblaciones neuronales durante el desarrollo y en etapas postnatales (García et al, 1992; Allsopp, 1993; Zhong et al, 1993; Michaelidis, et al, 1996; revisión en Merry & Korsmeyer, 1997).

III.- OBJETIVOS

Tomando en cuenta los antecedentes presentados, este estudio tiene como objetivo general el evaluar el papel de Bax y Bcl-2 en la regulación de la muerte apoptótica observada en cultivos primarios de neuronas granulares del cerebelo. Uno de los modelos utilizados en este trabajo es el de la muerte apoptótica inducida por la falta de estimulación despolarizante en las etapas tempranas del desarrollo y el de su sobrevivencia promovida por el NMDA. El otro sistema que se utilizó es el modelo de muerte apoptótica de neuronas ya diferenciadas, inducida por el decremento en las concentraciones de potasio extracelular. Debido a la relación sugerida entre la función de estas proteínas y el evento de la liberación del citocromo c de la mitocondria hacia el citosol que ocurre en varios modelos apoptóticos, se determinaron los niveles de citocromo c tanto en la fracción mitocondrial, como en la fracción citosólica de estas neuronas, con el objetivo de definir si la liberación de esta proteína forma parte del proceso de muerte apoptótica observada en los sistemas utilizados.

IV.- METODOLOGIA

Cultivos celulares

Los cultivos primarios de células granulares de cerebelo (95%) se obtuvieron de ratas Wistar de 8 días de nacidas, por medio de la técnica descrita por Morán y Patel (1989). Los cerebelos se disocian utilizando tripsina (0.025%) y las células se siembran en medio basal de Eagle suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, 2 mM de glutamina y una solución de penicilina-estreptomicina, 50U/ml y 50µg/ml, respectivamente. La concentración final de KCl se ajusta a 10 mM (K10) o 25 mM (K25) dependiendo del tratamiento. Las células se siembran a una densidad final de 1.2 a 1.5 x 10⁶ cel/ml. Las cajas de Petri utilizadas para el cultivo se tratan previamente con 5µg/ml de poli-L-lisina durante 24 horas para promover la adherencia neuronal. Aproximadamente 18 horas después de la siembra se le agrega al cultivo una solución de citosina arabinosa 10µM, con el fin de evitar el crecimiento de células no neuronales (Balász et al, 1988).

Las células se incuban a 37 °C, en una atmósfera de CO₂ (4.5%) y aire saturado de vapor de agua (95%) (Morán y Patel, 1989).

Tratamiento de cultivos

Los cultivos que se sembraron inicialmente en un medio con concentraciones de K⁺ extracelular fisiológico (K5) se trataron al día 2 in vitro con 150 µM de NMDA de 1 a 6 días.

Por otro lado, células que crecen en un medio de cultivo con K25 por 7 DIV fueron sometidas a un cambio de medio con K5. Para evitar el efecto tóxico del medio fresco (Schramm et al, 1990), la sustitución se llevó a cabo con medios sin suero. Los controles utilizados en este modelo se sometieron al mismo tratamiento, haciendo el cambio por un medio sin suero suplementado con KCl 25 mM.

Evaluación de la sobrevivencia celular mediante la técnica de reducción del MTT.

Este ensayo colorimétrico utiliza una sal de tetrazolium, el 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il-2-5-difenil bromuro de tetrazolium (MTT), el cual se transforma en un producto colorido e insoluble, llamado azul de formazán, que puede ser detectado espectrofotométricamente (Mossman, 1983). Esta transformación ocurre cuando el MTT es reducido por los radicales libres producidos durante el transporte de electrones de la cadena respiratoria, siendo ésta una evidencia indirecta de la viabilidad celular basada en la evaluación de la actividad mitocondrial.

A los cultivos celulares se les añade el MTT (144 μM) y se incuban a 37°C. Una hora después se procede a aspirar el medio mediante vacío y se agrega 1 ml de DMSO en el cual se solubiliza el azul de formazán incorporado a las mitocondrias. Posteriormente mediante un espectrofotómetro se calcula la diferencia entre la absorbancia de la solución medida a 570 y 630 nm. Los resultados se expresan como valores relativos al control.

Cuantificación de proteínas mediante el método de Bradford

Al finalizar el tratamiento, las células se lavan dos veces con buffer de fosfatos salino (PBS) a 37°C y se homogenizan con el buffer de lisis (Nonidet P-40 (2%), Tris-HCl, pH 7.4 (25mM), SDS (0.2%) y NaCl (50 mM), agregando en el momento de uso aprotinina (2 $\mu\text{g/ml}$), PMSF (1mM), pepstatina (10 $\mu\text{g/ml}$) y leupeptina (10 $\mu\text{g/ml}$)). Posteriormente, mediante el método de Bradford se calcula la concentración de proteínas totales (Bradford, 1976; Spector, 1978).

Para la determinación de la cantidad de proteína de una muestra se realiza una curva estándar colocando concentraciones conocidas de albúmina (0, 2.5 μl , 5 μl , 7.5 μl , 10 μl , 15 μl , 17.5 μl de un stock de albúmina (1mg/ml), llevando cada tubo a 50 μl con agua desionizada, agregando 1ml del reactivo de Bradford. A continuación se toman 3 μl de muestra, se llevan a un volumen final de 50 ml con agua desionizada y se les agrega 1 ml de reactivo de Bradford. Cada muestra se analiza por duplicado. Las muestras se agitan y

se leen a una longitud de onda de 595 nm. en un lapso menor de 1 hora después de haber añadido el reactivo. Para obtener la concentración de proteínas de las alícuotas a partir de los valores de absorbancia, se interpolan los valores sobre la curva estandar, que relaciona los valores de absorbancia obtenidos a partir de concentraciones conocidas.

Electroforesis de proteínas y técnica de réplica tipo Western

Se toman los volúmenes de las muestras necesarios para tener cantidades iguales de proteína total (80-100 μg) y se añaden volúmenes iguales de solución digestora (H_2O , Tris-HCl 0.5M, pH6.8, glicerol, SDS (sodium dodecyl sulfate)10%, 2 β -mercaptoetanol, y azul de bromofenol 0.05%), la cual desnaturaliza las proteínas. En seguida se incuban 3 minutos en agua hirviendo. A continuación se carga el gel de poli(acrilamida)-SDS 12.5% (acrilamida al 30%, bis-acrilamida (1%), buffer Tris-HCl 0.5 M, pH 8.8, H_2O , SDS (10%), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (10%) y Temed) con las muestras y se corre en buffer de corrida (Tris 50 mM, glicina 192 mM y SDS 0.1%) a 30-40mA. Este método separa las proteínas de acuerdo a su peso molecular.

Posteriormente, las proteínas se transfieren del gel a una membrana de PVDF (polyvinylidene difluoride), utilizando buffer de transferencia (Tris 25mM, glicina 192 mM y metanol 20%). La transferencia se lleva a cabo a 4°C toda la noche, a 200mA. Al terminar la transferencia se lava la membrana en TBS (Tris 20 mM, NaCl 500 mM, pH7.5) 30 min. con cambios constantes (cada 5-10 min.), en agitación. Al terminar el lavado se bloquea la membrana en TTBS (Tris 20nM, NaCl 500 mM, 0.1% Tween-20, pH 7.5), conteniendo 5% de leche descremada, a 4°C, en agitación por 2 a 8 horas. Posteriormente se decanta la solución de bloqueo y se lava la membrana con TTBS, 30 min. con cambios constantes y se incuba con la dilución adecuada del anticuerpo primario, en una solución de leche descremada al 2.5% en TTBS a 4°C, en agitación por toda la noche. En este trabajo se utilizaron anticuerpos policlonales anti-Bax y anti-Bcl-2 de Santa Cruz Biotechnology conjugados con fosfatasa alcalina. Después se decanta la solución con el anticuerpo primario y se lava la membrana en TTBS, 30 minutos con cambios constantes. En seguida, se incuba con el anticuerpo secundario acoplado a fosfatasa alcalina (Boehringer, 1:1000 a 1:2000) en TTBS con leche al 2.5% por 30 minutos a 1 hora y finalmente se lava con TTBS 30 min. (cambios constantes). Al terminar se incuba la membrana con la solución que contiene el sustrato quimioluminiscente (Immuno-Star,

Biorad) por 5 minutos. A continuación se remueve el exceso de líquido de la membrana, evitando que la membrana se seque para prevenir la pérdida de señal y se coloca en una bolsa de plástico sellada. Finalmente, se expone la membrana a película instantánea (Kodak, X-Omat). El tiempo de exposición dependerá del tipo de película y concentración de la proteína a detectar y finalmente se revela la película.

Fraccionamiento celular

La liberación del citocromo c de la mitocondria al citosol se analizó determinando la cantidad presente de esta proteína tanto en la fracción citosólica, como en la fracción mitocondrial, para lo cual se utilizó una técnica de fraccionamiento celular (modificación de Scarlett & Murphy, 1997).

Las células se homogenizan en 150 μ l de solución I (sacarosa 225 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7.4, EGTA 0.3 mM, suplementada con los inhibidores de proteasas aprotinina (2 μ g/ml), leupeptina (10 μ g/ml), pepstatina (10 μ g/ml) y PMSF (1mM)) por caja de 60 mm (se utilizaron 2 cajas de 60 mm por condición). Las muestras se homogenizaron con un pulso de sonicación, para obtener el homogenado total, el cual se centrifuga posteriormente a 1500 x g, 10 minutos para precipitar los núcleos y las células enteras. Se tomó el sobrenadante y se centrifugó a 16000 x g, 30 min., para obtener un pellet que contiene las mitocondrias, el cual se resuspendió en 100 μ l de solución I para obtener la fase mitocondrial. Se conserva el sobrenadante, que constituye la fracción citosólica.

Posteriormente, se determinó la cantidad de proteína total de las fracciones celulares obtenidas mediante el método de Bradford. La misma cantidad de proteína total de cada muestra fue sometida a un gel SDS-PAGE (15%) y se realizó una técnica de réplica tipo Western utilizando un anticuerpo policlonal contra citocromo c (Santa Cruz).

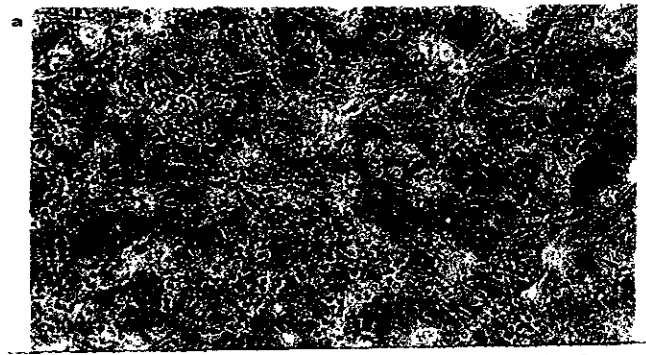
V.- RESULTADOS

Morfología

Para determinar el estado morfológico de las células a diferentes tiempos de tratamiento se realizaron observaciones en microscopía de contraste de fase.

En los primeros 4 DIV tanto las células control (K5) como las tratadas con NMDA presentan somas redondas y turgentes que se agrupan formando cúmulos, comunicados por redes de procesos neuronales. A partir de los 5-8 DIV las células control empiezan a degenerar mostrando irregularidades en la membrana plasmática, los procesos se adelgazan y se fragmentan (figura 10). Sin embargo, las células tratadas con NMDA sobreviven en buen estado hasta los 11 DIV, mostrando somas redondas y oscuras y procesos gruesos y fuertes (figura 10). A partir de esta edad, las células tratadas con NMDA inician un proceso de degeneración similar al observado en las células control. Los cultivos que desde el primer día se mantienen en un medio con altas concentraciones de potasio (K25) presentan diferencias con respecto al control a partir de los 3 DIV (figura 10). Se puede apreciar una mayor densidad neuronal, organizada en cúmulos compuestos por varias somas grandes y turgentes, interconectados por paquetes de procesos fuertes. Se ha demostrado que la sobrevivencia de estas células alcanza las tres semanas en cultivo (Gallo et al, 1987).

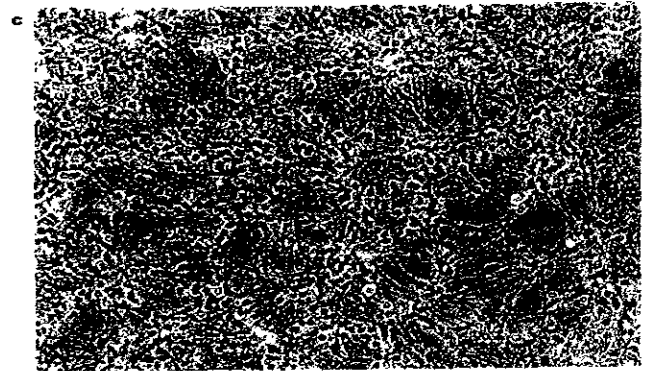
Por otro lado, las células que crecen en un medio con K25 y que a los 7 DIV se les cambia el medio por uno con K5, sin suero, muestran la degeneración de un gran porcentaje de la población a las 24 horas después del cambio de medio (figura 11). Bajo estas condiciones, los cambios morfológicos observados corresponden en gran medida a los descritos: encogimiento de los somas y disminución en el diámetro y posterior fragmentación de los procesos (D'Mello et al, 1993)



Control



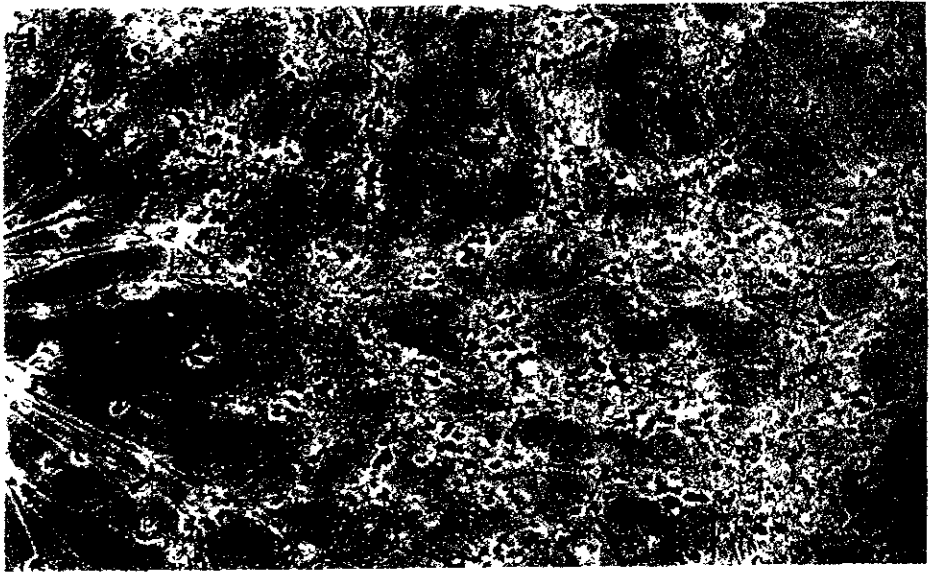
NMDA



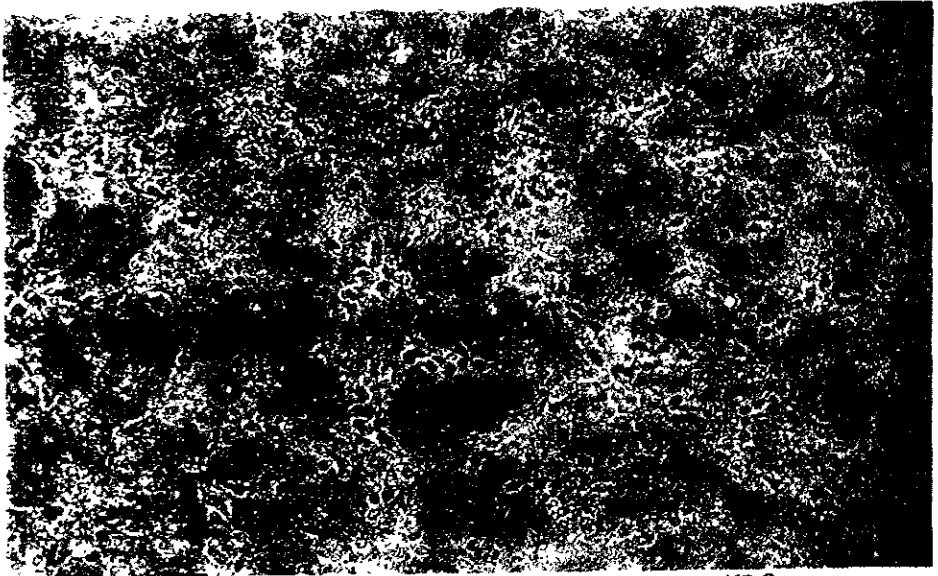
K25

FIGURA 10

Efecto del NMDA y K25 en el desarrollo de las neuronas granulares del cerebelo en cultivo. Las fotografías fueron tomadas a los 7 DIV. a) Células granulares crecidas durante 7 DIV en un medio de cultivo con K5. Las células muestran signos de degeneración de los somas y adelgazamiento y fragmentación de los procesos. b) Células granulares que se sembraron en un medio con K5 y que a los 2 DIV se trataron con 150 μM de NMDA. A los 7 DIV estas células siguen en buen estado, mostrando somas redondos y turgentes y procesos fuertes c) Células granulares que crecieron durante 7 DIV en un medio de cultivo con K25. En esta condición el cultivo muestra una alta densidad neuronal, organizada en cúmulos compuestos de somas grandes interconectados por procesos gruesos.



K25



K5-S

Figura 11.

Efecto de la disminución de la concentración de K25 a K5 en el medio a los 7 DIV. Las células crecen en un medio con K25 el cual es sustituido a los 7 DIV por otro con K5, sin suero. Las fotografías fueron tomadas a las 24 horas después del cambio de medio. a) Cultivo que permanece con K25 en el que se observan los somas grandes y procesos fuertes, característicos de el mantenimiento del cultivo en condiciones de altas concentraciones de potasio. b) Cultivo sometido a la disminución en las concentraciones de potasio. Podemos observar la degeneración de las células, que se manifiesta con el encogimiento de los somas y la destrucción de los procesos.

Sobrevivencia

Efecto de la estimulación con NMDA en la sobrevivencia de las células granulares del cerebelo

La sobrevivencia celular se evaluó mediante la técnica de reducción de MTT. Cuando las células se tratan crónicamente con NMDA (150 μ M) durante 7 DIV, la sobrevivencia celular aumenta en un 93%, mientras que el tratamiento con altas concentraciones de potasio la aumenta hasta un 111% en relación al control (figura 12).

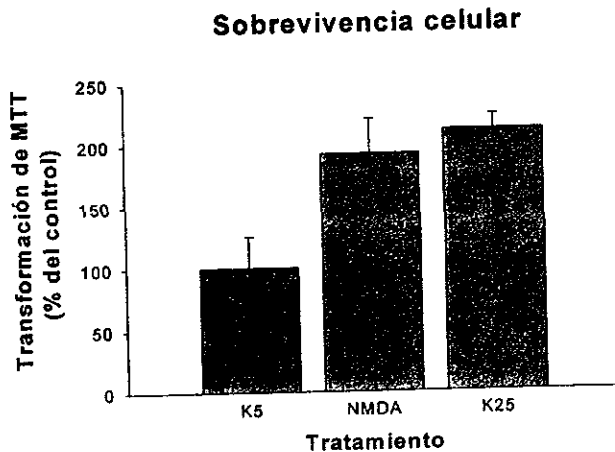


Figura 12

Efecto del tratamiento con NMDA (150 μ M) y KCl (25mM) en la sobrevivencia celular evaluada a los 7 DIV. Las barras son el promedio \pm error estandar de 3 experimentos semparados. La gráfica muestra un marcado aumento en la sobrevivencia de las células granulares que reciben un estímulo de despolarizante, ya sea por la estimulación de los receptores de glutamato tipo NMDA o por tratamiento con altas concentraciones de potasio

Efecto de la privación de KCl en la sobrevivencia de las células granulares del cerebelo

La viabilidad de las neuronas mantenidas en K25 durante 6-8 DIV y luego sometidas a una privación de estimulación despolarizante (K5), se determinó a las 12, 24, 36 y 48 horas después de reemplazar el medio K25 por otro conteniendo K5, sin suero. Para este experimento se utilizaron como control, células en las que el medio fue reemplazado por uno con K25, sin suero.

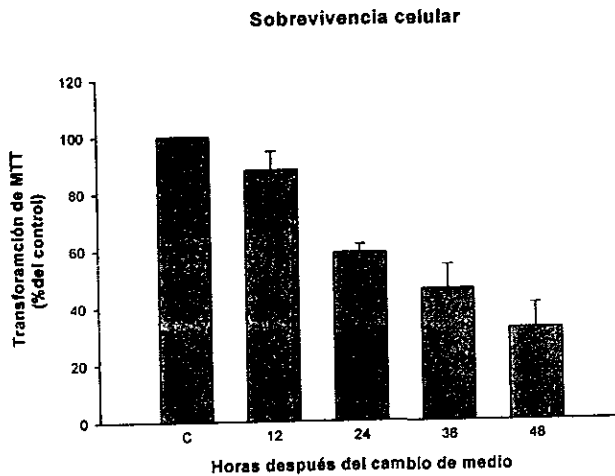


Figura 13

Efecto de la sustitución de un medio con K25 por otro con K5 en la sobrevivencia celular. Las barras son el promedio \pm el error estándar de 3 experimentos por separado. Las células crecen durante 7DIV en un medio con K25 y posteriormente son sometidas a un cambio de medio por otro sin suero, con K5. La gráfica muestra que la sobrevivencia de estas células disminuye a lo largo de las horas después del cambio de medio, hasta alcanzar un 20-30% de sobrevivencia a las 48 horas, en comparación con el control mantenido en altas concentraciones de K.

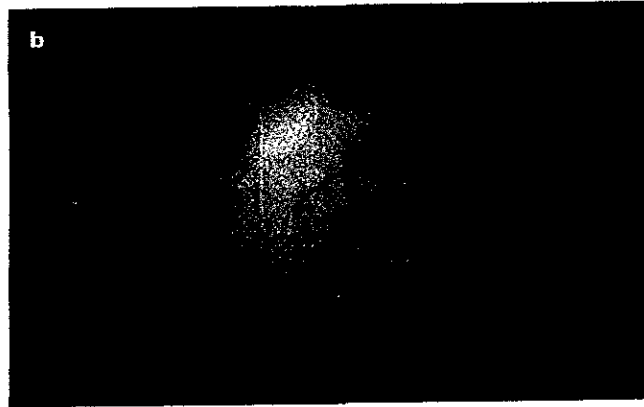
Bajo estas condiciones la viabilidad de las células disminuye a partir de las 12 horas después del cambio, alcanzando un 50% a las 24 horas y un 80% a las 48 horas (figura 13).

Reportes previos señalan que la muerte de las células granulares del cerebelo que se mantienen en un medio con concentraciones fisiológicas de KCl (K5) presenta características morfológicas y bioquímicas de tipo apoptóticas (Gallo et al, 1987; D'Mello et al, 1993; Yan et al, 1994; Galli et al, 1995; Morán et al, 1996). Tinciones con el colorante fluorescente Hoechst No. 33258, que se une al material nuclear (figura 14), muestran que los núcleos de estas células presentan una condensación de la cromatina a los 7 DIV, en concordancia con reportes previos que describen el fenómeno de muerte apoptótica en células granulares del cerebelo.

De la misma manera, se ha demostrado que la muerte de las células granulares diferenciadas inducido por la privación de K^+ es de tipo apoptótico (Gallo et al, 1987; D'Mello et al, 1993; Yan et al, 1994), pudiendo observarse una gran cantidad de núcleos condensados 24 horas después del cambio, en comparación al control mantenido en K25 (figura 15).



Control



NMDA

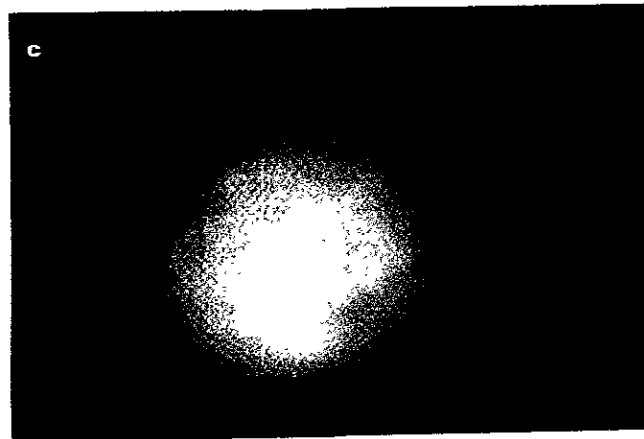
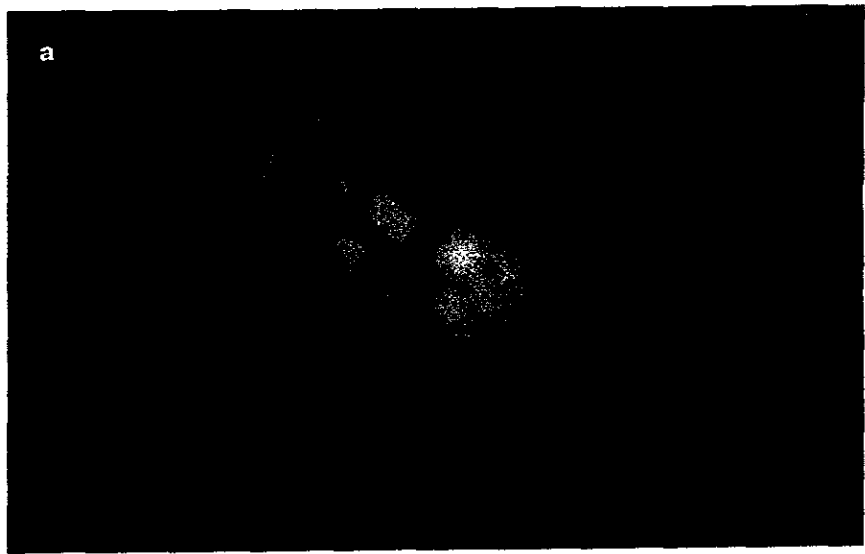


Figura 14

Tinción del material nuclear con Hoechst de: a) células control (K5), b) células tratadas con NMDA a los 2DIV y c) células mantenidas en condiciones de alto potasio. En las células control se observan varios núcleos con la cromatina condensada, mientras que las células tratadas presentan núcleos con la cromatina dispersa.



K25



K5 - s

Figura 15

Tinción del material nuclear con Hoechst a las 24 horas después del cambio de medio. En las células control (K25) se observa la cromatina dispersa (a), mientras que las células que se les sustituyó el medio por uno con K5, sin suero muestran núcleos con la cromatina condensada (b).

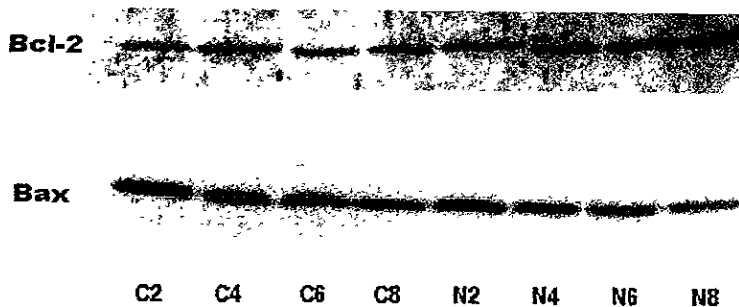
Niveles de proteína

Para estudiar la participación de las proteínas de la familia de Bcl-2 y del citocromo c en el proceso de muerte de las células granulares en cultivo, se cuantificaron los niveles de Bcl-2, Bax y citocromo c mediante la técnica de réplica tipo Western, en células que se desarrollan en condiciones de bajas concentraciones de potasio (K5), en células tratadas con NMDA y en células a las que se les sustituye un medio con altas concentraciones de potasio (K25) por uno con bajas concentraciones (K5).

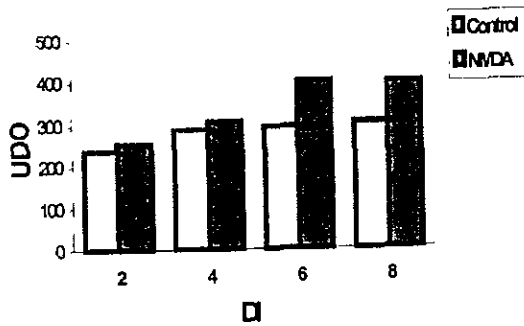
Efecto del NMDA sobre los niveles de Bcl-2, Bax y citocromo c en células granulares del cerebelo

Se obtuvieron homogenados totales y se analizaron las mismas cantidades de proteína de células de 2,4,6 y 8 DIV crecidas en K5 o tratadas con NMDA.

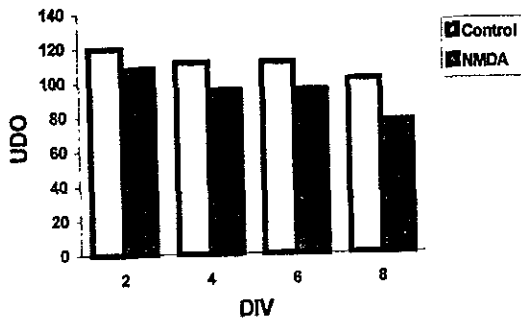
a



Niveles de Bcl-2



Niveles de Bax



b

Relación niveles Bcl-2/Bax

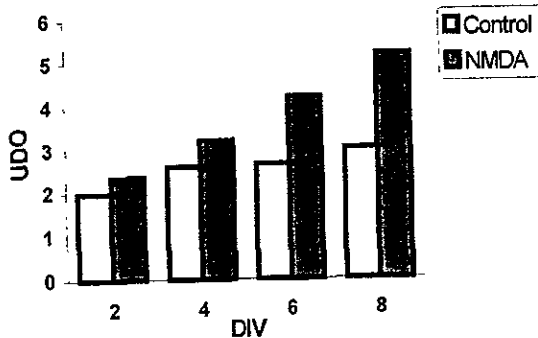


FIGURA 16

Efecto del NMDA sobre los niveles de Bcl-2 y Bax. a) La réplica tipo Western muestra que el tratamiento con NMDA provoca un aumento en los niveles de Bcl-2 alrededor de los 6-8 DIV, mientras que no afecta el comportamiento de los niveles de Bax, con respecto a las células control (K5) b) El análisis de la relación de los niveles proporcionales de la proteína antiapoptótica sobre la proapoptótica, muestran que la relación Bcl-2/Bax aumenta a lo largo de los días en cultivo y que este aumento es mayor en las células tratadas con NMDA que en las células control en todos los DIV analizados. Los datos graficados son el resultado de la cuantificación de un solo inmunoanálisis representativo de 3 repeticiones.

Los resultados obtenidos en las células control muestran que los niveles de Bcl-2 presentan una tendencia a incrementar con el tiempo en el cultivo, alcanzando un máximo de aproximadamente el 27% a los 8 DIV con respecto a los 2 DIV (figura 16). El tratamiento con NMDA incrementa significativamente esta tendencia alcanzándose un máximo del 56% a los 6-8 DIV con respecto a los 2 DIV. El tratamiento con NMDA por 6-8 DIV induce un aumento de 31-36% respectivamente en relación a los niveles en las células control (figura 16).

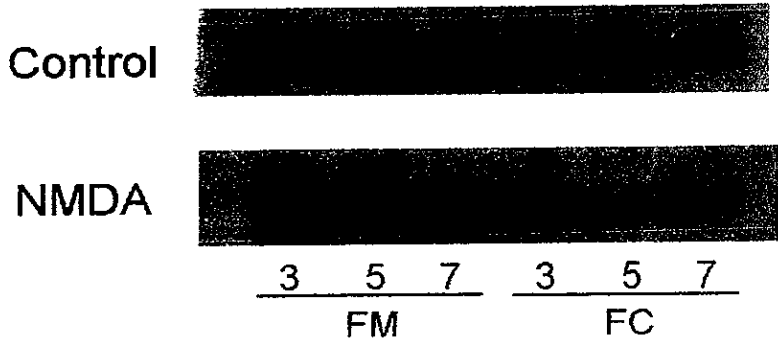
Los niveles de Bax presentan una tendencia a disminuir con el tiempo en cultivo, alcanzando un mínimo de 17% a los 8 DIV con respecto a los 2 DIV. El tratamiento con NMDA no cambia esta tendencia, aunque la disminución en los niveles de esta proteína alcanza aproximadamente un 29% a los 8 DIV con respecto a los 2 DIV (figura 16 a).

Los niveles relativos de Bcl-2/Bax en los cultivos control presentan un aumento del 50% en el DIV 8 con respecto al DIV 2, mientras que esta relación aumenta un 120% en las células tratadas con NMDA (Figura 16 b).

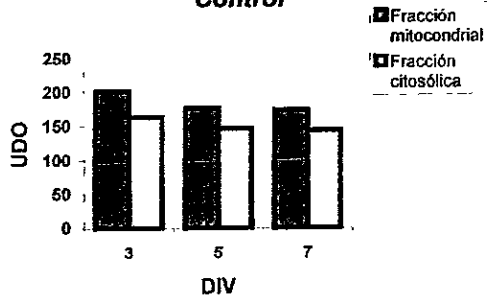
Se analizaron los niveles del citocromo c tanto en las fracciones mitocondriales, como en las fracciones citosólicas, para determinar si la liberación de esta proteína de la mitocondria hacia el citosol participa como parte de la vía de señalización en el proceso de muerte observado en los dos modelos utilizados en este trabajo. En el modelo de muerte inducida por la falta de estimulación depolarizante en las etapas tempranas del desarrollo en cultivo, también se analizó el efecto del tratamiento con NMDA sobre los niveles de citocromo c en ambas fracciones.

Se utilizaron células de 3, 5 y 7 DIV control y tratadas con NMDA, a partir de las cuales se obtuvieron fracciones mitocondriales y citosólicas de cada condición, que se analizaron por medio de la técnica de réplica tipo Western, utilizando un anticuerpo policlonal contra citocromo c (Santa Cruz).

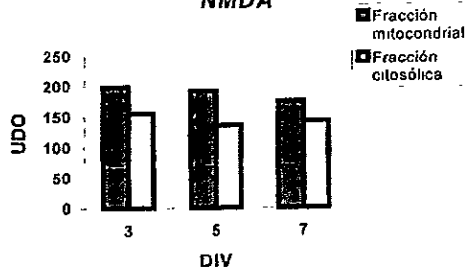
a



Niveles de citocromo c
Control



Niveles de citocromo c
NMDA



b

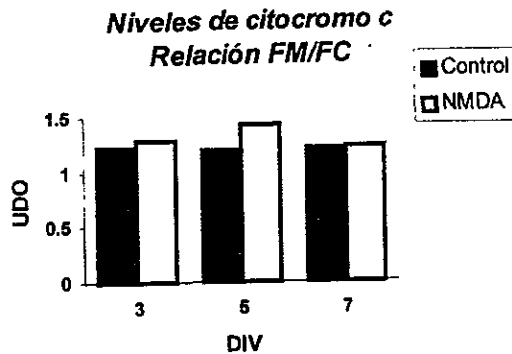


FIGURA 17

Niveles de citocromo c en fracciones de células control de células tratadas con NMDA. a) El Inmunoanálisis muestra que en los días analizados, no se observan cambios significativos en la localización del citocromo c tanto en las células control, como en las células tratadas. b) La gráfica nos muestra que la relación de los niveles de citocromo c en la fracción mitocondrial contra la fracción citosólica no cambia en los tiempos analizados, lo que sugiere que no hay cambios netos en la localización de esta proteína. Los datos graficados son el resultado de la cuantificación de un solo inmunoanálisis representativo de 3 repeticiones.

Los resultados muestran que en las células control se induce una pequeña disminución de los niveles de esta proteína en las fracciones mitocondriales del día 3 al 5 manteniéndose constante en el día 7, sin embargo no se distingue un aumento significativo en los niveles de las fracciones citosólicas (figura 17). Las células tratadas con NMDA muestran niveles mayores de esta proteína en las fracciones mitocondriales en comparación con las células control, sin embargo presentan la misma tendencia de disminución en la fracción mitocondrial con el tiempo en cultivo, y ningún cambio significativo en los niveles de esta proteína en las fracciones citosólicas. También se utilizó como un control el análisis de los niveles de citocromo c en los homogenados totales de las mismas condiciones y se observó que las células tratadas con NMDA muestran un pequeño aumento de la proteína con respecto a sus controles (No se muestra).

Como se observa en la gráfica en la figura 17b, la relación de los niveles de citocromo c en la fracción mitocondrial y la fracción citosólica no muestran cambios significativos.

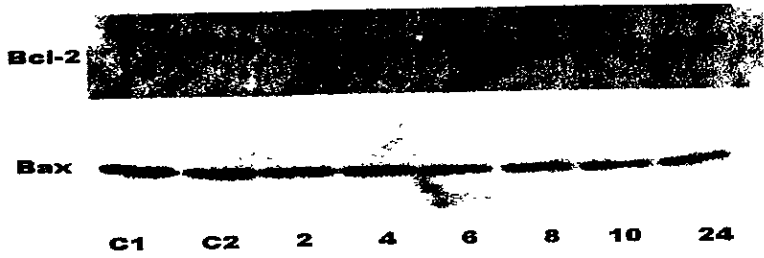
Efecto de la privación de KCl sobre los niveles de Bcl-2, Bax y citocromo c

Por otro lado, se analizaron cultivos que se mantuvieron en un medio con K25 por 7 DIV, cuando se les sustituyó este medio por uno con K5, sin suero. Después de 2, 4, 6, 8, 10 y 24 horas a partir del cambio, se obtuvieron homogenados totales de estas poblaciones, que se analizaron por medio de la técnica de réplica tipo Western, utilizando anticuerpos policlonales contra Bax y Bcl-2. Se utilizó un control sin cambio de medio y otro con cambio a medio nodriza (K25).

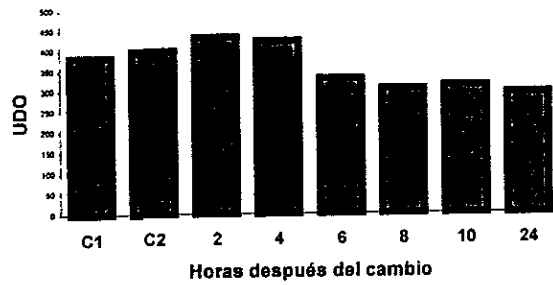
Los resultados mostraron que los niveles de Bcl-2 se mantienen sin cambios significativos al menos hasta 26 horas después del cambio. Por otro lado, los niveles de Bax presentan de las 2 a las 4 horas una ligera tendencia de aumento y posteriormente disminuyen, hasta alcanzar a las 26 horas el 24% del control sin cambio de medio y el 27% del control con cambio de medio nodriza (Figura 18 a).

La relación Bax/Bcl-2 presenta un pequeño aumento a las 2 horas después del cambio de medio y posteriormente disminuye a lo largo de las horas (figura 18 b).

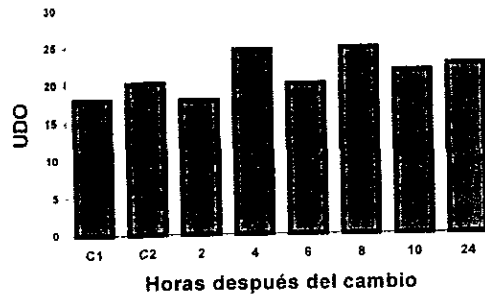
a



Niveles de Bax



Niveles de Bcl-2



C1= sin cambio de medio

C2= Cambio con medio nodriza (K25)

b

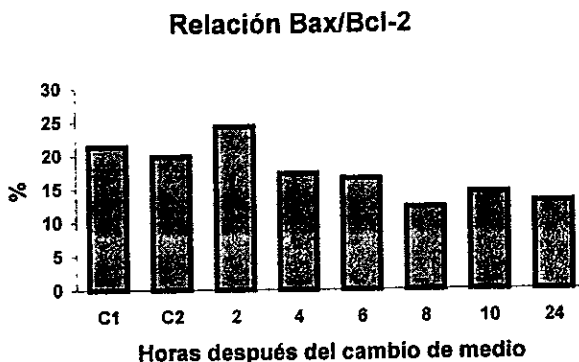


FIGURA 18

Efecto de la privación de K^+ en los niveles de Bax y Bcl-2. Las células fueron sometidas a una disminución de las concentraciones de potasio a los 7 DIV. a) Se analizaron lisados celulares a diferentes horas después del cambio de medio con la réplica tipo Western utilizando anticuerpos policlonales contra Bax y Bcl-2. El inmunoanálisis muestra que los niveles de Bcl-2 se mantienen sin cambios significativos hasta las 24 horas después del cambio de medio, mientras que los niveles de Bax presentan una pequeña disminución a partir de las 4 horas. b) La gráfica muestra que la relación de Bax/Bcl-2 disminuye a lo largo de las horas después del cambio de medio. Los datos graficados son el resultado de la cuantificación de un solo inmunoanálisis representativo de 3 repeticiones.

De la misma manera se utilizaron células sometidas al mismo tratamiento de cambio de medio, las cuales se procesaron a las 2, 4, 6, 8 y 24 horas después del cambio para obtener las fracciones mitocondriales y citosólicas correspondientes. La inmunodetección de citocromo c no muestra cambios significativos en los niveles de esta proteína en ninguna de las dos fracciones (Figura 19).

En los niveles relativos de citocromo c en ambas fracciones se observa un pequeño incremento a las 2 horas el cual, más que a un incremento en la fracción mitocondrial, se debe a una disminución en los niveles en la fracción citosólica (figura 19b). Posteriormente a las 4 y 6 horas después del cambio de medio se presenta una disminución en este valor la cual a las 4 horas representa una disminución total del citocromo c en ambas fracciones y a las 6 horas se determina por la disminución de esta proteína en la fracción mitocondrial y un ligero aumento en sus niveles en la fracción citosólica.

A

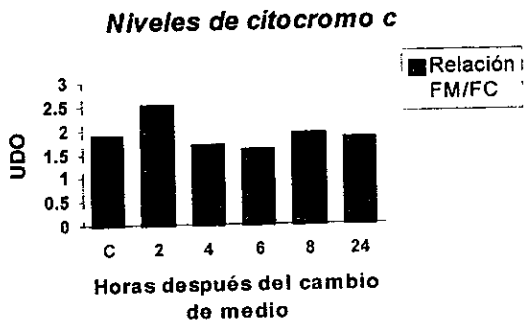
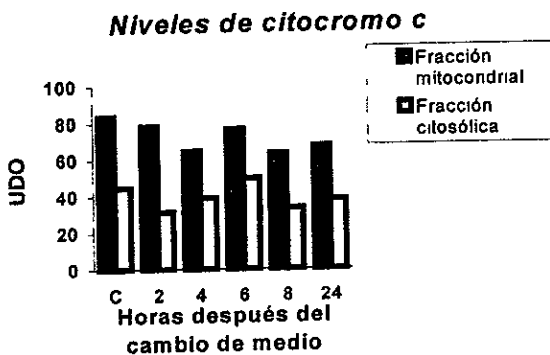
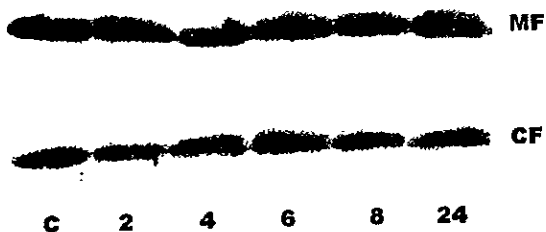


FIGURA 19

Efecto de la privación de K^+ en la localización del citocromo c. Se obtuvieron fracciones celulares de cultivos a los cuales se sometieron a los 7 DIV a una disminución en las concentraciones de potasio en el medio de cultivo y se analizaron mediante un inmunanálisis. a) los resultados muestran que, aunque se observa una pequeña disminución en la fracción mitocondrial, no hay un aumento significativo en los niveles de esta proteína en el citosol. b) Esta observación se hace evidente al observar en la gráfica que no hay cambios claros en los la relación de los niveles de citocromo c en ambas fracciones. Los datos graficados son el resultado de la cuantificación de un solo inmunanálisis representativo de 3 repeticiones.

Efecto de la privación de KCl sobre la relocalización de Bcl-2 y Bax

Ya que no se observaron cambios significativos en los niveles Bcl-2 y Bax, estudiamos la posibilidad de una redistribución de Bcl-2 y Bax de una fracción a otra, que pudiera mostrar una modificación posttraduccional, que indicara su participación en algún nivel de la vía de señalización de muerte de las células granulares maduras.

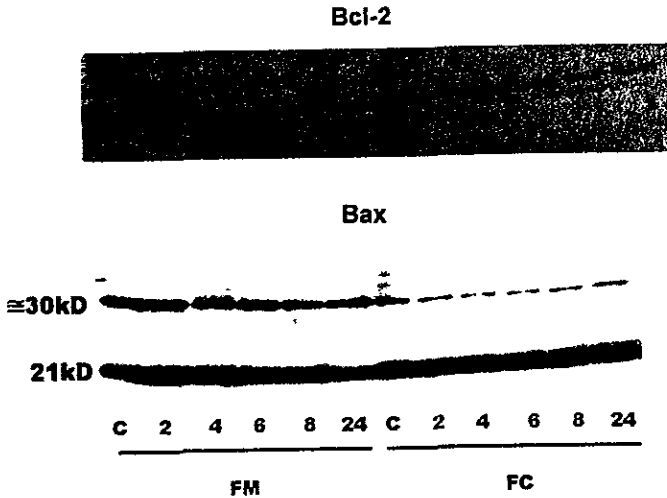


FIGURA 20

Efecto de la privación de KCl en la relocalización de Bcl-2 y Bax. Se obtuvieron fracciones celulares de cultivos a los cuales se les sustituyó el medio de cultivo con K25 por otro con K5, sin suero a los 7 DIV. Las fracciones mitocondriales y citosólicas se corrieron en un SDS-PAGE y se analizaron mediante un réplica tipo Western utilizando anticuerpos policlonales contra Bax y Bcl-2.

En el caso de Bcl-2 no se presentaron cambios en su localización subcelular. El monómero de Bax (21kD) se encuentra tanto en la fracción citosólica, como en la fracción mitocondrial a lo largo de las horas después del cambio de medio, sin presentar cambios en su localización. Los resultados muestran una banda de aproximadamente 30 kD que es reconocida inespecíficamente por el anticuerpo policlonal utilizado.

Los inmunoanálisis muestran que los niveles de Bcl-2 se mantienen constantes a través del tiempo. En el caso de Bax se observa que los niveles de lo que sería el monómero de Bax (21kD) no muestra cambios significativos en los niveles de ambas fracciones (figura 20).

VI.- DISCUSION

Estudios previos muestran que las células granulares del cerebelo de rata en cultivo que no reciben un estímulo despolarizante mueren de manera apoptótica a partir de los 5 DIV. Por otra parte, las células que crecen en un medio con altas concentraciones de potasio y que son sometidas a la privación de potasio y suero, mueren también de manera apoptótica dentro de un período de 24 a 48 horas (figuras 11 y 13). En este trabajo, nosotros confirmamos estas observaciones al detectar una reducción significativa de MTT, así como la condensación de la cromatina de las células mantenidas en K5 y las células sometidas al cambio de medio (figuras 14 y 15).

Un estudio previo sugiere que estos dos modelos de muerte en cultivos de células granulares del cerebelo, finalmente inducidos por el mismo estímulo (en este caso la disminución en los niveles intracelulares de calcio), presentan dos programas de muerte diferentes (De Luca et al, 1996). El trabajo de De Luca, un estudio de respuesta a tratamientos con citocinas y neurotrofinas en células granulares inmaduras y maduras, muestra que el tratamiento con algunos de estos factores retrasa el proceso de muerte apoptótica en las células crecidas a bajo potasio, mientras que el tratamiento no tiene efecto en las células que crecen en condiciones de alto potasio y posteriormente son sometidas a un cambio de medio con bajas concentraciones de potasio. En base a estos datos, ellos proponen que los dos modelos de muerte son diferentes en cuanto a su respuesta a un mismo estímulo, definida por los diferentes estados de maduración de las células.

Entre los productos génicos involucrados en la regulación de la apoptosis se distingue la participación de las proteínas de la familia de Bcl-2, en la que se incluyen proteínas que tienen un efecto antiapoptótico y otras que promueven la muerte. Se sabe que el tratamiento de las células granulares con NMDA aumenta la sobrevivencia, inhibiendo el programa apoptótico. El incremento de calcio intracelular provocado por la estimulación del receptor tipo NMDA podría activar una vía de señalización que tuviera efecto sobre la expresión de genes relacionados con la regulación de la muerte, de tal manera que promoviera la sobrevivencia. En este trabajo analizamos el comportamiento de los niveles de dos de las proteínas más estudiadas de esta familia, Bax y Bcl-2, en dos modelos de muerte de células granulares del cerebelo de rata en cultivo.

Se ha propuesto que el Bcl-2 endógeno es capaz de regular la muerte de las células granulares inducida por diferentes estímulos, como la disminución de la concentración de K⁺ en el medio, la remoción del suero del medio en condiciones de alto potasio los tratamientos con etopósidos,

A23187 o nimodipina (Tanabe et al, 1997). En el trabajo del grupo de Tanabe se realiza un "knockout" del gen bcl-2 en células granulares del cerebelo y encuentran que la muerte inducida por la disminución en las concentraciones de potasio en el medio de cultivo se acelera en comparación a las células de tipo silvestre. Sin embargo, no se ha podido mostrar hasta ahora que los niveles de esta proteína se modifican bajo condiciones que promueven (K5) o protegen contra la muerte apoptótica (NMDA o K25) en este modelo.

Modelo de muerte apoptótica de las células granulares del cerebelo por falta de estimulación despolarizante durante su desarrollo en cultivo.

Los resultados de nuestro estudio muestran que las células que crecen en un medio con concentraciones fisiológicas de potasio muestran un pequeño aumento en los niveles de Bcl-2 a lo largo de los días en cultivo (figura 16). Esto coincide con lo observado durante el desarrollo *in vivo* (Castrén et al, 1994; Merry et al, 1994). En el caso del desarrollo del cerebelo de la rata se detectan altos niveles del mensajero de Bcl-2 en las neuronas granulares en P2, P10 y P15 (Castrén et al, 1994). En desarrollo del ratón se presentan altos niveles de esta proteína en las células granulares alrededor del P11, los cuales se retienen en las células diferenciadas de la capa granular interna (Merry et al, 1994). Se ha sugerido que el hecho de que la expresión de Bcl-2 se mantenga en tiempos posteriores a la etapa de muerte reportada en la primera semana postnatal (P5-P9) puede indicar que además de jugar un papel importante en la sobrevivencia de éstas neuronas Bcl-2 puede estar relacionado con algún proceso en la diferenciación (Wood et al, 1993).

Bajo estas mismas condiciones se observa una disminución de los niveles de Bax a lo largo de los días en cultivo (figura 16). Este efecto puede estar relacionado con el decremento general de los niveles de esta proteína en el cerebelo total, que se reporta en estudios inmunohistoquímicos del desarrollo del sistema nervioso de rata *in vivo* (Vekrellis et al, 1997). Durante el desarrollo del cerebelo los niveles de Bax son altos en los días postnatales 1-8 y posteriormente disminuyen, alcanzando una reducción del 50% al día 15, la cual aumenta hasta el día 21, hasta desaparecer en el cerebelo maduro. Por lo tanto, los niveles más altos de Bax *in vivo* coinciden en el tiempo con el proceso de muerte de un gran número de neuronas granulares que ocurre en la primera semana postnatal (Wood et al, 1993). De acuerdo a esto, en el presente estudio se encontró que en los primeros días de cultivo los niveles de esta proteína se encuentran altos, ya que en el momento en

que se obtienen las células para el cultivo (P8), éstas se encuentran al final de un proceso de selección a través de una etapa de muerte. Así mismo, el decremento que se observa a lo largo de los días en cultivo, puede estar relacionado con el decremento que se observa *in vivo* del día P8 hacia P15 y días posteriores, equivalente a los 1 a 7DIV.

Se ha propuesto que en algunos modelos la muerte apoptótica depende de en parte de la relación de las proteínas proapoptóticas en proporción con las antiapoptóticas (Bcl-2/Bax), más que de sus niveles absolutos por separado (Oltvai et al, 1993; revisión en Merry & Korsmeyer, 1997). En nuestro modelo, en las células control la relación de los niveles de Bcl-2/Bax presenta un aumento a lo largo de los días, el cual no parece ser suficiente para mantener la sobrevivencia.

Se ha propuesto que Bax es capaz de promover la liberación del citocromo c de la mitocondria, el cual en asociación con otras proteínas citosólicas provoca la activación de la cascada de caspasas, iniciando de esta manera el programa de muerte (Jürgensmeier et al, 1998). En este estudio se sugiere un modelo de liberación del citocromo c mediado por Bax, en el cual Bax es capaz de causar la liberación del citocromo directamente y sin ningún cambio morfológico aparente, como el hinchamiento de la mitocondria e independientemente de la interacción con miembros antiapoptóticos de la familia de proteínas tipo Bcl-2. Se calcula que se libera alrededor de 20% del total del citocromo c, el cual es suficiente para el mecanismo de activación de caspasas, y posiblemente el citocromo restante sostenga la cadena respiratoria y los niveles de energía necesarios para el proceso activo de muerte apoptótica.

En este trabajo exploramos también la posibilidad de que la liberación del citocromo c fuera una parte importante del programa de muerte inducido por falta de un estímulo depolarizante durante el desarrollo de las células granulares en cultivo, ya fuera por la acción directa de Bax o por alguna otra vía que promoviera esta liberación. En este sentido, encontramos que en las células control, aunque se observa una pequeña disminución en los niveles de citocromo c en la fracción mitocondrial, no se observa un aumento significativo en la fracción citosólica, a lo largo de los días en cultivo (figura 17a). Al calcular la relación de los niveles de esta proteína en ambas fracciones encontramos que no se presenta ningún cambio neto significativo (figura 17b) en los días analizados. El evento de muerte en este modelo es relativamente heterogénea en tiempo, por lo que probablemente no pudimos captar el evento puntual de la salida del citocromo c hacia el citosol. Sin embargo no pudimos detectar el cambio evidente esperado en la población en los días anteriores a los 7DIV cuando ya se observa una disminución significativa de la sobrevivencia.

Algunos reportes recientes muestran la existencia de modelos apoptóticos independientes de la liberación del citocromo c de la mitocondria, por lo que se sugiere que este evento puede ser dependiente del tipo celular y del estímulo apoptótico. (Chauhan et al, 1997; Li et al, 1997; Tang et al, 1998; Adachi et al, 1998). Este podría ser el caso de nuestro modelo, sin embargo para asegurar el papel del citocromo c en este modelo sugerimos la realización posterior de experimentos de inmunodepleción del citocromo c utilizando anticuerpos contra esta proteína y ver si se inhibe la muerte de estas neuronas y de esa manera determinar si la liberación del citocromo es un evento clave en el proceso de muerte.

Modelo de muerte de células granulares del cerebelo maduras inducida por la disminución en la concentración K⁺ en el medio.

Cuando las células granulares cultivadas durante 7-8 DIV en un medio con alto potasio (K25) son sometidas a un cambio de medio con bajo potasio (K5) sin suero, mueren apoptóticamente (Gallo et al, 1987; D'Mello et al, 1993; Yan et al, 1994). Las células privadas de estimulación comienzan a mostrar cambios morfológicos a partir de las 6 horas, aunque el fenómeno de muerte en el cultivo, en general, es heterogéneo, pudiendo encontrar células en buen estado aún 24 horas después del cambio. En este sentido, debe de tomarse en cuenta el estudio de Miller y colaboradores (Miller et al, 1996), que sugiere que en este modelo se observa un proceso bifásico ya que el cultivo presenta células con diferente sensibilidad. Así, una población de células es más sensible a la falta de suero y mueren más rápidamente, mientras que otra población es más sensible a la disminución en las concentraciones de potasio y su muerte es sensiblemente más lenta.

Por otro lado, se debe tomar en cuenta que la evaluación de la sobrevivencia por la reducción del MTT es un método indirecto para la determinación de la sobrevivencia celular, el cual se basa en el funcionamiento de la mitocondria como indicativo de viabilidad celular. Sin embargo, debe recordarse que la muerte apoptótica es un proceso activo, que requiere de energía para llevar a cabo un programa cuyo resultado es una muerte organizada, con el fin de no afectar a las células adyacentes. Para disponer de esa energía es necesario que se mantenga por lo menos una parte de las mitocondrias en buen estado estructural y funcional. Por esto, existe un desplazamiento temporal en la curva de sobrevivencia obtenida mediante este método, ya que pueden interpretarse

como un signo de viabilidad los datos obtenidos en base a mitocondrias funcionales de células que ya están comprometidas a morir.

Utilizando este mismo modelo de muerte apoptótica en neuronas granulares, Gleichmann y colaboradores (Gleichmann et al, 1998) muestran que no hay cambios en los niveles de RNA mensajero, ni en los niveles de proteína de Bax y Bcl-2 y otros miembros de la familia de bcl-2 (bcl-xL, bcl-xS, bad, bag-1), con respecto al control (tratado con cambio de medio sin suero con K25). Por otra parte, el grupo de D'Mello reporta una disminución en los niveles del mensajero de bcl-2 y bcl-xL a las 4 horas después del cambio de medio y un aumento del de bcl-xs a las 2 horas (D'Mello et al, 1997). En el presente estudio encontramos un pequeño aumento de los niveles de Bcl-2 en las primeras horas después del cambio de medio (4-6 hrs.) (figura 18). Este aumento puede estar relacionado con la protección de una parte de la población vía la regulación de los niveles endógenos de Bcl-2, probablemente retrasando el proceso de muerte de esas células por unas horas. Esto se apoyaría en los estudios en células granulares del cerebelo que no expresan Bcl-2, cuya muerte inducida por la disminución del K⁺ en el medio de cultivo se acelera en comparación a las células de tipo silvestre (Tanabe et al, 1997).

En el trabajo del grupo de Gleichmann se observa que los niveles de Bax aumentan a lo largo del tiempo, aunque este dato no es tomado en cuenta por los autores en la discusión. A diferencia de este resultado, nosotros encontramos que los niveles de esta proteína permanecen sin cambios significativos hasta las 6 horas después del cambio de medio y posteriormente disminuyen manteniéndose hasta las 26 horas (figura 18). Este resultado ha sido consistente y constante.

El grupo de Miller sugiere que la producción endógena de Bax es necesaria para que se lleve a cabo la muerte de granulares de ratón por privación de potasio, ya que al generar un "knockout" de bax, aunque no se evitan cambios tempranos en el proceso de muerte, sí aumenta la sobrevivencia de las células sometidas a una disminución en las concentraciones de potasio en el medio (Miller et al, 1997). En sus resultados se observa que en los animales silvestre (Bax+/+), los niveles de RNA mensajero de Bax permanecen constantes en las primeras horas y posteriormente disminuyen entre las 12 y 72 horas después del cambio. Este resultado podría ser similar a nuestros resultados en el modelo de las células granulares de cerebelo de rata y parece indicar que el efecto de Bax no necesariamente está determinado por un aumento en la producción de esta proteína.

El grupo de Gleichmann también reporta que dentro del proceso de muerte está involucrada la salida del citocromo c de la mitocondria lo cual ocurre entre las 5 y 7 horas después del cambio. Esta información no coincide con los resultados encontrados en este trabajo, ya que no encontramos cambios significativos en la distribución de esta proteína hasta las 10 horas después del cambio de medio. Este dato coincide con otros resultados obtenidos en el laboratorio, en los que se demuestra que en este sistema no hay actividad de la caspasa 9, la cual es esencial en el modelo de activación de caspasas inducida por el citocromo c (Li et al, 1997; Pan et al, 1998).

Ya que no se encontraron cambios marcados en los niveles de Bax y Bcl-2 que puedan explicar los mecanismos celulares de esta muerte, exploramos la posibilidad de que el cambio no fuera a nivel de la síntesis de proteína, sino a través de cambios postraduccionales. En trabajos recientes se ha demostrado en algunos sistemas que, al contrario de lo que se pensaba, la localización de Bax no estaba limitada a la mitocondria, sino que también se encuentra como monómero en el citosol y que, ante un estímulo apoptótico este monómero se trasloca a la mitocondria, en donde se dimeriza y ejerce su efecto, probablemente provocando una disfunción mitocondrial (cambios en el potencial de membrana, formación de radicales libres y/o liberación de citocromo c). De esta manera, en este trabajo estudiamos la probabilidad de que en nuestro sistema el estímulo de muerte estuviera provocando la relocalización de una fracción de Bax que inactiva en el citosol, hacia la mitocondria donde se activaría provocando algún cambio que encendiera una vía de muerte independiente de la participación del citocromo c. Sin embargo, no encontramos cambios significativos en el monómero de 21 kD (figura 20).

Como un control se analizaron los niveles de Bcl-2 en ambas fracciones y se obtuvo una señal fuerte en la fracción mitocondrial, que no presentan cambios a lo largo del tiempo de tratamiento (figura 20), lo cual coincide con los resultados obtenidos a partir de homogenados totales. En la fracción citosólica se observa una señal basal constante, lo que puede deberse al Bcl-2 que se encuentra en el retículo endoplásmico y/o a contaminación con material mitocondrial liberado de células muertas de manera necrótica durante el proceso de cultivo o de tratamiento.

Como ya se ha mencionado, varios trabajos demuestran la importancia de las interacciones proteína-proteína entre los miembros de la familia de Bcl-2, como parte esencial en su regulación. En base a estas teorías, se podría esperar que la relación de los niveles de Bax/Bcl-2 aumentara en las células a las que somete a la privación de potasio, con respecto a las células control y que este aumento fuera más evidente a lo largo de las horas después del cambio de medio, conforme

aumenta el número de células que va muriendo. Sin embargo, los resultados muestran una disminución en los niveles relativos de Bax sobre los de Bcl-2 conforme transcurre el tiempo después del cambio de medio.

Debido a la redundancia en la función de los distintos miembros de la familia de proteínas de tipo Bcl-2, Bax y Bcl-2 podrían no estar involucrados directamente en la regulación de este modelo de muerte y ser otras las proteínas importantes. El estudio de Gleichmann y colaboradores (Gleichmann et al, 1998) muestra que por lo menos en el caso de bcl-x_L y bcl-x_S, bad y bag-1 no hay cambios en los niveles de mensajero, ni de proteína, sin embargo los resultados no son muy claros, ni contundentes.

Por otra parte, es importante considerar que la acción de los miembros pro y antiapoptóticos de la familia de proteínas de tipo Bcl-2 no es necesariamente dependiente del efecto inhibitor de unas sobre otras (Knudson & Korsmeyer, 1997; Clair et al, 1997), por lo que los valores relativos entre ellos no siempre definirán la sobrevivencia o la muerte de la célula.

Como sugiere el grupo de Gleichmann, aunque no muestren cambios en sus niveles protéicos, los miembros de la familia de proteínas tipo Bcl-2 pueden estar involucrados en el proceso de muerte de las células granulares del cerebelo en cultivo, regulando su actividad pro y antiapoptótica mediante cambios postraduccionales, como fosforilaciones, fragmentaciones o interacciones con otras proteínas (Ito et al, 1997; Datta et al, 1997; Cheng et al, 1997; Clem et al, 1998).

Inhibición del programa de muerte apoptótica de las células granulares en cultivo inducido por el NMDA.

La estimulación del receptor del tipo NMDA (150 μ M) a los 2DIV aumenta la sobrevivencia de estas células en cultivo sembradas en concentraciones fisiológicas de potasio.

Nuestros resultados señalan que las células tratadas presentan la misma tendencia en los niveles de Bax observada en las células control (K10), ya que éstos se encuentran altos en los primeros días de cultivo y posteriormente disminuyen a lo largo de los siguientes DIV.

El presente estudio muestra que este tratamiento induce un incremento en los niveles de Bcl-2 en las células tratadas por 6-8DIV que representa un 30-36% de aumento con respecto al control. Este

incremento se presenta en un período importante durante el desarrollo de estas células en el cultivo, ya que es el tiempo en el que se define su sobrevivencia o su muerte, dependiendo de la presencia de la estimulación depolarizante.

Al analizar la relación de los niveles de Bcl-2/Bax se observa un claro aumento de este valor en las células tratadas con NMDA a lo largo de los días de cultivo, aumentando a más del doble al comparar el DIV 8 con el DIV 2. Los valores de esta relación en todos los tiempos son mayores en las células tratadas en comparación con las células control. Este resultado sugiere una posible participación de Bcl-2 en la vía de inhibición de la muerte apoptótica inducida por el NMDA.

Se ha propuesto que el efecto antiapoptótico de Bcl-2 puede estar definido por su capacidad de inhibir la liberación de citocromo c (Kluck et al, 1997; Yang et al, 1997), por lo que el aumento de Bcl-2 observado en las células tratadas con NMDA podría actuar a este nivel. Nuestros resultados indican que las células tratadas muestran la misma tendencia de los niveles de citocromo c que las células control.

VII.- CONCLUSIONES

✓ Las células granulares del cerebelo en cultivo que no reciben un estímulo despolarizante, mueren de manera apoptótica a partir de los 5 DIV.

Bajo estas condiciones los niveles de Bax son altos en los primeros días y posteriormente disminuyen a lo largo de los días en cultivo, lo que sugiere que esta proteína no participa en el programa de muerte. Los niveles de la proteína antiapoptótica Bcl-2 muestran un pequeño aumento a lo largo de los días en cultivo.

En este modelo de muerte no hay relocalización del citocromo c de la mitocondria hacia el citosol en los DIV analizados en este estudio.

✓ La estimulación del receptor a NMDA incrementa la sobrevivencia de las células que crecen en un medio con K5.

Este tratamiento no tiene efecto en los niveles de Bax, en comparación con las células no tratadas. Sin embargo, el estímulo del receptor a NMDA provoca un aumento en los niveles de Bcl-2, mayor al observado en las células control. La relación proporcional Bcl-2/Bax en las células tratadas aumenta a lo largo de los días en cultivo y es mayor que el calculado para las células control en todas las edades analizadas

La estimulación de las células granulares con NMDA no induce la relocalización del citocromo c.

✓ Los cultivos de células granulares del cerebelo de rata crecidas durante 7 DIV a K25 mueren de manera apoptótica entre las 24 y 48 horas después de que el medio de cultivo es reemplazado por otro con K5, sin suero.

Estas células presentan un pequeño incremento en los niveles de Bcl-2 en las primeras horas después del cambio de medio y una disminución de los niveles de Bax

Los resultados presentados en este trabajo indican que la regulación de los niveles endógenos de Bax y Bcl-2 no participan en el programa de muerte apoptótico de las células

granulares del cerebelo de rata en cultivo privadas de estimulación por altas concentraciones de KCl en el medio de cultivo.

La participación de estas proteínas en esta vía podrían estar reguladas a nivel de alguna modificación en la actividad de la proteína ya sintetizada. En este trabajo se demostró que la privación de potasio a células granulares maduras no provoca la relocalización de Bax del citosol hacia la mitocondria, como sucede en algunos modelos apoptóticos.

Debido a la redundancia en la familia de las proteínas del tipo de Bcl-2 se podría esperar que otros miembros de la familia tuvieran un papel decisivo en este proceso de muerte.

BIBLIOGRAFÍA

- Adachi S., Gottlieb R. A. and Babior B. M. (1998). Lack of release of cytochrome c from mitochondria into cytosol early in the course of Fas-mediated apoptosis of Jurkat cells. *J Biol Chem* 273(31): 19892-19894
- Alnemri, E. Mammalian cell death proteases: a family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases. *J. Cell Biochem.* 64, 33-42 (1997).
- Allsopp, T.E., Kiselev, S., Wyatt, S., Paterson, H.F. & Davies, A.M. The proto-oncogene bcl-2 can selectively rescue neurotrophic factor-dependent neurons from apoptosis. *Cell* 73, 295-307 (1993).
- Antonsson, B., Conti, F., Ciavatta A.M., Montessuit, S., Lewis, S., Martinou, I., Bernasconi, L., Bernard, A., Mermoud, J.J., Mazzei, G., Maundrell, K., Gambale, F., Sadoul, R. & Martinou, J.C. Inhibition of Bax channel forming activity by Bcl-2. *Science* 277, 370-372 (1997).
- Atlante, A., Gagliardi, S., Marra, E. & Calissano, P. Neuronal apoptosis in rats is accompanied by rapid impairment of cellular respiration and is prevented by scavengers of reactive oxygen species. *Neurosci. Lett.* 245, 127-130 (1998).
- Armstrong, R., Aja, T., Hoang, K., Gaur, S., Bai, X., Alnemri, E., Litwack, G., Karanewsky, D., Fritz, L. & Tomaselli, K. Activation of the CED3/ICE-related protease CPP32 in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis but not necrosis. *J. Neurosci.* 17 (2), 553-562 (1997).
- Balázs, R., Jorgensen, O. & Hack, N. N-methyl-D-aspartate promotes the survival of cerebellar granule cells in culture. *Neurosci.* 27 (2), 437-451 (1988a).
- Balázs, R. Gallo, v. & Kingsbury, A. Effect of depolarization on the maturation of cerebellar granule cells in culture. *Dev. Brain Res.* 40, 269-279 (1998b).
- Balázs, R., Hack, N., Resink, A., Aronica, E. & van der Valk, J.B.F. Trophic effect of excitatory amino acids on differentiating granule cells: involvement of calcium and other second messengers. *Molecular Neuropharmacology* 2, 203-206 (1992a).
- Balázs, R., Resink, A., Hack, N., Van der Valk, J., Kumar, K. & Michaelis, E. NMDA treatment and K⁺ induced depolarization selectively promote the expression of an NMDA-preferring class of the ionotropic glutamate receptors in cerebellar granule neurones. *Neuroscience Letters* 137, 109-113 (1992b).
- Balázs, R. & Hack, N. Trophic effects of excitatory amino acids in the developing nervous system. En Ben-Ari, Y (ed.). *Excitatory amino acids and neuronal plasticity.* Plenum Press. New York. p. 221-228 (1990).
- Bessho, Y., Nawa, H. & Nakanishi . Selective up-regulation of an NMDA receptor subunit mRNA in cultured cerebellar granule cells by K⁺-induced depolarization and NMDA treatment. *Neuron* 12, 87-95 (1994).
- Bradford, M.M. Sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254 (1976).

- Burgoyne, R., Graham, M & Cambray-Deakin, M. Neurotrophic effects of NMDA receptor activation on developing cerebellar granule cells. *J. Neurocytology* 22, 689-695 (1993).
- Cai, J., Yang, J. & Jones, D. Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. *Biochimica et Biophysica Acta* 1366, 139-149 (1998).
- Castrén, E., Ohga, Y., Berzaghi, M., Tzimagiorgis, G., Thoenen, H. & Lindholm, D. Bcl-2 messenger RNA is localized in neurons of the developing and adult rat brain. *Neuroscience* 61, 165-177 (1994).
- Chang, J. & Wang, J-Z. Morphological and biochemical changes during programmed cell death of rat cerebellar granule cells. *Neurochem. Res.* 22 (1), 43-48 (1997).
- Chao, D. & Korsmeyer, S. Bcl-2 family: regulator of cell death. *Annu. Rev. Immunol.* 16, 395-419 (1998).
- Chauhan D., Pandey P., Ogata A, Teoh G., Krett N., Halgren R., Rosen S., Kufe D. Kharbanda S. and Anderson K. (1997). Cytochrome c-dependent and independent induction of apoptosis in multiple myeloma cells. *J Biol Chem* 272(48): 2995-2997
- Chaudhary, D., O'Rourke, K., Chinnaiyan, A.M. & Dixit, V.M. The death inhibitory molecules CED-9 and CED-4L use a common mechanism to inhibit the CED-3 death protease. *J. Biol. Chem* 273 (28), 17708-17712 (1998).
- Cheng, E., Kirsh, D., Clem, R., Ravi, R., Kastan, M., Bedi, A., Veno, K. & Hardwick, J. Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science* 278 (5345), 1966-1968 (1997).
- Chinnaiyan, A., O' Rourke, K. Interaction of CED-4 and CED-9: a molecular framework for cell death. *Science* 275, 1122-1126 (1997).
- Clair, E., Anderson, S. & Oltvai, Z. Bcl-2 counters apoptosis by Bax heterodimerization – dependent and independent mechanisms in the T-cell lineage. *J. Biol. Chem.* 272 (46), 29347-29355 (1997).
- Clem, R., Cheng, E., Karp, C., Kirsch, D., Veno, K., Takahashi, A., Kastan, M., Griffin, D., Eamshaw, W., Velivona, M. & Hardwick, J. Modulation of cell death by bcl-xL through caspase interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (2), 554-559 (1998).
- Collingridge, G. & Watkins, J. The NMDA receptor. Oxford University Press. Great Britain. 1994.
- Copani, A., Bruno, V., Dell'Albani, P., Battaglia, G., Barresi, V., Caruso, A., Nicoletti, F. & Condorelli, D.F. Growth conditions differentially affect the constitutive expression of primary response genes in cultured cerebellar granule cells. *Neurochem. Res.* 20 (5), 611-616 (1995).
- De Luca, A., Weller, M., Frei, K. & Fontana, A. Maturation-dependent modulation of apoptosis in cultured cerebellar granule neurons by cytokines and neurotrophins. *Eur. J. Neurosci.* 8, 1994-2005 (1996).

- Dekwerth, T., Elliott, J. Knudson, M., Johnson, E., Snider, W. & Korsmeyer, S. Bax is required for neuronal death after trophic factor deprivation and during development. *Neuron* 17, 401-411 (1996).
- Dessi, F., Charriaud-Marlangue, C., Khrestchatsky, M. & Ben-Ari, Y. Glutamate-induced neuronal death is not a programmed cell death in cerebellar culture. *J. Neurochem.* 60, 1953-1955 (1993).
- D'Mello, S., Galli, C., Ciotti, T. & Calissano, P. Induction of apoptosis in cerebellar granule neurons by low potassium: inhibition of death by insulin-like growth factor I and cAMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 10989-10993 (1993).
- Ellerby, H., Martin, S., Ellerby, L., Naiem, S., Rabizadeh, S., Salvesen, G., Casiano, C., Cashman, N., Green, D. & Bredesen, D. Establishment of a cell-free system of neuronal apoptosis: comparison of premitochondrial, mitochondrial, and postmitochondrial phases. *J. Neurosci* 17 (16), 6165-6178 (1997).
- Enari, M. Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A. & Nagata, S. A caspase-activated Dnase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391 (6662), 43-50 (1998).
- Galli, C., Meucci, O., Scorziello, A., Werge, T., Calissano, P. & Schettini, G. Apoptosis in cerebellar granule cells is blocked by high KCl, forskolin, and IGF-1 through distinct mechanisms of action: the involvement of intracellular calcium and RNA synthesis. *J. Neurosci* 15 (2), 1172-1179 (1995).
- Gallo, V., Kingsbury, A., Baláz, R. & Jorgensen, O. The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J. Neurosci.* 7 (7), 2203-2213 (1987).
- Garcia, I., Martinou, I., tsujimoto, Y. & Martinou, J-C. Prevention of programmed cell death of sympathetic neurons by the bcl-2 proto-oncogene. *Science* 263, 826-828 (1992).
- Gleichmann, M., Beinroth, S., Reed, J., Krajewski, S., Schulz, J., Wüllner, U., Klockgether, T. & Weller, M. Potassium deprivation-induced apoptosis of cerebellar granule neurons: cytochrome c release in the absence of altered expression of Bcl-2 family proteins. *Cell. Physiol. Biochem.* 8, 194-201 (1998).
- Glickstein, M., Yeo, C. & Stein, J. *Cerebellum and neuronal plasticity*. Plenum Press & NATO ASI Series. USA. 1987.
- Green D. & Reed, J. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312 (1998).
- Gross, A., Jockel, J., Wei, M. & Korsmeyer, J. Enforced dimerization of BAX results in its translocation mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J.* 17 (14), 3878-3885 (1998).
- Hansen, G., Meier, E., Abraham, J. & Schousboe, A. Trophic effects of GABA on cerebellar granule cells in culture. In *Neurotrophic activity of GABA during development*, (ed.) Redburns, D. & Schousboe, A. Alan R. Liss, Inc. New York. pp 109-138 (1987).
- Hengartner, M. CED-4 is a stranger no more. *Nature* 388, 714-715 (1997).

Hengartner, M. Death cycle and swiss army knives. *Nature* 391, 441-442 (1998).

Hengartner, M. CED-4 is a stranger no more. *Nature* 388, 714-715 (1997).

Hockenbery, D. Bcl-2, a novel regulator of cell death. *BioEssays* 17 (7), 631-638 (1995).

Hockenbery, D., Zutter, M., Hickey, W., Nahm, M. & Korsmeyer, S. Bcl-2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 6961-1965 (1991).

Hockenbery, D., Oltvai, Z., Yin, X.M., Millman, C. & Korsmeyer, S. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75, 241-251 (1993).

Ito, M. *The cerebellum and neural control*. Raven Press. USA. 1984.

Ito, T. Deng, X., Carr, B. & May, S. Bcl-2 phosphorylation required for anti-apoptosis function. *J. Biol. Chem.* 272 (18), 11671-11673 (1997).

Jacobson, M., Burne, J., King, M., Miyashita, T., Reed, J. & Raff, M. Bcl-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. *Nature* 361, 365-369 (1993).

Jacobson, M., Burne, J. & Raff, M. Programmed cell death and Bcl-2 protection in the absence of a nucleus. *The EMBO Journal* 13 (8), 1899-1910 (1994).

Jacobson, M. & Raff, M. Programmed cell death and Bcl-2 protection in very low oxygen. *Nature* 374, 814-816 (1995).

Jürgensmeier, J., Xie, Z., Deveraux, Q., Ellerby, L., Bredesen, D. & Reed, J. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 4997-5002 (1998).

Kandel, E., Schwartz, J. & Jessell, T. *Principles of neuroal science*. 3rd. Ed. Elsevier Science Publishing Co., Inc. USA. 1991.

Kane, D., Sarafion, T., Anton, R., Hahn, H., Gralla, E.B., Valentine, J.S., Örd, T. & Bredesen, D. Bcl-2 inhibition of neuronal death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science* 262, 1274-1277 (1993).

Karbanda, S., Pramod P., Schofield, L., Israels, S., Roncinske, R., Yoshida, K., Bharti, A., Yuan, Z., Saxena, S., Weichselbaum, R., Nalin, C. & Kufe, D. Role for Bcl-xL as an inhibitor of cytosolic cytochrome C accumulation in DNA damage-induced apoptosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 94, 6939-6942 (1997).

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

Kluck, R., Bossy-Wetzel, E., Green, D. & Newmeyer, D. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation f apoptosis. *Science* 275, 1132-1135 (1997a).

- Kluck, R., Martin, S., Hoffman, B., Zhou, Green, D. & Newmeyer, D. Cytochrome c activation of CPP32-like proteolysis plays a critical role in a *Xenopus* cell-free apoptosis system. *EMBO J.* 16 (15), 4639-4649 (1997b).
- Knudson, M. & Korsmeyer, S. Bcl-2 and Bax function independently to regulate cell death. *Nature Genetics* 16 (4), 358-363 (1997).
- Konstantinos, V., McCarthy, M.J., Watson, A., Whitfield, J., Rubin, L. & Ham, J. Bax promotes neuronal cell death and is downregulated during the development of the nervous system. *Development* 12, 1239-1249 (1997).
- Kroemer, G., Zamzami, N. & Susin, S. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunology Today* 18, 45-51 (1997).
- Lahm, M., Dubyak, G., Chen, L., Nuñez, G., Miesfeld, R. & Disterhorst, C. Evidence that Bcl-2 represses apoptosis by regulating endoplasmic reticulum associated Ca^{2+} fluxes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 6569-6573 (1994).
- Lasher, R. & Zagon, I. The effect of potassium on neuronal differentiation in cultures of dissociated newborn rat cerebellum. *Brain Res.* 41, 482-488 (1972).
- Leslie, F. Neurotransmitters as neurotrophic factors in Loughlin, S. & Fallon, J. (ed.). *Neurotrophic factors*. Academic Press, Inc. USA. p. 565-598 (1993).
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S., Ahmad, M., Alnemri, E. & Wang, X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase 9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-489 (1997).
- Liu, X., Kim, C., Yang, J., Jemmerson, R. & Wang, X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86, 147-157 (1996).
- Liu, X., Zou, H., Slaughter, C. & Wang, X. DFF, a heteromeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89 (2), 175-184 (1997).
- Martin, S. & Green, D. Protease activation during apoptosis: death by thousand cuts? *Cell* 82, 349-352 (1995).
- Meier, E., Hertz, L. & Shousboe, A. Neurotransmitters as developmental signals. *Neurochem. Int.* 19 (1/2), 1-15 (1991).
- Merry, D., Veis, D., Hickey, W. & Korsmeyer, S. Bcl-2 protein expression is widespread in the developing nervous system and retained in the adult PNS. *Development* 120, 301-311 (1994).
- Merry, D. & Korsmeyer, S. Bcl-2 gene family in the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 20, 245-267 (1997).

- Michaelidis, T.M., Sendtner, M., Cooper, J.D., Airaksinen, M.S., Holtmann, B, et al. Inactivation of bcl-2 results in progressive degeneration of motoneurons, sympathetic and sensory neurons during early postnatal development. *Neuron* 17, 75-89 (1996).
- Miller, T. & Johnson, E. Metabolic and genetic analyses of apoptosis in potassium/serum deprived rat cerebellar granule cells. *J Neurosci.* 16(23), 7487-7495 (1996).
- Miller, T., Moulder, K., Knudson, M., Creedon, D., Deshmukh, M., Korsmeyer, S. & Johnson, E. Bax deletion further orders the cell death pathway in cerebellar granule cells and suggests a caspase-independent pathway to cell death. *J. Cell Biol.* 139, 205-217 (1997).
- Minn, A., Vélez, P., Schendel S., Liang, H., Muchmore, S., Fesik, S., Fill, M. & Thompson, C. Bcl-x_L forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature* 385, 353-357 (1997).
- Morán, J. & Patel, A.J. Effect of potassium depolarization on phosphate-activated glutaminase activity in primary cultures of cerebellar granule neurons and astroglial cells during development. *Dev. Brain Res.* 46, 97-105 (1989 a).
- Morán, J. & Patel, A.J. Stimulation of the N-methyl-D-aspartate receptor promotes the biochemical differentiation of cerebellar granule neurons and not astrocytes. *Brain Res.* 486, 15-25 (1989 b).
- Morán, J. & Rivera-Gaxiola, M. Effect of potassium and NMDA on the aspartate aminotransferase activity in cultured cerebellar granule cells. *J. Neurosci. Res.* 33, 239-247 (1992).
- Mossman, T. 1983. Rapid colorimetric assay of cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 65: 55-63.
- Murphy, A., Bredesen, D., Cortopassi, G., Wang, E. & Fiskum, G. Bcl-2 potentiates the maximal calcium uptake capacity of neural cell mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 9893-9898 (1996).
- Nardi, N., Avidan, G., Daily, D., Zilkha-Falb, R. & Barzilai, A. Biochemical and temporal analysis of events associated with apoptosis induced by lowering the extracellular potassium concentration in mouse cerebellar granule neurons. *J. Neurochem.* 68 (2), 750-759 (1997).
- Nicholls, J., Martin, R. & Wallace B. From neuron to brain: a cellular and molecular approach to the function of the nervous system. 3th. Ed. Sinauer Associates, Inc. USA. p. 807. 1992.
- Oltavi, Z., Milliman, C. & Korsmeyer, J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with conserved homolog Bax that accelerates programmed cell death. *Cell* 74, 609-619 (1993)
- Oppenheim, R.W. Cell death during development of the nervous system. *Annu. Res. Neurosci.* 14, 453-501 (1991).
- Perrier, M. & Benavides, J. Pharmacological heterogeneity of NMDA receptors in cerebellar granule cells in immature rat slices. A microfluorimetric study with the [Ca²⁺]_i sensitive dye indo-1. *Neuropharmacology* 34 (1), 35-42 (1995).

- Purves, D. & Lichtman, J. Principles of neural development. Sinauer Associates, Inc. USA. p. 433. 1985.
- Raff, M., Barres, B., Burne, J., Coles, H., Ishizaki, Y. & Jacobson, M. Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science* 262, 695-700 (1993).
- Reed, J. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J. Cell. Biol.* 124, 1-6 (1994).
- Reed, J. . Cytochrome c: can't live with it – can't live without it. *Cell* 91, 559-562 (1997a).
- Reed, J. Double identity for protein of the Bcl-2 family. *Nature* 387, 773-776 (1997b).
- Ross, E. Cell division and the nervous system: regulating the cycle from neural differentiation to death. *Trends in Neuroscience* 19 (2), 62-67 (1996).
- Rossé, T., Olivier, R., Monney, L., Rager, M., Conus, S., Fellay, I., Jansen, B. & Borner, C. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature* 391, 496-499 (1998).
- Sakahira, H., Enari, M. & Nagata, S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391 (6662), 96-99 (1998).
- Scarlett, J.L. & Murphy M.P. Release of apoptogenic proteins from the mitochondrial intermembrane space during the mitochondrial permeability transition. *FEBS-Lett.* 418 (3), 282-286 (1997).
- Schendel, S., Xie, Z., Montal, M., Matsuyama, S., Montal, M. & Reed, J. Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (10), 5113-5118 (1997).
- Schramm, M., Eimerl, S. & Costa, E. Serum and depolarizing agents cause acute neurotoxicity in cultured granule cerebellar granule cells: role of the glutamate receptor responsive to N-methyl-D-aspartate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1193-1197 (1990).
- Schulz, J., Weller, M. & Klockgether, T. 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. *Neurosci.* 16 (15), 4696-4706 (1996).
- Sedlak, T., Oltvai, Z., Yang, E., Wang, K. & Boise, L. Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 7834-7838 (1995).
- Shimizu, S., Eguchi, Y., Kusaka, H., Kamilke, W., Matsuda, H & Tsujimoto, Y. Prevention of hypoxia-induced cell death by Bcl-2 and Bcl-xL. *Nature* 374, 811-813 (1995).
- Shimizu, S., Eguchi, Y., Kamilke, W., Funahashi, Y., Mignon, A., Lacronique, V., Matsuda, H. & Tsujimoto, Y. Bcl-2 prevents apoptotic mitochondrial dysfunction by regulating proton flux. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 1455-1459 (1998).

Simpson, P., Challiss, R.A. & Nahorski, S. Involvement of intracellular stores in the responses to N-methyl-D-aspartate and depolarization in cerebellar granule cells. *Neurochem.* 61 (2), 760-763 (1993).

Simpson, P., Challiss, R.A. & Nahorski, S. Agonist-evoked Ca^{2+} mobilization from stores expressing inositol 1,4,5-triphosphate receptors and ryanodine receptors in cerebellar granule neurons. *J. Neurochem.* 67 (1), 364-373 (1996).

Sohoma, O., Mizuguchi, M., Takashima, S., Yamada, M., Ikeda, K. & Ohta, S. High expression of Bcl-x protein in the developing human cerebellar cortex. *J. Neurosci. Res.* 43, 175-182 (1996).

Spector, M., Desnoyers, S., Hoepfner, D & Hengartner, M. Interaction between the *C. elegans* cell death regulators CED-9 and CED-4. *Nature* 385, 653-656 (1997).

Spector, T. Refinement of the Coomassie Blue method of protein quantitation. *Anal. Biochem.* 88: 142-146 (1978).

Tang D. G., Li L., Zhu Z. and Joshi B. (1998). Apoptosis in the absence of cytochrome c accumulation in the cytosol. *Biochem and Biophys Res Comm* 242(2): 380-384

Thornberry, N. & Lazebnik, Y. Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312-1316 (1998).

Tomei, L.D. & Cope, F. Apoptosis: the molecular basis of cell death. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA. 1991.

Tsukada, Y. & Shooter, E (ed.). Neurotrophic factors. Japan Scientific Societies Press & CRC Press. Japan. 1992.

Van der Valk, J., Resink, A. & Balázs, R. Membrane depolarization and the expression of glutamate receptors in cerebellar granule cells. *European Journal of Pharmacology* 201, 247-250 (1991).

Vekrellis, K., McCarthy, M., Watson, A., Whutfield, J., Rubin, L. & Ham., J. Bax promotes neuronal cell death and is downregulated during the development of the nervous system. *Development* 124, 1239-1249 (1997).

Wheal, H. & Thomson, E. Excitatory amino acids and synaptic transmission. Academic Press. USA. p. 482. 1991.

White, E. Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes and Development* 10, 1-15 (1996).

White, F. Keller-Peck, C., Knudson, M., Korsmeyer, S. & Snider, W. Widespread elimination of naturally occurring neuronal death in Bax-deficient mice. *J. Neurosci.* 18 (4), 1428-1439 (1998).

Wolter, K., Hsu, Y-T., Smith, C., Nechushtan, A., Xi, X-G. & Joule, R. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J. Cell Biol.* 139 (5), 1281-1292 (1997).

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

Wood, K., Dispasquale, B & Youle, R. In situ labeling of granule cells for apoptosis associated DNA fragmentation reveals different mechanisms of cell loss in developing cerebellum. *Neuron* 11, 621-632 (1993).

Wu, D., Wallen, H & Nuñez, G. Interaction and regulation of subcellular localization of CED-4 and CED-9. *Science* 275, 1126-1129 (1997).

Xuesong, L., Kim, C., Yang, J., Jemmerson, R. & Wnag, X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86, 147-157 (1996).

Yan, G.M., Ni, B., Weller, M., Wood, K. & Paul, S. Depolarization or glutamate receptor activation blocks apoptotic cell death of cultured cerebellar granule neurons. *Brain Research* 656, 43-51 (1994).

Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C., Ibrado, A.M., Cai, J., Peng, T.I., Jones, D. & Wang, X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275, 1129-1132 (1997).

Yang, X., Chang, H. & Baltimore, D. Essential role of CED-4 oligomerization in CED-3 activation and apoptosis. *Science* 281, 1355-1357 (1998).

Yin, X. M., Oltavi, Z. & Korsmeyer, S. BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature* 369, 321-323 (1994).

Zha, H., Aimé-Sempé, C., Sato, T. & Reed J. Proapoptotic protein Bax heterodimerizes with Bcl-2 and homodimerizes with Bax via a novel domain (BH3) distinct from BH1 and BH2. *J. Biol. Chem.* 271, 7440-7444 (1996).

Zhivotovsky, B., Orrenius, S., Brustugum, O. & Doskeland, S. Injected cytochrome c induces apoptosis. *Nature* 391, 449-450 (1998).

Zhong, L-T., Sarafin, T., Kane, D., Charles, A., Mah, S., Edwards, R. & Bredesen, D. Bcl-2 inhibits death of central neural cells induced by multiple agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 4533-4537 (1993).

Zou, H., Henzel, W., Liu, X., Lutschg, A. & Wnag, X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90, 405-413 (1997).