

00581

①



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO DE MUERTE NEURONAL PROGRAMADA Y SU INHIBICIÓN POR NMDA Y POTASIO EN CÉLULAS GRANULARES DEL CEREBELO EN CULTIVO DURANTE EL DESARROLLO.

Tesis

Que para obtener el grado de

Dr. en Ciencias Químicas (Bioquímica)

Presenta el

Q. Silvestre de Jesús Alavez Espidio



2999057



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.



PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PMDCB/704/2001


ING. LEOPOLDO SILVA GUTIÉRREZ
Director General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Por medio del presente me permito informar a usted que en la reunión del Subcomité Académico del día 14 de enero de 2000, se aprobó el siguiente Jurado de Examen para optar por el grado de Doctor en Ciencias Químicas (Bioquímica) del **Q. SILVESTRE DE JESUS ALAVEZ ESPIDIO** con número de cuenta 8652872-6 con la tesis titulada "Caracterización del proceso de muerte neuronal programada y su inhibición por NMDA y potasio en células granulares del cerebelo en cultivo durante el desarrollo", dirigida por el Dr. Julio Morán Andrade.

PRESIDENTE	Dra. Herminia Pasantes Morales
VOCAL	Dr. Jorge Vázquez Ramos
VOCAL	Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra
VOCAL	Dr. Luis Felipe Jiménez García
SECRETARIO	Dr. Luis Covarrubias Robles
SUPLENTE	Dra. Clorinda Arias Alvarez
SUPLENTE	Dra. Lourdes Massieu Trigo

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 30 de octubre del 2001.
LA COORDINADORA DEL PROGRAMA


DRA. AMELIA FARRÉS GONZÁLEZ-SARAVIA

C.c.p. Archivo



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

Quiero agradecer a los miembros del jurado por sus sugerencias y comentarios, todos ellos valiosos y enriquecedores

De manera especial agradezco a la Dra. Marina Gavilanes y al Dr. Alejandro Zentella por sus consejos e interés en mi trabajo durante su participación como parte de mi comité tutorial

Gracias Julio por tus consejos, tu amistad y por todas las cosas que he aprendido de ti

A los compañeros de laboratorio; Andy, Toño, Guadalupe, Claudia, Alette, Daniela, Tony, Sugela, Ari, Armando y Miriam por soportarme durante todo este tiempo... y lo que les falta

A Adriana, Raquel, Silvestre, Raquel y Guadalupe

ÍNDICE

ABSTRACT	1
RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	3
<i>El cerebelo durante el desarrollo</i>	4
<i>Histogénesis del cerebelo</i>	8
Las células de Purkinje	9
Las neuronas en estrella	10
Las neuronas en canasta	10
Las neuronas de Golgi	10
Las neuronas granulares	10
<i>Muerte celular programada durante el desarrollo</i>	14
Conceptos básicos	14
Genes involucrados en la regulación de la muerte apoptótica	16
Participación de proteínas de la familia Bcl-2 en la muerte apoptótica	20
La liberación del citocromo c de la mitocondria como parte del proceso Apoptótico	24
<i>Proteínas de estrés</i>	30
<i>Factores tróficos durante el desarrollo</i>	32
Aminoácidos como factores tróficos	33
Receptor tipo NMDA	34
ANTECEDENTES	37
HIPÓTESIS	40
OBJETIVO GENERAL	41
OBJETIVOS PARTICULARES	41
RESULTADOS	42
<i>Caracterización morfológica y bioquímica del proceso de muerte celular observada por privación de estimulación despolarizante en células granulares de cerebelo</i>	42
Morfología	42
Sobrevivencia	44
Efecto de la estimulación con NMDA y K25 en la supervivencia de las	

CGC	44
Características apoptóticas de la muerte observada en CGC por privación de estimulación despolarizante	45
Condensación del material nuclear	45
Alteraciones en la membrana plasmática	47
Efecto de inhibidores de síntesis de proteínas en la sobrevivencia de las CGC en cultivo	49
Efecto del tiempo de la estimulación del receptor a glutamato tipo NMDA en la sobrevivencia de las CGC en cultivo	50
Participación del calcio extracelular en la sobrevivencia de las CGC en cultivo	51
Resultados adicionales	54
<i>Papel de las proteínas de estrés en la sobrevivencia inducida por NMDA y K25 en cultivos de CGC</i>	55
<i>Papel de Bcl-2, Bax y citocromo-c en la sobrevivencia de las células granulares de cerebelo en cultivo</i>	56
DISCUSIÓN GENERAL	57
CONCLUSIONES	67
BIBLIOGRAFÍA	69

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Act-D	Actinomicina D
ADN	Ácido desoxiribonucleico
AK	Ácido kaínico
AMPA	Ácido propiónico alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol
Apaf-1	Factor activador de la apoptosis 1
BDNF	Factor Neurotrófico Derivado de Cerebro, por sus siglas en inglés
C. elegans	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CAD	Inhibidor de la desoxiribonucleasa activada por caspasa
Ced	Ceanorhabditis elegans death, por sus siglas en inglés
CGC	Células granulares del cerebelo
CHX	Cicloheximida
cit-c	Citocromo-c
DFF	Factor de fragmentación del ADN, por sus siglas en inglés
DIV	Días <i>in vitro</i>
ETOH	Etanol
FT	Factores tróficos
GABA	Ácido gama-aminobutírico
HSP	Proteínas de choque térmico, por sus siglas en inglés
ICAD	Inhibidor de DNAsa activada por caspasa, por sus siglas en inglés inglés
K25	KCl, 25 mM
K5	KCl, 5 mM
NGF	Factor de Crecimiento Neuronal, por sus siglas en inglés
NMDA	(N-metil-D-aspartato)
NT-3	Neurotrofina 3
P	Día postnatal
PARP	Poli (ADP-ribosa) polimerasa
PT	Poros de transición
SN	Sistema nervioso
SREBPs	Proteínas de unión al elemento regulador a esteroides, por sus siglas en inglés

ABSTRACT

Cerebellar granule cells (CGC) obtained from rats in early development (8-day-old; P8) undergo apoptosis after one week in culture at physiological concentrations of KCl (5mM; K5). When these cells are grown in a medium with either high KCl (25 mM, K25) or N-methyl-D-aspartate (NMDA, 150 μ M), cell survival markedly increases. It is suggested that this stimulation could mimic the trophic support received by these cells from mossy fibers during development. Also, when CGC cultured for 6-8 days in a K25 medium are changed to a K5 medium, cells die in an apoptotic way after 24 h. On the other hand, some proteins have been related to the regulation of programmed cell death in some cellular types including neurons. Among them, the Bcl2 and Heat Shock Proteins (HSP) families seem to be critical in the apoptosis control of neural cells. Thus, Bcl-2 and Bcl-xL overexpression is able to protect neurons from apoptosis induced by several insults and during development. Other members of the same family, Bax and Bcl-xS, are classified as proapoptotic proteins. Recently, it has been proposed that a key step in the activation of apoptotic cell death is the release of cytochrome c (Cyt-c) from the mitochondrial membrane to cytosol. Once in the cytosol, Cyt-c forms a complex with other proteins to activate a protease cascade. On the other hand, some members of HSP family (e. g. HSP-70) have been related to neuroprotection against certain stimuli known to induce an apoptotic process. In this work, we explored the participation of Bcl-2, Bax, Cyt-c and HSP-70 in apoptosis observed in CGC under non-depolarizing conditions and during neuroprotection by NMDA and KCl. Here, we found that cells in K5 showed an increase in HSP-70 levels after 3 DIV. Similarly, in cells changed from K25 to K5, HSP-70 levels were increased after 6 h. However, neither NMDA nor K25 treatment affected HSP-70 levels at 2-7 DIV. HSP-25 was not modified. Ethanol or thermal stress induced HSP-70, but these conditions did not affect cell death induced by K5 medium. These results suggest that HSP, particularly HSP-70, are not involved in the mechanisms by which NMDA and KCl promote cell survival, but they could be a general mechanism of defense against apoptotic stimuli in CGC. On the other hand, we found that the levels of Bcl-2 in K5 cells did not show any changes during 2-7 DIV, but cells treated with NMDA/K25 displayed a marked increase in this protein at around 4 DIV, as compared to control cells (around 45 % over control). Bax levels were not modified by K5 and only a little decrease was found with the age in culture from 6 DIV. NMDA/K25 did not modified this tendency. In cells deprived of KCl, the levels of Bax showed an unexpected and consistent decrease (as far as 30 % at 8 h after switching) and the Bcl-2 levels did not show any significant changes 24 h after switching. Neither Bcl-2 nor Bax undergo any appreciable relocalization from the mitochondria to cytosol in both models. Cytochrome c levels were unaffected under K5, NMDA and K25. A little increase in the cytosolic levels of Cyt-c was detected 6 h after switching. We also found that caspase-9 was only activated by switching to K5 but caspase-3 was involved in none of the experimental protocols. These results suggest that Bcl-2 and Bax could not be involved in CGC death induced by K5 and that the apoptotic machinery could regulate the process in a manner depending on the degree of maturation.

RESUMEN

Los cultivos de Células Granulares de Cerebelo (CGC) obtenidos de ratas de 8 días de edad (P8) experimentan un proceso apoptótico después de una semana bajo concentraciones fisiológicas de KCl (5mM; K5). Si estas células se cultivan en medios con altas concentraciones de potasio KCl (25 mM, K25) o de un agonista glutamatérgico como el N-methyl-D-aspartato (NMDA, 150 μ M) la sobrevivencia de los cultivos se incrementa considerablemente. Esta estimulación podría mimetizar una influencia trófica proveniente de las fibras musgosas recibida por las CGC, en un periodo crítico del desarrollo. Además, CGC cultivadas durante 6-8 días en un medio con K25 mueren de manera apoptótica después de 24 h cuando el medio se reemplaza por otro con K5. Por otra parte, la expresión de miembros de la familia del Bcl-2 y de las proteínas de choque térmico (HSP) parece ser importante para el control de la apoptosis en neuronas. Así, la sobreexpresión de Bcl-2 y Bcl-x_L es capaz de proteger neuronas de procesos apoptóticos durante el desarrollo y de diversas agresiones una vez maduras. Bax y Bcl-x_S están clasificadas como proteínas proapoptóticas y su sobreexpresión puede inducir apoptosis sin mediar ningún estímulo nocivo. Recientemente se ha propuesto que un evento clave en la activación de este fenómeno es la liberación del citocromo-c (cit-c) de la mitocondria al citosol. Una vez en el citosol, el cit-c podría formar un complejo con otras proteínas para activar una cascada de proteasas. Por otra parte, algunos miembros de la familia de HSP (HSP-70) han sido implicados en fenómenos de neuroprotección en algunos tipos celulares contra una serie de estímulos capaces de iniciar un proceso apoptótico. En este trabajo, exploramos la participación de Bcl-2, Bax, cit-c y HSP-70 en la muerte observada en cultivos de CGC bajo condiciones no despolarizantes y bajo el efecto neuroprotector del NMDA y K25. Nuestros resultados muestran que en CGC privadas de estimulación despolarizante, los niveles de HSP-70 incrementan notablemente. El tratamiento con NMDA y K25 no afecta los niveles de HSP-70 de 2-7 días *in vitro* (DIV). Los niveles de HSP-25 no se modifican bajo ninguna condición experimental. Los niveles de HSP-70 se incrementan tanto con la adición de ETOH como con un choque térmico, pero la sobrevivencia de las CGC no se ve modificada. Estos resultados sugieren que HSP-70 no está directamente relacionado con el mecanismo por medio del cual el NMDA y el KCl promueven la sobrevivencia, pero podrían reflejar un mecanismo general de defensa. Por otra parte, encontramos que los niveles de Bcl-2 en células control no muestra cambios significativos de 2-7 DIV; sin embargo, cultivos tratados con NMDA/K25 muestran un marcado incremento en esta proteína alrededor del 4 DIV (45 % sobre el control). Los niveles de Bax solo mostraron una ligera tendencia a disminuir a partir del 6 DIV y el tratamiento con NMDA/K25 no modifica esta tendencia. En CGC privadas de KCl, los niveles de Bax muestran una inesperada y consistente disminución (hasta un 30 % 8 horas después del cambio de medio) y los niveles de Bcl-2 no muestran ningún cambio significativo. Ni Bcl-2 ni Bax sufren una relocalización apreciable de la mitocondria al citosol, en ambos modelos. También encontramos liberación del cit-c y actividad de caspasa-9 bajo privación de potasio. La caspasa-3 participa en ambos modelos de muerte apoptótica. Estos resultados sugieren que Bax no participa en el proceso de muerte inducido por condiciones despolarizantes y que la maquinaria apoptótica de las CGC regula este proceso en una manera que depende del estado de maduración del cultivo.

INTRODUCCIÓN

Las funciones del Sistema Nervioso (SN) están determinadas en gran medida por arreglos citoarquitectónicos. Estos arreglos delimitan la distribución y las interacciones entre los diferentes tipos celulares que lo componen. La organización de estas complejas redes de conexiones neurales adquiere una distribución característica durante etapas embrionarias y en algunos casos en etapas postnatales tempranas. Esto sucede como resultado del desarrollo de poblaciones neuronales y gliales a través de procesos sofisticados ocurridos durante la neurogénesis. Un aspecto crítico durante el desarrollo del SN es la participación de señales externas que funcionarán ya sea como un estímulo degenerativo o como un estímulo trófico. Así, estas señales dirigen la suerte de las células hacia un proceso de muerte y remoción o a la sobrevivencia y a su establecimiento como parte estructural y funcional dentro del SN de un organismo.

El cerebelo es una estructura que posee divisiones estructurales y funcionales bien definidas, relacionadas con otras regiones del SN, a través de un sistema relativamente simple de entrada y salida de señales. El cerebelo está particularmente involucrado en el control de funciones motrices, regulando tanto la coordinación, la velocidad y la precisión de las contracciones musculares de los miembros y de los ojos, como el equilibrio y postura del cuerpo. La distribución de la corteza cerebelar en tres capas discretas en la que se localizan sólo cinco tipos neuronales, aunado a la información que actualmente se tiene sobre los eventos que ocurren durante el desarrollo del cerebelo, hacen de éste un modelo accesible e interesante para el estudio de los procesos que ocurren durante el desarrollo del sistema nervioso central.

El cerebelo durante el desarrollo

El desarrollo del SN comienza a partir de una capa de células neuroectodérmicas 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. Esta estructura 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 darán origen a diferentes estructuras del cerebro adulto llamadas **prosencefalo**, **mesencefalo** y **rombencefalo**. El rombencefalo, a su vez, da origen al **metencefalo** y al **mielencefalo**.

El cerebelo se origina a partir de la placa alar de la porción metencefálica del tubo neural, como un engrosamiento bilateral que forma los labios rómbicos. Estos se fusionan posteriormente sobre la línea media dorsal, siguiendo un gradiente rostral-caudal, para formar el **vermis**. Poco después, los elementos laterales se desarrollan en los hemisferios cerebelares, por lo que en el plano longitudinal, el cerebelo adulto presenta en la región media al vermis y los hemisferios cerebelares localizados a ambos lados de éste. 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).

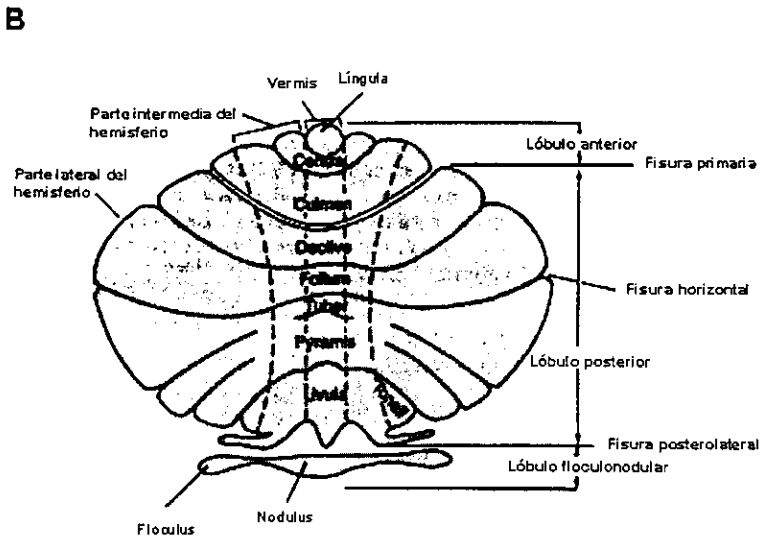
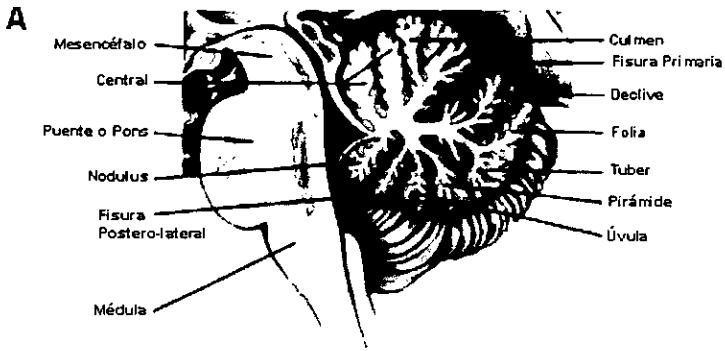


Figura 1. Estructura anatómica del cerebelo.

A) Sección sagital media que muestra la posición del cerebelo con relación al tallo cerebral y las estructuras foliadas del cerebelo (Tomado de DeLong, 2000).

B) La fisura primaria divide al cuerpo del cerebelo en lóbulos anterior y posterior. La fisura posterolateral separa el lóbulo flocculonodular. El cerebelo tiene tres regiones funcionales: el vermis central y las zonas lateral e intermedia en cada hemisferio (Tomado de DeLong, 2000).

La región más externa del cerebelo adulto está constituida por la corteza cerebelar y hacia el interior por la materia blanca y tres núcleos profundos, de los cuales salen las principales proyecciones aferentes del cerebelo, particularmente hacia la corteza cerebral y el tallo cerebral.

La **corteza cerebelar** está compuesta por cinco tipos neuronales: las células en canasta, las células en estrella, las células de Golgi, las células de Purkinje y las células granulares, las cuales se distribuyen en tres capas corticales discretas. En la capa más externa o **capa molecular** se encuentran las células en canasta y las células en estrella, los axones de las células granulares y los árboles dendríticos de las neuronas de Purkinje. La **capa de Purkinje** está compuesta por los somas de las células de Purkinje, que se distribuyen homogéneamente en una monocapa. En la **capa granular**, la más interna y densa, se localizan los somas de las neuronas granulares y de las células de Golgi (Figura 2 A).

El cerebelo recibe información a través de dos tipo de contactos aferentes de naturaleza excitadora. Las fibras trepadoras provienen del núcleo olivar y forman sinapsis, que utilizan al **ácido aspártico** o al **ácido glutámico** como neurotransmisor, con las fibras dendríticas de las células de Purkinje. Por otra parte, las fibras musgosas que se originan en algunos núcleos del tallo cerebral y de neuronas de la médula espinal (que forman 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). La mayor parte

de las fibras musgosas utiliza **acetilcolina (Ach)**, pero una pequeña población de éstas maneja glutamato como neurotransmisor.

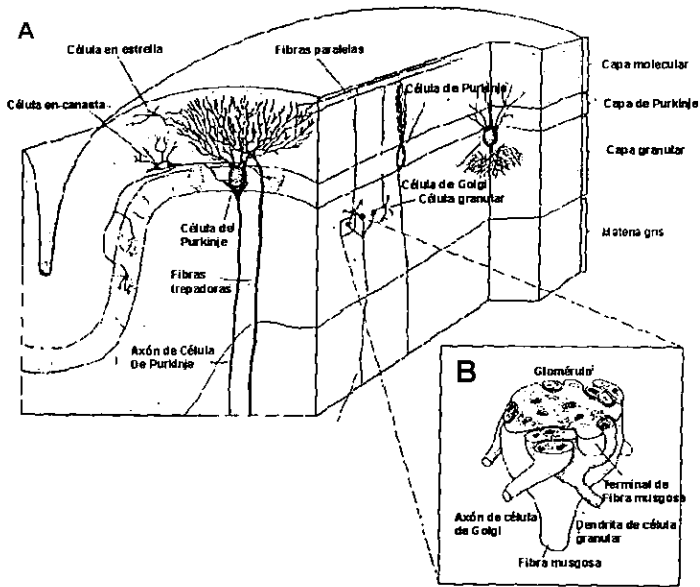


Figura 2. Arreglo citoarquitectónico de la corteza cerebelar

A) Sección vertical de una folia mostrando la distribución de los tipos celulares que conforman las 3 capas de la corteza cerebelar (Tomado de DeLong, 2000).

B) Glomérulo cerebelar de la capa granular, en el que una fibra musgosa hace contacto con los axones de las células granulares y de las células de Golgi (Tomado de DeLong, 2000).

Los axones de las células de Purkinje constituyen la única vía eferente de la corteza cerebelar. Estos proyectan hacia los núcleos profundos de la materia blanca donde establecen sinapsis de naturaleza inhibitora a través de la liberación del ácido **gama-aminobutírico (GABA)**. La información que recibe el cerebelo determina la actividad de las neuronas de Purkinje vía la conexión directa de las fibras trepadoras y de la acción indirecta de las fibras musgosas, a través del contacto de las células granulares, con estas neuronas. Esta actividad también es modulada a través de los

contactos con las células en canasta y las células en estrella que funcionan como interneuronas inhibitorias.

Histogénesis del cerebelo

Durante la morfogénesis del sistema nervioso se presenta 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 en los que ocurren estos eventos y los factores que los dirigen son distintos para cada tipo celular.

Las neuronas que forman la corteza del cerebelo se originan a partir de dos zonas de proliferación independientes. 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, E17). De esta capa, en etapas posteriores del desarrollo, migran hacia la parte interna del cerebelo las células que originan a las células de Golgi, mientras que las células que dan origen a las neuronas de Purkinje migran a estratos menos profundos para constituir la capa de células de Purkinje (Ito, 1984).

Las células granulares, las células en canasta y las células en estrella 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, 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 células en estrella, mientras

que las células precursoras de las neuronas granulares y las células de Golgi atraviesan la capa molecular y la capa de neuronas de Purkinje para formar la capa granular interna, en donde se lleva a cabo el proceso de diferenciación.

Las células de Purkinje

Estas células se originan, en el caso de la rata, entre E12 y E15 y posteriormente migran y se alinean en una capa de una célula de grosor alrededor del día postnatal 4 (P4). Las neuronas de Purkinje se diferencian entre P4 a P20 y extienden su árbol dendrítico en toda la capa molecular (Figura 3). Estas neuronas reciben contactos sinápticos de cuatro tipos neuronales que se establecen en diferentes regiones celulares (Figura 4). Dos de estas conexiones sinápticas son de tipo excitador. La primera de ellas la establecen las fibras trepadoras en el soma y a lo largo del árbol dendrítico de las células de Purkinje (de P5 a P7); la segunda la establecen las fibras paralelas de las células granulares sobre las espinas dendríticas (a partir de P15). Las otras dos son sinapsis inhibitoras que forman los axones de las células en estrella sobre las dendritas primarias y secundarias, y las células en canasta sobre el soma de las células de Purkinje. Como ya se comentó, los axones de las células de Purkinje son la única vía de salida de información del cerebelo y se dirigen principalmente a núcleos cerebelares centrales y núcleos vestibulares, donde establecen sinapsis de tipo inhibitor, que utilizan GABA como neurotransmisor. De esta manera, la célula de Purkinje debe integrar la información que entra a la corteza cerebelar, que a su vez 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 (Ito, 1984).

Las neuronas en estrella

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 taurina o GABA (Figura 4). La diferenciación de estas neuronas ocurre en la rata entre P8 y P11.

Las neuronas en canasta

En la rata, estas células se diferencian de las células germinales de la capa molecular externa entre P6 y P7. Posteriormente, se conectan con el soma de las células de Purkinje donde ejercen una función inhibitoria mediada por GABA (Figura 4).

Las neuronas de Golgi

La mayoría de estas células se generan después del nacimiento. En el cerebelo adulto, el soma de estas neuronas 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

Estas células son las más pequeñas (5 a 8 μ de diámetro) y numerosas en el SN (aproximadamente 10^{11}) y ocupan alrededor de 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 entre E13 y E16. En las ratas

recién nacidas esta zona proliferativa alcanza un grosor de 4 a 5 células y debajo de ella se forma, días más tarde, una capa de células no mitóticas premigratorias de 2 a 3 células de grosor que aumenta de tamaño entre P7 y P10. A partir de P11 se observa una reducción del tamaño de la zona proliferativa y más tarde de la zona premigratoria, ambas capas desaparecen entre P20 y P25 (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 de migración se efectúa en aproximadamente 3 días. El movimiento de estas células parece estar asociado a interacciones con los procesos de la glía de Bergman y 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, la mayor parte de las células granulares alcanza la capa granular interna. Durante la tercera semana, sus axones o procesos en la capa molecular se bifurcan en forma de "T", originando dos fibras delgadas y largas (en la rata, 0.2 μ y 1.6 mm respectivamente) conocidas como **fibras paralelas** (Figura 2A). 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 P5 inicia el arribo de las aferencias a la capa granular y alrededor de P12 empiezan a formar sinapsis con las neuronas granulares, constituyendo los glomérulos, los cuales incrementan su complejidad durante la tercera semana postnatal (Altman, 1972).

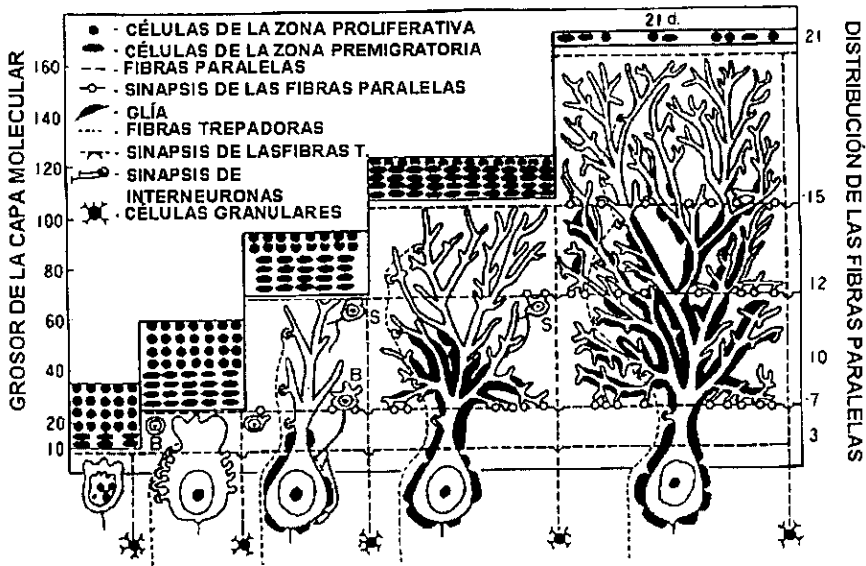


Figura 3. Histogénesis de la corteza cerebelar. Esquema que muestra los principales eventos que ocurren durante la maduración de los diferentes tipos neuronales que componen la corteza cerebelar en función a la edad postnatal. B, células en canasta; S, células en estrella (Tomado de Altman, 1972).

Durante la neurogénesis se ha descrito la muerte de un gran porcentaje de neuronas posterior a su sobreproducción. Este fenómeno se ha interpretado como una estrategia evolutiva determinante para establecer el número correcto de neuronas y las conexiones apropiadas que finalmente formaran parte del SNC de un organismo plenamente desarrollado (Oppenheim, 1991). Particularmente, se ha observado que durante el desarrollo del cerebelo del ratón, hay una pérdida considerable (20-30%) de neuronas granulares en etapas postnatales, asociada al establecimiento de la red neuronal en la corteza cerebelar (Wood et al, 1993).

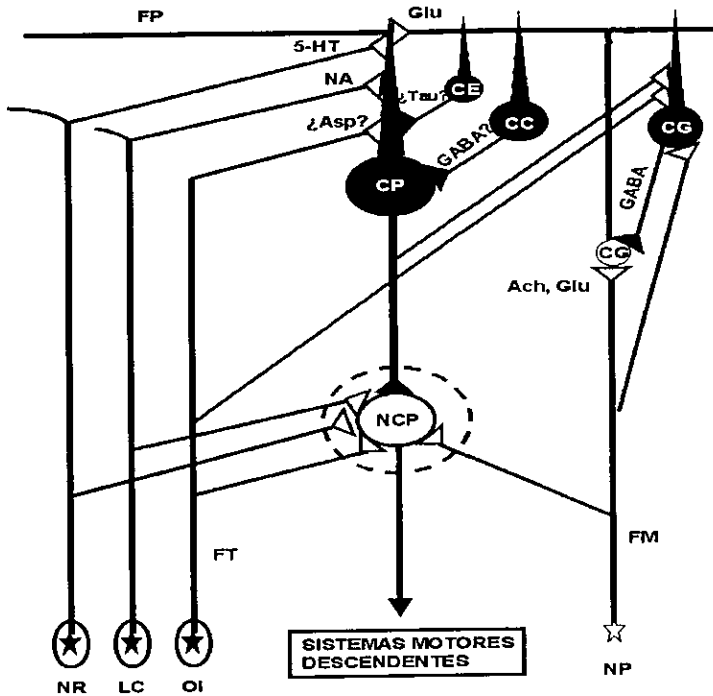


Figura 4. Contactos sinápticos y posibles neurotransmisores involucrados en la corteza cerebelar.

CP, células de Purkinje; CG, células de Golgi; CC, células en canasta; FP, fibras paralelas; FM, fibras musgosas; FT, fibras trepadoras; NCP, núcleos cerebelares profundos; NP, núcleos pontinos que dan origen a las fibra musgosa; OI, núcleo olivar inferior; LC, locus coeruleus; NR, núcleos del rafé; 5-HT, serotonina; NA, noradrenalina; Asp, aspártico; ACh, acetilcolina; Glu, glutamato (Modificado de Ito, 1984)

Recientemente, se ha demostrado que este fenómeno presenta características, tanto morfológicas como bioquímicas, muy diferentes a las observadas en la muerte necrótica. A este tipo de muerte se le conoce como muerte programada o apoptótica (Raff et al, 1993).

Muerte celular programada durante el desarrollo

Conceptos básicos

En términos generales, es posible distinguir dos tipos de muerte celular: la necrosis y la apoptosis (Figura 5). La *necrosis* se presenta, generalmente, en condiciones patológicas y en respuesta a daños severos tanto a nivel celular como tisular. Este tipo de muerte se caracteriza por la entrada masiva de calcio, incremento de volumen de organelos intracelulares y un hinchamiento general que culmina en la lisis de la célula, que al liberar su contenido daña a las células adyacentes, generando un proceso inflamatorio. Durante la necrosis se observan agregaciones de la cromatina y en ocasiones puede observarse fragmentación nuclear.

La *apoptosis* se ha caracterizado con 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 pueden ser fagocitados por las células adyacentes (principalmente macrófagos) y degradados en su interior, por lo que la muerte apoptótica de una célula no genera daño sobre las células adyacentes. Los cambios bioquímicos relacionados con la apoptosis son: la activación de una transglutaminasa específica, la activación de cisteín-proteasas tipo ICE/ced-3 y la fragmentación por endonucleasas del ácido desoxiribonucleico (ADN) nuclear en las regiones internucleosomales, para formar fragmentos de aproximadamente 185 pb. Este proceso de muerte ocurre en una gran variedad de organismos, tanto en el

desarrollo, como en el estado adulto; en condiciones fisiológicas y patológicas. El desarrollo normal de los organismos depende de que ciertas células mueran de manera programada, en muchos casos con características apoptóticas, en procesos que incluyen: la eliminación de órganos vestigiales y el ajuste del tamaño de poblaciones celulares después de un periodo inicial de producción excesiva, como en el caso del sistema nervioso (Kerr y Harmon, 1991).

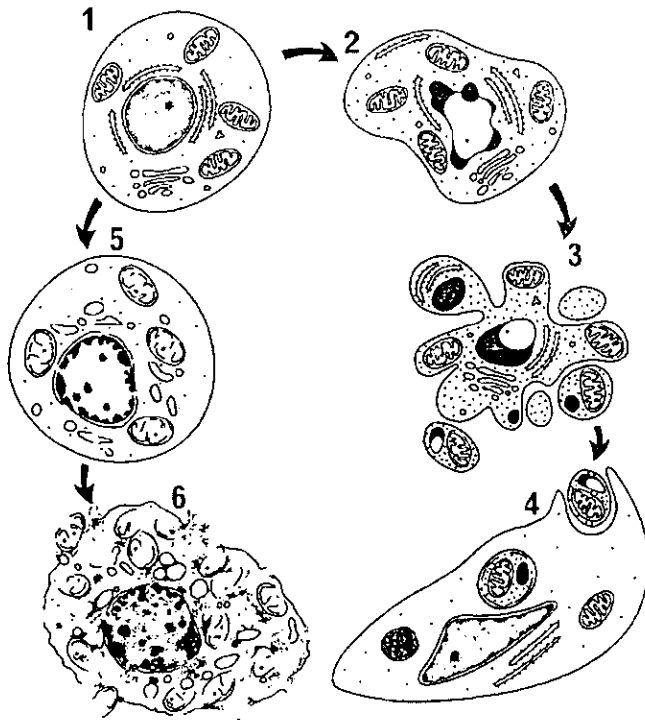


Figura 5. Cambios morfológicos asociados a la apoptosis (derecha) y necrosis (izquierda).

(1) Célula normal. (2) Condensación y regionalización de la cromatina, reducción del citoplasma y alteraciones en la membrana nuclear. (3) Formación de protuberancias en la superficie celular. Estas se separan para producir los cuerpos apoptóticos, que contienen organelos bien preservados y material nuclear fragmentado. (4) Los cuerpos apoptóticos son fagocitados y digeridos por células adyacentes. (5) Señales de necrosis temprana en una célula dañada irreversiblemente, aglutinación de la cromatina en unidades discretas, hinchamiento de organelos y aparición de densidades floculantes en la matriz de la mitocondria. (6) Las membranas se rompen y la célula se desintegra (Tomado de Kerr y Harmon, 1991).

La muerte apoptótica es un proceso activo determinado por un programa genético. Este programa puede ser activado como respuesta a ciertas señales externas 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 conducir a la etiología de varias enfermedades como el cáncer, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), enfermedades autoinmunes y enfermedades neurodegenerativas (Tomei, 1991).

Genes involucrados en la regulación de la muerte apoptótica

El proceso de muerte apoptótica es un evento conservado a través de la evolución animal. Se han identificado genes que codifican para algunos componentes de la maquinaria apoptótica y su regulación, en diferentes especies. Durante el estudio del desarrollo del nematodo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), se describieron 3 genes que afectan directamente el proceso de muerte: *ced-3*, *ced-4* y *ced-9* (*ced*, *ceanorhabditis elegans death*, por sus siglas en inglés). En términos generales, *ced-3* y *ced-4* pueden clasificarse como proapoptóticos y *ced-9* como antiapoptótico.

El producto de *ced-3* es una proteasa de cisteína que fragmenta proteínas después de un residuo de aspártico, y cuya actividad está asociada al proceso de ejecución de

la muerte. En células de mamífero, se ha encontrado 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), conocidas actualmente como caspasas. Las **caspasas** se activan en una gran cantidad de tipos celulares y en respuesta a muy diversos estímulos (revisión en Martin y Green, 1995; Alnemri, 1997; Thornberry y Lazebnik, 1998). Estas proteínas son sintetizadas como zimógenos y se activan al ser procesadas por otras proteasas o por autoproteólisis, generando dos subunidades cuyo rearreglo forma la proteasa activa. La participación de varias proteasas de esta familia en una cascada proteolítica, en la cual se activan proteasas de manera secuencial, resulta en la proteólisis de otras proteínas celulares (Figura 6). Se han identificado varios sustratos que son fragmentados por diferentes caspasas durante la apoptosis. Entre los **sustratos de caspasas** se encuentran proteínas citosólicas y de membrana como: la gelsolina, la proteína cinasa C β 1, la fosfolipasa A2, la α fodrina, proteínas de unión al elemento regulador de esteroides (SREBPs, por sus siglas en inglés) 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, como resultado de la actividad de 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, por sus siglas en inglés) o inhibidor de DNAsa activada por caspasa (ICAD, por sus siglas en inglés), 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).

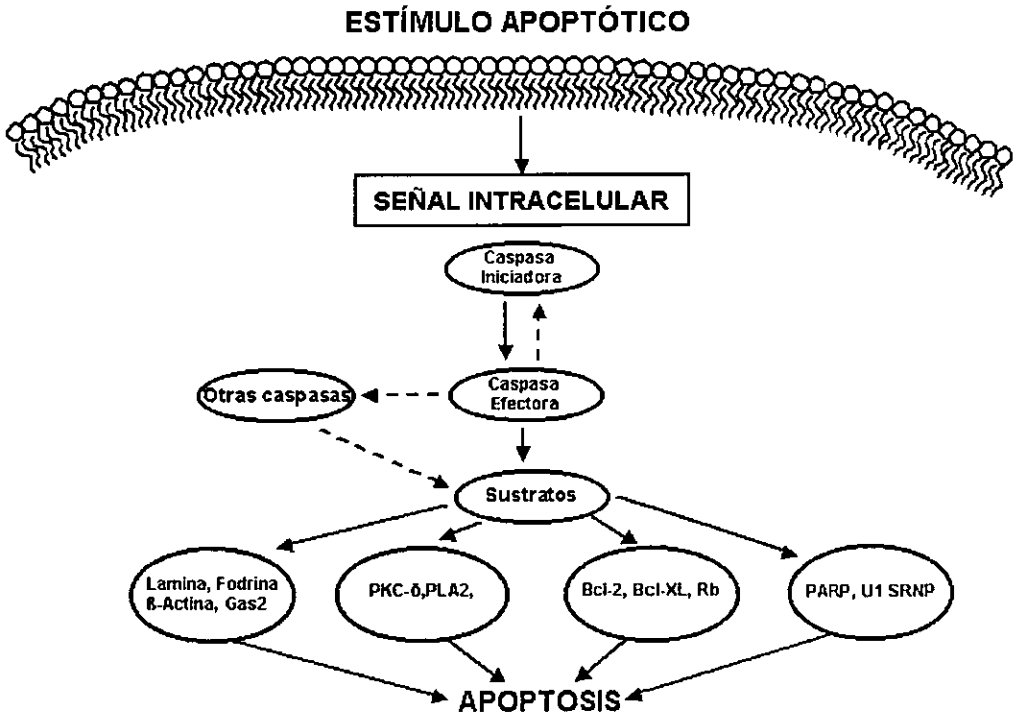


Figura 6. Caspasas como componentes centrales en el proceso apoptótico. Interacciones conocidas (líneas continuas) y putativas (líneas punteadas) entre caspasas y sus sustratos, que se llevan a cabo durante el proceso apoptótico.

El gen *ced-4* codifica una proteína, que al igual que *Ced-3*, es muy importante para la inducción de la muerte en *C. elegans* cuya acción se ha situado entre las proteínas antiapoptóticas *ced-9* y *ced-3*. *Ced-4* es una proteína altamente hidrofóbica de 63 KD,

se propone que promueve el 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, por lo que se ha sugerido que podría funcionar como ATPasa. Por otra parte, 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-4 con Ced-9 y Ced-3, que le permite unirse a ambas proteínas de manera simultánea; bajo estas condiciones Ced-3 no es procesada (Spector et al, 1997; Chinnaiyan et al, 1997; Wu et al, 1997).

Con base en estas observaciones, se ha propuesto que Ced-4 puede funcionar como chaperonina para mantener a Ced-3 inactiva y que la hidrólisis de ATP activada por algún estímulo apoptótico produciría la energía necesaria para la activación autocatalítica de Ced-3.

Un estudio reciente mostró que Ced-4 podría unirse al zimógeno de Ced-3 en dos sitios: el prodominio y el dominio de proteasa, de manera que al unirse Ced-9 a Ced-4 impide que éste se una al prodominio de Ced-3 evitando su activación, aunque pueda unirse al dominio de proteasa (Chandhary et al, 1998).

Estudios paralelos del grupo de Yang (1998) sugieren que Ced-4 tiene la capacidad de oligomerizarse promoviendo de esa manera la proximidad de los dominios de proteasa de Ced-3, favoreciendo así el autoprocesamiento necesario para su activación. Este grupo propone que Ced-9 (proteína antiapoptótica) se une a Ced-4 inhibiendo su oligomerización, evitando así el contacto entre las moléculas de ced-3 y su activación.

El homólogo de Ced-4 en mamíferos ha sido descrito y se le denomina **Apaf-1** (factor activador de la apoptosis 1) (Zou et al, 1997). Esta proteína presenta una región con alta homología a Ced-4, que incluye el sitio de unión a nucleótidos. Se ha sugerido que Apaf-1 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 y colaboradores (1998) sugieren que Apaf- 1 tiene la capacidad de oligomerizarse y, mediante la interacción con el citocromo-c y el dATP, promover la activación de la caspasa-9.

El gen **ced-9** codifica una proteína que permite la sobrevivencia de determinadas células durante el desarrollo de *C. elegans*, la cual se sabe que 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.

Uno de los homólogos estructurales de ced-9 en mamíferos es el gen **bcl-2**, cuyo producto proteico tiene una función análoga a la del producto del gen ced-9, la inhibición del proceso de muerte.

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 linfocitoide 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, el gen *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 (Merry et al, 1994). Los niveles de expresión de este gen son altos en etapas de la neurogénesis postnatal en las células granulares del cerebelo (CGC por sus siglas en inglés) 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 la inducción de altos niveles de *Bcl-2* inhibe la apoptosis provocada por distintos estímulos en diferentes tipos celulares (revisión en Reed, 1997b), incluyendo algunos tipos neuronales (revisión en Merry y Korsmeyer, 1997). Sin embargo, no todos los tipos celulares que experimentan muerte apoptótica pueden ser rescatados por la sobreexpresión de *Bcl-2* (Reed, 1997 b)

Por otra parte, se han identificado una serie de proteínas con características estructurales muy similares a *Bcl-2*, en las que 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).

La presencia de los distintos productos génicos de la familia de *bcl-2* es diferencial, 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 podría 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, la muerte o la sobrevivencia (Oltvai et al, 1993; revisión en Merry y Korsmeyer, 1997; Chao y 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 éstos; sin embargo, hasta ahora se desconoce la acción concreta de Bcl-2 para promover la sobrevivencia. Se han sugerido diferentes hipótesis acerca de la función de Bcl-2. Hace algunos años, los grupos de Hockenbery (1993) y Kane (1993) propusieron que Bcl-2 podría funcionar como quelante de radicales libres, ya que en los sistemas estudiados en estos trabajos, Bcl-2 bloquea la muerte por daño oxidativo. Sin embargo, en estudios posteriores se ha observado la acción antiapoptótica de Bcl-2 en condiciones casi anaerobias, lo que sugiere otra vía de acción para Bcl-2 (Shimizu et al, 1995; Jacobson y Raff, 1995).

La función de Bcl2 en relación con su localización en el núcleo y en el retículo endoplásmico ha sido poco explorada, pero se ha encontrado que Bcl-2 es capaz de ejercer su acción antiapoptótica, aún en ausencia del núcleo (Jacobson et al, 1994).

También 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 en la concentración de Ca^{2+} en el citoplasma, ya sea evitando su liberación del retículo endoplásmico o aumentando la capacidad de incorporar Ca^{2+} citosólico en la mitocondria (Lahm et al, 1994; Murphy et al, 1996).

En los últimos años se ha prestado mayor atención al papel activo de la mitocondria en la apoptosis. Por un lado, en la mitocondria se localizan diferentes integrantes de la familia de Bcl-2 (revisión en Kroemer et al, 1997; Green y Reed, 1998). Por otra parte, este organelo está relacionado con los cambios metabólicos y la producción de radicales libres que se presentan durante etapas tempranas en varios sistemas apoptóticos. En relación a la localización de Bcl-2 en la mitocondria, se ha propuesto que su acción no está relacionada con alteraciones funcionales en la cadena respiratoria, sino con mantener el potencial de membrana mitocondrial reforzando 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 años se han presentado evidencias que sugieren un nuevo modelo de acción para Bcl-2 directamente relacionado con la mitocondria. En este modelo 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).

Bax es el principal miembro proapoptótico de la familia de Bcl-2, se encuentra tanto anclado a la membrana mitocondrial como en el citosol. Algunos estudios sugieren que Bax se redistribuye del citosol a la mitocondria después de la inducción de un proceso apoptótico (Wolter et al, 1997). En células susceptibles a muerte apoptótica, la porción de Bax que se localiza en el citosol se encuentra normalmente como un

monómero inactivo; ante un estímulo apoptótico, se trasloca a la mitocondria donde sufre un cambio conformacional y se homodimeriza para insertarse en la membrana interna de la mitocondria. La capacidad de esta proteína para dimerizarse e insertarse en la membrana interna de la mitocondria, se ha relacionado con la habilidad Bax para formar canales iónicos e incluso poros en ésta (Reed, 1997). La sobreexpresión de Bax y de otras proteínas proapoptóticas, puede inducir apoptosis aún en presencia de inhibidores de caspasas (MacCarthy et al, 1997). Se ha sugerido que Bax podría inducir este proceso de muerte independiente de caspasas a través de la formación de canales capaces de inducir alteraciones en la permeabilidad de la membrana mitocondrial (Green y Reed, 1998). Sin embargo, también se ha propuesto que la capacidad de Bax para formar poros en la membrana podría estar relacionada con la liberación del citocromo-c y otras proteínas relacionadas con el control de la muerte apoptótica.

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

El **citocromo-c** es una proteína de 12.3 KD codificada por un gen nuclear que se traduce en el citoplasma para formar el apocitocromo-c que se inserta en la membrana externa de la mitocondria, donde adquiere un grupo hemo para formar el holocitocromo o citocromo-c funcional. Esta alteración hace del citocromo-c una proteína polar con carga positiva, incapaz de atravesar la membrana interna de la mitocondria, manteniéndose unida mediante fuerzas electrostáticas a la citocromo oxidasa, en la superficie de la membrana interna hacia el 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 (complejo III) 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 la muerte apoptótica. Yang y colaboradores (1997) encontraron que para activar a las caspasas, el citocromo-c requiere ATP y dATP, además de la interacción con los factores citosólicos, conocidos como Apaf-1 (factor apoptótico activador de proteasas 1) y Apaf-3, identificado actualmente como la caspasa-9 (Liu et al, 1996, Zou et al, 1997).

Estos resultados sugieren un modelo en el que el citocromo-c, al ser liberado de la mitocondria, se une a una región rica en secuencias WD (triptofano-aspartato) que se encuentran en la estructura de Apaf-1, provocando cambios conformacionales en su estructura, que le permiten unirse a la procaspasa-9 y activarla, al parecer facilitando su autoprosesamiento (Figura 7). Una vez activada, 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, 1997a, Hengartner, 1997).

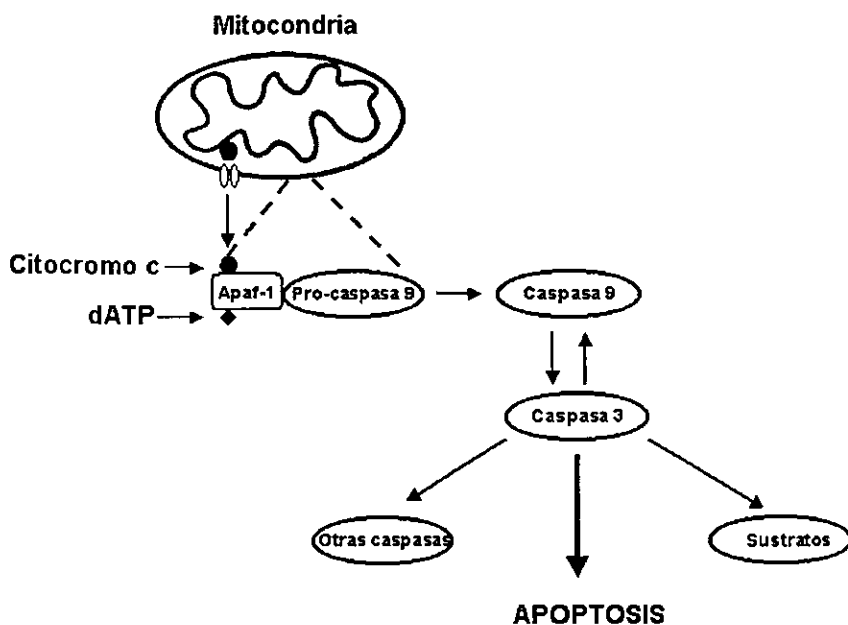


Figura 7. Modelo de activación de caspasas mediada por la liberación del citocromo-c. Bajo un estímulo apoptótico, el citocromo-c se libera de la mitocondria. Una vez en el citosol el citocromo-c puede unirse, en presencia de dATP, a Apaf-1 (Ced-4) para formar un complejo capaz de reconocer y unir pro caspasa-9. Como consecuencia de la formación de este multímero, la pro caspasas-9 puede autoprocesarse para pasar a un estado activo y activar a su vez a la caspasa-3. Finalmente, la activación de la caspasa-3 puede conducir a la activación de otras caspasas o a la acción directa sobre diversos sustratos.

De acuerdo a este modelo, la liberación del citocromo-c inicia un programa de muerte apoptótica a través de la activación de caspasas. Sin embargo, existe la posibilidad de que la salida del citocromo-c de la mitocondria provoque alteraciones en el funcionamiento de la cadena respiratoria. Esto podría tener como consecuencia la disminución de la actividad metabólica y la producción excesiva de radicales libres

que podrían llevar a la célula a un proceso de muerte necrótica (Reed, 1997a) (Figura 8).

Hasta la fecha, se desconocen tanto la señal que provoca la liberación del citocromo-c como la forma en que se lleva a cabo esta translocación. En algunos sistemas apoptóticos, la liberación del citocromo-c es precedida por un decremento en el potencial de membrana de la mitocondria ($\Delta\Psi$). Esta pérdida del $\Delta\Psi$ genera alteraciones transitorias en la permeabilidad de la mitocondria por lo que se ha sugerido que la salida del citocromo-c puede estar relacionada con la apertura de poros en las membranas tanto interna como externa (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 peso molecular menor a 15 KD y la acumulación de algunos iones, particularmente calcio. Esto provoca la liberación de componentes de la matriz, alteraciones funcionales en la mitocondria y un hinchamiento de la mitocondria que conduce a la ruptura de la membrana externa, permitiendo de esta manera 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- Wetzal 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.

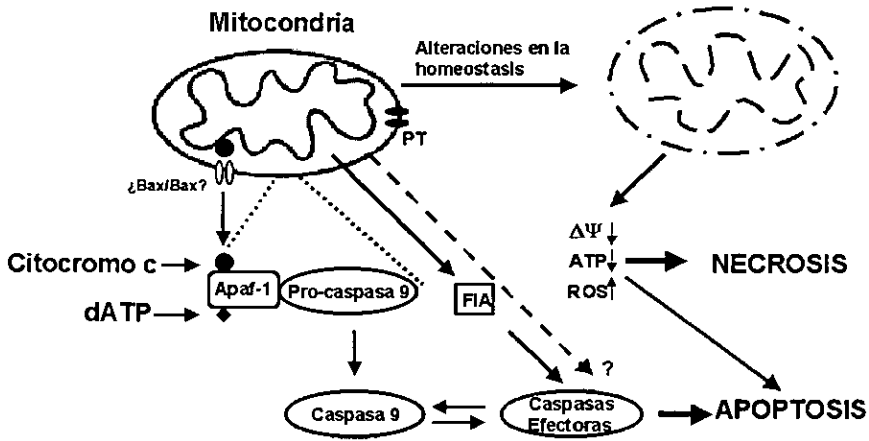


Figura 8. Papel activo de la mitocondria durante la apoptosis y necrosis. Durante la apoptosis, alteraciones en la permeabilidad de la membrana mitocondrial pueden producir la liberación del citocromo-c con la consecuente activación de la cadena de caspasas. Durante la necrosis, la mitocondria genera un exceso de radicales libres, altera el gradiente protónico y disminuye la cantidad de ATP. FIA, factor inductor de apoptosis; $\Delta\Psi$, gradiente protónico; radicales libres.

Como se ha comentado, 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 del citocromo-c de la mitocondria (Kluck et al, 1997; Yang et al, 1997; Karbanda 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 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). Se ha propuesto que Bcl-2 podría inhibir el efecto del citocromo-c de manera indirecta, tal vez interactuando con Apaf-1, evitando que éste se una a la caspasa-9 y la active, de manera similar al modelo descrito para *C. elegans* en el que Ced-9 se une a Ced-4 para evitar su interacción con Ced-3 y su posterior activación (Hengartner, 1997).

Recientemente, se ha propuesto la participación de los miembros de la familia de Bcl-2 tanto en el proceso de liberación del citocromo-c como en la inhibición del mismo. Debido a que estas proteínas tienen estructuras parecidas a las de algunas toxinas bacterianas con capacidad de formar poros en la membrana celular (colicinas y toxina difteria), se cree que podrían formar poros en la membrana externa de la mitocondria, para regular 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 neutro 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. Así, los modelos generados a partir de estos resultados sugieren que Bcl-2 puede actuar ya sea directamente, como formador estructural de

un poro o indirectamente, regulando flujos iónicos relacionados con la liberación del citocromo-c a través de la regulación de la acción de Bax a nivel mitocondrial.

Proteínas de estrés

Cuando algunos tipos celulares, o bien organismos en conjunto, son expuestos a condiciones adversas, como incremento en la temperatura, metales pesados, hipoxia o isquemia, se produce una respuesta que involucra la síntesis de un grupo de proteínas conocidas como proteínas de choque térmico (HSP, por sus siglas en inglés) al mismo tiempo que se reduce la expresión de otras proteínas (figura 9).

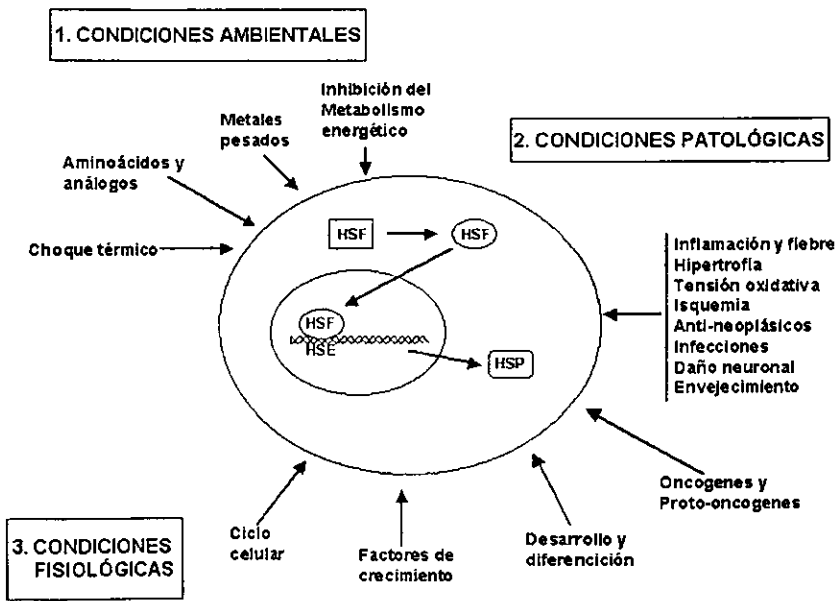


Figura 9. Inductores de la respuesta a estrés. Diagrama de las tres principales clases de inductores de la respuesta a estrés. Cada inductor actúa como se representa en la figura produciendo la activación de un factor activador de la síntesis de estas proteínas (HSF, por sus siglas en inglés) a través de la unión a un elemento responsivo (HSE, por sus siglas en inglés) en la región del promotor de las proteínas de estrés (modificado de Morimoto et al, 1992).

Las **HSP** son un grupo de proteínas constitutivas inducibles. Algunos miembros de esta super familia se expresan de manera constitutiva e incrementan sus niveles en respuesta a estrés, mientras que otros sólo se expresan como consecuencia a la exposición a condiciones fisiológicas no óptimas. Las HSP que se expresan de manera constitutiva actúan, generalmente, como **chaperoninas** de otras proteínas celulares uniéndose a péptidos recién sintetizados para asegurar o facilitar que esta proteína adquiera la estructura tridimensional adecuada o para facilitar la translocación de proteínas al interior de diversos organelos. La inducción de altos niveles de HSP se ha relacionado con el desarrollo de **termotolerancia**, un mecanismo de resistencia a altas temperaturas inducido por una exposición previa y momentánea a un ligero incremento en la temperatura o a otro tipo de agente capaz de producir estrés. Se ha propuesto que las HSP inducibles (HSPi) pueden ejercer su efecto protector ya sea evitando la desnaturalización de proteínas o bien reparando el daño que generan los inductores de estrés (Buzzard et al, 1998).

Un grupo particularmente destacado de la superfamilia de las HSP, lo constituye la familia de las **HSP-70** (HSP con peso molecular cercano a 70 KD) ya que se ha implicado la sobreexpresión de miembros de esta familia en la inhibición de la muerte apoptótica inducida por calor en varios tipos celulares (Mosser y Martín, 1992; Strasser y Anderson, 1995). La expresión exógena de HSP-72 es capaz de proteger a varias líneas celulares de condiciones adversas como temperaturas altas, de algunas drogas (Samali y Cotter, 1996), del efecto citotóxico del TNF α (Jaattela et al, 1992), del óxido nítrico (Bellmann et al, 1996), de la neurotoxicidad inducida por glutamato (Rodorf et al, 1991) y de la privación de ATP en neuronas (Kavakov y Gabai, 1994).

Factores tróficos durante el desarrollo

Entre las moléculas reguladoras del proceso de muerte observado durante la neurogénesis, los factores tróficos (FT) juegan un papel relevante. Los factores neurotróficos son sustancias endógenas esenciales para la sobrevivencia, la diferenciación, el crecimiento y la plasticidad neuronal. Entre los factores neurotróficos mejor estudiados se encuentra el factor de crecimiento neuronal (NGF, por sus siglas en inglés), cuya presencia se sabe que es determinante para la sobrevivencia de neuronas sensoriales, simpáticas y colinérgicas del núcleo basal. Se han encontrado otras moléculas con funciones neurotróficas que presentan homología de un 50-60% con el NGF y que, junto con otros factores, se conocen como **neurotrofinas**. Entre éstas se encuentra el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF, por sus siglas en inglés), la neurotrofina 3 (NT-3) y la neurotrofina 4/5. De manera similar, se han caracterizado otras familias de FT (neuroquinas, factores de crecimiento fibroblástico, la superfamilia del factor de crecimiento epidérmico, etc.), pero tal vez sea la familia de las neurotrofinas la que actúa, casi exclusivamente, sobre el SN.

Las neurotrofinas ejercen su efecto a través de la unión a receptores específicos, p75 y la familia de receptores trk (cuya característica principal es poseer un dominio de tirosina-cinasa intracelular). 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, la fosforilación del dominio citoplásmico de estos receptores reclutan moléculas específicas de señalización intracelular que pueden tener efecto sobre la regulación de la síntesis de proteínas estructurales, procesos metabólicos y producción y liberación de neurotransmisores.

Con base en 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 un proceso de competencia de las neuronas por cantidades suficientes de factores tróficos liberados por sus células blanco. De esta manera, se propone que existe un proceso de selección que permite ajustar el número de neuronas con las células blanco que inervan (Raff et al, 1993). En este sentido, experimentos diseñados para evaluar los efectos de la remoción de aferencias y el bloqueo de las sinapsis, han demostrado la importancia de la regulación de flujos iónicos a través de la membrana, que afectan la actividad eléctrica de la neurona receptora en la sobrevivencia neuronal. El hecho de que, en etapas tempranas del desarrollo, se encuentren neurotransmisores en el medio extracelular y células que expresen receptores para ellos parece apoyar la relevancia de la actividad eléctrica en la sobrevivencia neuronal. Recientemente, se ha hecho evidente la función neurotrófica de ciertos neurotransmisores durante el desarrollo del sistema nervioso, destacando la participación del GABA y algunos aminoácidos excitadores en el proceso (Meier et al, 1991; Balázs y Hack, 1990; Leslie, F., 1993).

Aminoácidos como factores tróficos

A principios de los setenta se sugirió que, además del papel como principal neurotransmisor inhibitor, el GABA podría ejercer efectos tróficos durante el desarrollo de neuronas del SNC. Posteriormente, se encuentra que el GABA afecta la sobrevivencia y diferenciación de neuronas del ganglio cervical superior y de la corteza cerebral *in vivo*, así como de neuronas de retina, corticales, tectales y granulares del cerebelo en cultivo (Hansen et al, 1987; Meier et al, 1991). En cultivos

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

Por otro parte, se ha demostrado la acción trófica del ácido glutámico sobre diferentes poblaciones de neuronas en cultivo del hipocampo, del cerebelo y de la médula espinal. Esta acción del glutamato depende 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 de acuerdo a su capacidad para reconocer al NMDA como agonista, (receptores tipo NMDA y no-NMDA, respectivamente). Estos últimos incluyen al receptor de ácido kainico (AK) y al receptor de AMPA (ácido propiónico alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol).

Receptor tipo NMDA

El receptor tipo NMDA es un complejo proteico acoplado a un canal iónico permeable a sodio, potasio y, particularmente, a calcio (Figura 10). 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, uno para el glutamato y otro para la glicina (que actúa como coagonista). La activación del receptor requiere de la unión de ambas moléculas para la apertura del canal. También presenta un sitio de unión a poliaminas, que a bajas

concentraciones aumentan la probabilidad de apertura del canal, y provocan un bloqueo, dependiente de voltaje, a altas concentraciones. 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 (20-30 mV), 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 otra parte, al unirse el Zn^{2+} a su sitio de reconocimiento, bloquea la respuesta al NMDA de manera independientemente del voltaje, provocando la reducción en el tiempo de apertura del canal.

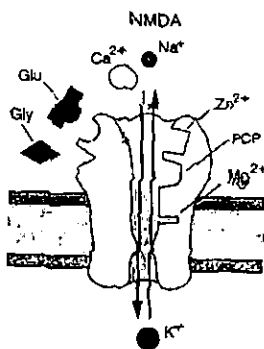


Figura 10. Esquema del receptor a glutamato tipo NMDA. Este receptor regula un canal iónico permeable a K^+ , Na^+ y particularmente a Ca^{2+} . Presenta sitios de unión para glutamato, glicina, Zn^{2+} , poliaminas y Mg^{2+} , los cuales regulan la función del canal iónico (Tomado de DeLong, 2000).

Existen distintas isoformas del receptor a NMDA, compuestas por dos tipos de subunidades: NR1 y NR2 (A, B, C, D). Las diferentes isoformas del receptor 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 mismo.

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 al receptor tipo NMDA, que 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 y 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).

ANTECEDENTES

Los cultivos de CGC han demostrado ser un modelo adecuado para el estudio de eventos asociados al desarrollo del sistema nervioso central (Balász, 1988 a; Morán y Patel, 1988 a; Morán y Rivera Gaxiola, 1992, Komuro y Rakic, 1997). En este modelo se ha encontrado que el tratamiento con altas concentraciones de KCl (25 mM) o la estimulación del receptor a glutamato tipo NMDA (150 μ M), promueven la sobrevivencia y la diferenciación de estas neuronas (Lasher y Zagon, 1972; Gallo et al, 1987; Balász et al, 1988 a, b; Morán y Patel, 1989a, b; Burgoyne et al, 1993, Alavez et al, 1996). La estimulación del receptor a NMDA y concentraciones elevadas de KCl promueven también la maduración de las CGC, ya que inducen el crecimiento de neuritas (Burgoyne et al, 1993), 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) y un incremento considerable tanto en la actividad como en 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 utilizado como neurotransmisor (Morán y Patel, 1988 a, b; Morán y Rivera Gaxiola, 1992, Alavez et al, 1996).

Se ha propuesto que la dependencia de estimulación despolarizante observada en el cultivo, podría reflejar el arribo de una población glutamatérgica a la capa granular interna del cerebelo, aproximadamente a P12. De esta manera, la despolarización producida por los tratamientos *in vitro* podría mimetizar el efecto que la aferencia de estas fibras tiene sobre las neuronas granulares a través de los receptores glutamatérgicos en etapas tempranas del desarrollo (Gallo et al, 1987; Burgoyne et al, 1993).

Sin embargo, en células granulares ya diferenciadas, el tratamiento con glutamato o con agonistas de este receptor produce un efecto tóxico en el que las células mueren de manera necrótica (Dessi et al, 1993). En el caso particular del NMDA, los efectos tróficos o tóxicos, parecen estar mediados por el incremento en los niveles de Ca^{2+} intracelular, por lo que puede suponerse 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.

Por otra parte, se ha demostrado que las neuronas granulares cultivadas bajo condiciones despolarizantes (K25) y que a los 7-9 DIV se someten a un cambio de medio con bajas concentraciones de potasio (K5), mueren de manera apoptótica (D'Mello, 1993; Yan et al, 1994) debido a la disminución en la concentración de Ca^{2+} citosólico (Galli et al, 1995). Esta muerte requiere de 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 y Johnson, 1996; Chang y Wang, 1997; Armstrong et al, 1997; Atlante et al, 1998; Morán et al, 1996, 1999; Valencia y Morán, 2001).

Dentro del grupo de moléculas implicadas en la regulación de la muerte apoptótica, los miembros de la familia de Bcl-2 son de particular interés. Estas proteínas se encuentran distribuidas ampliamente en los diferentes tipos neuronales que constituyen el sistema nervioso y se han encontrado múltiples evidencias de su papel como reguladores de la muerte neuronal (revisión en Merry y Korsmeyer, 1997).

Algunos estudios sugieren 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).

También 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 ciertos tipos 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 y Korsmeyer, 1997).

Por otra parte, en una gran variedad de sistemas celulares, el incremento en la expresión de algunos miembros de la familia de HSP es capaz de afectar positivamente la sobrevivencia celular (revisión en Lindquist y Craig, 1988). Se ha demostrado que células que expresan altos niveles de estas proteínas, ya sea en respuesta a un estrés previo o a la sobreexpresión artificial de una o más miembros de la familia de HSP elevan su resistencia a una gran variedad de condiciones desfavorables que van desde la exposición a etanol hasta la isquemia cardiaca (Li, 1983; Yellon y Latchman, 1991). Las neuronas también son capaces de inducir la síntesis de proteínas de estrés en respuesta a diversas condiciones adversas como la neurotoxicidad inducida por glutamato (Rodorf et al, 1991) y la privación de ATP (Kavakov y Gabai, 1994).

HIPÓTESIS

Considerando que condiciones despolarizantes (NMDA y K25) promueven la sobrevivencia de las células granulares del cerebelo (CGC) en cultivo, es posible que los mecanismos subyacentes, tanto al proceso de muerte como a la sobrevivencia inducida por despolarización (NMDA y K25), involucren la participación de proteínas reguladoras del proceso apoptótico (Bcl-2, Bax, Cit-c, caspasas) o bien, regulen la respuesta celular al estrés.

OBJETIVO GENERAL

Determinar los mecanismos básicos que subyacen al proceso de muerte que se observa en CGC por privación de estimulación despolarizante y en el rescate inducido por NMDA y K25.

OBJETIVOS PARTICULARES

Caracterizar morfológica y bioquímicamente el proceso de muerte que se observa en cultivos de CGC por privación de estimulación despolarizante.

Determinar si en el incremento en la sobrevivencia producida por condiciones despolarizantes en cultivos de neuronas granulares participan proteínas de estrés, particularmente HSP-70 y HSP-25.

Evaluar el papel de Bax y Bcl-2 en la regulación de la muerte apoptótica observada en cultivos de neuronas granulares del cerebelo inducida por la privación de estimulación despolarizante y en la sobrevivencia promovida por el NMDA y K25.

Determinar los niveles de citocromo c en fracciones subcelulares de estas neuronas, para definir si la liberación de esta proteína forma parte del proceso de muerte apoptótica observada en los sistemas estudiados.

Cuantificar la actividad de caspasas iniciadoras y efectoras en ambos modelos y correlacionarla con los parámetros considerados en los apartados anteriores.

OBJETIVO GENERAL

Determinar los mecanismos básicos que subyacen al proceso de muerte que se observa en CGC por privación de estimulación despolarizante y en el rescate inducido por NMDA y K25.

OBJETIVOS PARTICULARES

Caracterizar morfológica y bioquímicamente el proceso de muerte que se observa en cultivos de CGC por privación de estimulación despolarizante.

Determinar si en el incremento en la sobrevivencia producida por condiciones despolarizantes en cultivos de neuronas granulares participan proteínas de estrés, particularmente HSP-70 y HSP-25.

Evaluar el papel de Bax y Bcl-2 en la regulación de la muerte apoptótica observada en cultivos de neuronas granulares del cerebelo inducida por la privación de estimulación despolarizante y en la sobrevivencia promovida por el NMDA y K25.

Determinar los niveles de citocromo c en fracciones subcelulares de estas neuronas, para definir si la liberación de esta proteína forma parte del proceso de muerte apoptótica observada en los sistemas estudiados.

Cuantificar la actividad de caspasas iniciadoras y efectoras en ambos modelos y correlacionarla con los parámetros considerados en los apartados anteriores.

RESULTADOS

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y BIOQUÍMICA DEL PROCESO DE MUERTE CELULAR OBSERVADA POR PRIVACIÓN DE ESTIMULACIÓN DESPOLARIZANTE EN CÉLULAS GRANULARES DEL CEREBELO.

Morfología

En concordancia con reportes previos, durante los primeros 4 DIV tanto las CGC crecidas en K10 (KCl, 10mM) como las tratadas con NMDA presentan somas redondos y turgentes, que se agrupan formando cúmulos comunicados por redes de procesos neuronales.

A partir de los 5-8 DIV las células control (CGC que crecen bajo condiciones no despolarizantes; esto es, sin NMDA o K25) inician un proceso degenerativo en el que se pueden apreciar irregularidades en la membrana plasmática, adelgazamiento de los procesos y una fragmentación de los mismos (Figura 11). Sin embargo, las células tratadas con NMDA sobreviven en buen estado hasta los 10 DIV, mostrando tanto somas redondos y oscuros como procesos gruesos y fuertes (Figura 11). A partir de esta edad, las células tratadas con NMDA inician un proceso de degeneración similar al observado en las células control. Las células cultivadas en K25 presentan diferencias con respecto al control a partir de los 3 DIV. A 7 DIV, se puede apreciar una mayor densidad neuronal, organizada en cúmulos compuestos por varios somas grandes y turgentes, interconectados por paquetes de procesos fuertes. Se ha demostrado que estas células pueden sobrevivir en cultivo hasta tres semanas (Gallo et al, 1987).

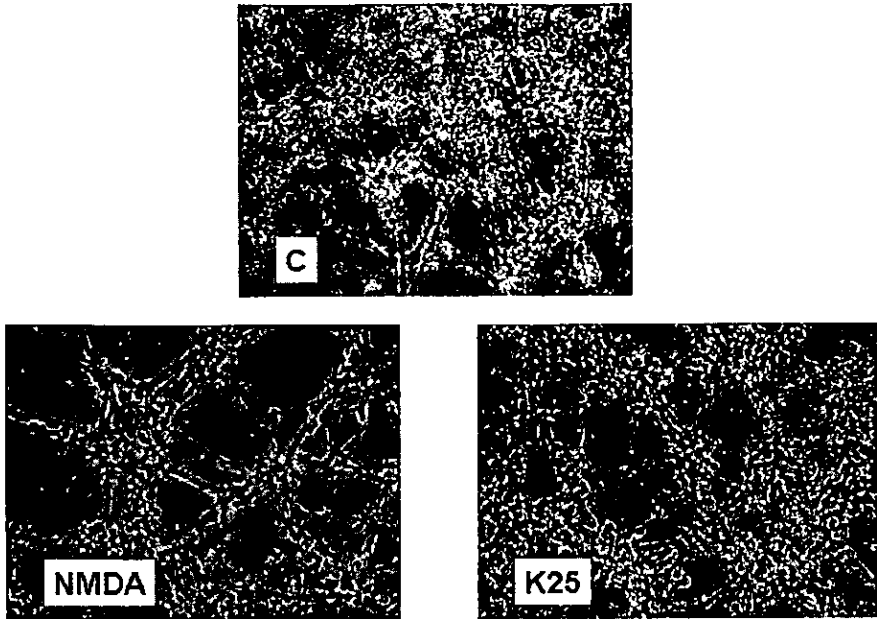


Figura 11. Efecto del NMDA y K25 en la morfología de las CGC en cultivo. CGC cultivadas durante 7 DIV en un medio con K10, muestran signos de degeneración de los somas y adelgazamiento y fragmentación de los procesos (C). CGC crecidas en un medio con K10 y tratadas con 150 μ M de NMDA a los 2 DIV, muestran somas redondos y turgentes y procesos fuertes a los 7 DIV (NMDA). Células granulares que crecieron durante 7 DIV en un medio de cultivo con K25 muestran una alta densidad neuronal, organizada en cúmulos compuestos de somas grandes interconectados por procesos gruesos.

Por otra parte, 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, inician un rápido proceso de degeneración de un gran porcentaje de la población neuronal que es ya evidente 24 horas después del cambio de medio (Figura 12). Bajo estas condiciones, los cambios morfológicos observados corresponden en gran medida a los descritos anteriormente: Encogimiento de los somas y disminución en el diámetro de las neuritas y una posterior fragmentación de los procesos (D'Mello et al, 1993). La apariencia de los cultivos 48 horas después del cambio de medio (privación de estimulación

despolarizante) muestra muy pocas neuronas en buen estado, ausencia total de procesos y una gran cantidad de restos celulares.

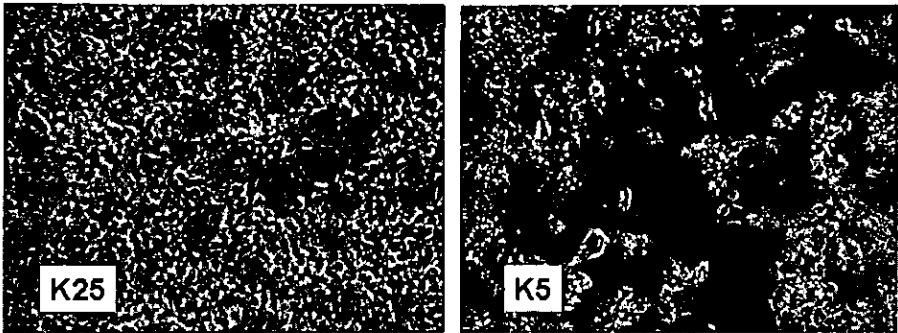


Figura 12. Efecto de la privación de potasio en la morfología de las CGC a los 7 DIV. Las células crecen en un medio con K25 que se sustituye a los 7 DIV por otro con K5, sin suero. Las fotografías fueron tomadas 24 horas después del cambio de medio. El cultivo que permanece con K25 presenta células con somas grandes y procesos fuertes. Cuando el cultivo se somete a la privación de altas concentraciones de potasio, se observa 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 y K25 en la supervivencia de las CGC

Una forma sencilla de determinar la relevancia de la estimulación despolarizante producida por NMDA y K25 es evaluar la supervivencia neuronal a través de la

capacidad de reducción de MTT (ver métodos en artículos 2 y 3) por la mitocondria. Se ha demostrado que en este sistema hay una buena correlación entre la capacidad para reducir MTT y la sobrevivencia celular (Balázs, 1990). Cuando las células se tratan crónicamente con NMDA (150 μ M) durante 7 DIV, la sobrevivencia celular, medida por esta técnica, aumenta en un 93%, mientras que el tratamiento con K25 aumenta aproximadamente un 111% con relación al control (Figura 1A, artículo 3).

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. Bajo estas condiciones la viabilidad de las células disminuye a partir de las 12 horas después del cambio, reduciéndose un 50% a las 24 horas y hasta 20% a 48 horas, con relación al control (Figura 1b, artículo 3).

Características apoptóticas de la muerte observada en CGC por privación de estimulación despolarizante

Condensación del material nuclear

Para determinar si el proceso de muerte que se observa en las CGC bajo estas condiciones es de naturaleza apoptótica, se realizaron tinciones con el colorante fluorescente Hoechst 33258, que se une de manera selectiva al material nuclear. La figura 13 muestra que algunos núcleos de células crecidas bajo condiciones fisiológicas de potasio (K5), presentan 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 (D'Mello et al, 1993; Yan et al, 1994; Galli et al, 1995; Morán et al, 1999; Valencia y Morán, 2001). Resultados similares se obtienen cuando las CGC crecen en un medio con K10.

El tratamiento con NMDA y K25 a los 2 DIV evita esta condensación y los núcleos de neuronas crecidas bajo estas condiciones despolarizantes se mantienen con la cromatina dispersa después de 7 DIV (Figura 13).

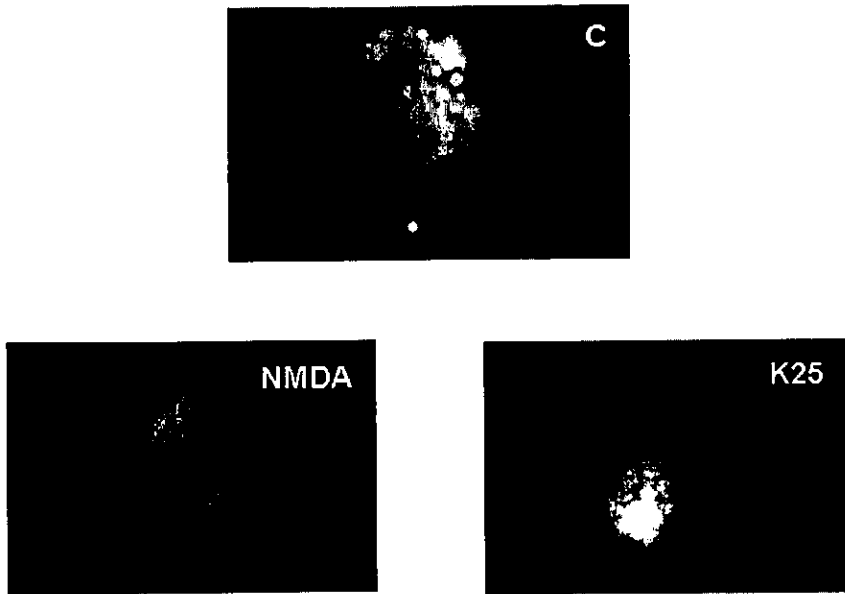


Figura 13. Efecto de la despolarización en la condensación del material nuclear de CGC en cultivo. Cultivos de CGC tratados con NMDA a los 2 DIV, mantenidas en condiciones de alto potasio (K25) o en condiciones fisiológicas de potasio (KCl 5 mM, C) fueron teñidas con Hoechst 33258 a los 7 DIV y observadas en microscopía de fluorescencia. En las células control se observan varios núcleos con la cromatina condensada, mientras que las células crecidas en condiciones despolarizantes, presentan núcleos con la cromatina dispersa.

Por otra parte, se ha demostrado que la muerte inducida por la privación de K^+ en las células granulares ya diferenciadas es de naturaleza apoptótica (Gallo et al, 1987;

D'Mello et al, 1993; Yan et al, 1994; Morán et al, 1999; Valencia y Morán, 2001). Durante este proceso se puede observar una gran cantidad de núcleos condensados 24 horas después del cambio de medio, en comparación al control mantenido en K25 (Figura 14).

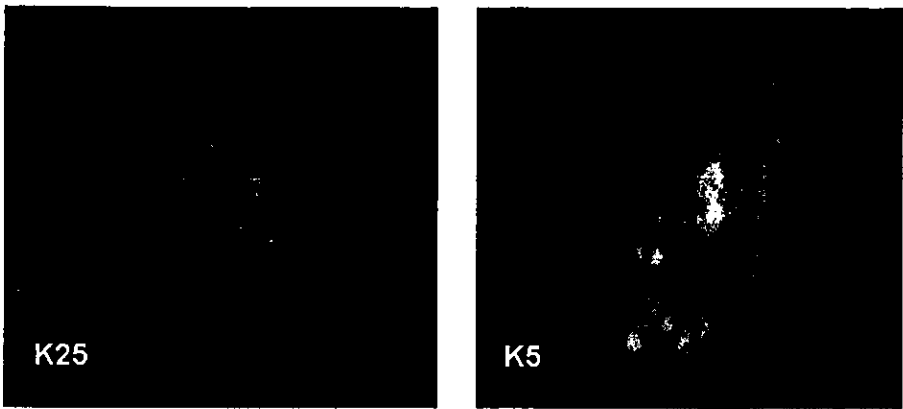


Figura 14. Efecto de la privación de potasio en la condensación del material nuclear de las CGC en cultivo. Las células fueron teñidas con Hoechst 33258, 24 horas después del cambio de medio. En las células control (K25) se observa la cromatina dispersa, mientras que las células privadas de potasio (K5), muestran núcleos con la cromatina condensada.

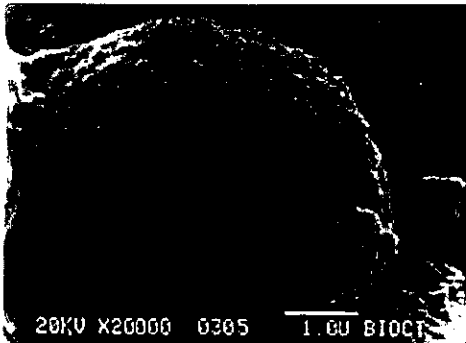
Alteraciones en la membrana plasmática

Como ya se comentó, una de las alteraciones características de la apoptosis es la presencia de alteraciones en la membrana plasmática. Este tipo de alteraciones

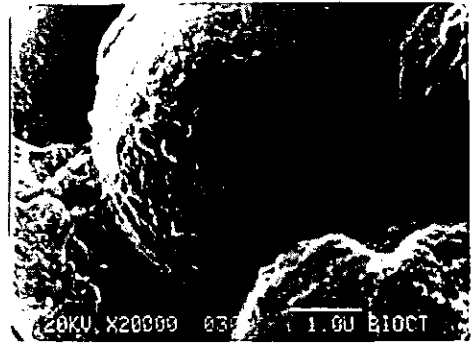
puede distinguirse utilizando microscopía electrónica de barrido diferencial. La figura 15 muestra las alteraciones a nivel de membrana (protrusiones) que se observan en cultivos privados de estimulación despolarizante. El tratamiento crónico con NMDA y K25 prácticamente inhibe este proceso.



C



NMDA



K25

Figura 15. Efecto de NMDA y K25 en las alteraciones de la membrana plasmática inducidas por privación de estimulación despolarizante. CGC cultivadas bajo la acción de K5, NMDA o K25 fueron procesadas para microscopía electrónica de barrido diferencial a los 7 DIV. La privación de estimulación despolarizante (C) induce claras alteraciones en la membrana plasmática que son claramente revertidas por NMDA y K25.

Efecto de inhibidores de síntesis de proteínas en la sobrevivencia de las CGC en cultivo

En función de que la muerte programada, y en algunos casos la apoptosis, depende de la expresión de proteínas *de novo*, este proceso puede ser inhibido por bloqueadores de la síntesis de proteínas. La exposición de las CGC a actinomicina D (Act-D, 0.1 $\mu\text{g/ml}$) o cicloheximida (CHX, 1 $\mu\text{g/ml}$) durante 1-12 horas a los 4-5 DIV, es capaz de reducir la muerte inducida por privación de estimulación despolarizante (Figura 16; Tabla 1, artículo 1). Concentraciones superiores a las mencionadas son muy poco eficaces y, dependiendo del tiempo de estimulación, pueden ser sumamente tóxicas.

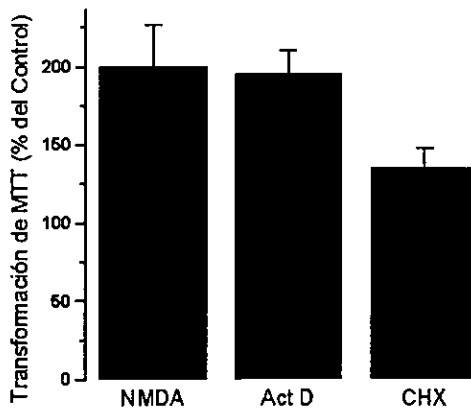


Figura 16. Efecto de Act D y CHX en la sobrevivencia de las CGC. CGC cultivadas en K5 fueron tratadas con NMDA (150 μM , 2 DIV), Act D (0.1 $\mu\text{g/ml}$, 5 DIV) o CHX (1 $\mu\text{g/ml}$, 5 DIV) durante 6 h. Bajo estas condiciones, tanto Act D como CHX producen una inhibición del proceso de muerte similar a la producida por NMDA. Los resultados están expresados como el promedio \pm error estándar de 4 experimentos diferentes.

Efecto del tiempo de estimulación del receptor a glutamato tipo NMDA en la sobrevivencia de las CGC en cultivo

Debido a la relevancia fisiológica de la estimulación de las CGC con NMDA, que podría mimetizar una influencia trófica *in vivo* proveniente de las FM, decidimos explorar la dependencia de la sobrevivencia de estas neuronas en función del tiempo de estimulación del receptor a glutamato tipo NMDA. La activación del receptor tipo NMDA de estas neuronas a diferentes DIV muestra que la sobrevivencia de las CGC depende directamente del tiempo de estimulación de este receptor. Así, el máximo efecto sobre la sobrevivencia se alcanza cuando las CGC se estimulan entre los 2-3 DIV (Figura 17).

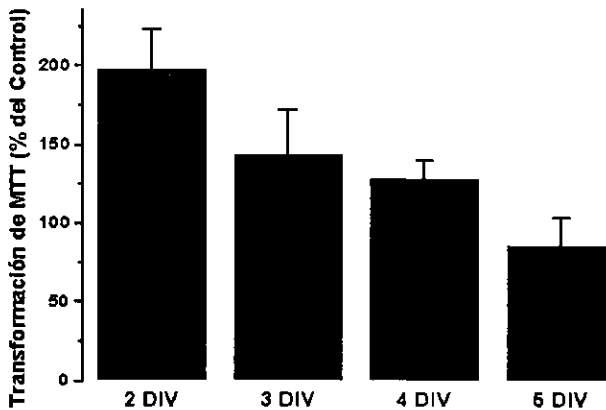


Figura 17. Efecto de la estimulación crónica con NMDA en la sobrevivencia de las CGC. Cultivos de CGC fueron estimulados con NMDA (150 μ M) a los tiempos indicados y la sobrevivencia fue evaluada a los 7 DIV como transformación de MTT. Los resultados están expresados como el promedio \pm el error estándar de 5 experimentos diferentes.

El tiempo mínimo de estimulación con NMDA capaz de inducir efectos en la supervivencia de las CGC es una hora, tanto a los 2 como a los 3 DIV (Figura 1, artículo 1). Estos resultados sugieren una participación crítica de los receptores a NMDA en estadios tempranos del cultivo.

Participación del calcio extracelular en la supervivencia de las CGC en cultivo

Posiblemente la característica más destacable del receptor a NMDA sea permitir el paso de calcio extracelular al interior de la neurona. La figura 18 muestra la influencia de dos fuentes diferentes de calcio extracelular en la supervivencia de las CGC.

En el panel izquierdo de la figura 18 se muestra el efecto del Bay K, un activador de canales de calcio sensibles a voltaje, en la supervivencia de las CGC. La curva contra concentración muestra que la adición de Bay K a una concentración de 1 μM a los 2 DIV, es capaz de permitir la supervivencia de estas células (aproximadamente un 50 % sobre el control). Concentraciones de Bay K superiores a 1 μM son tóxicas para el cultivo (no se muestra).

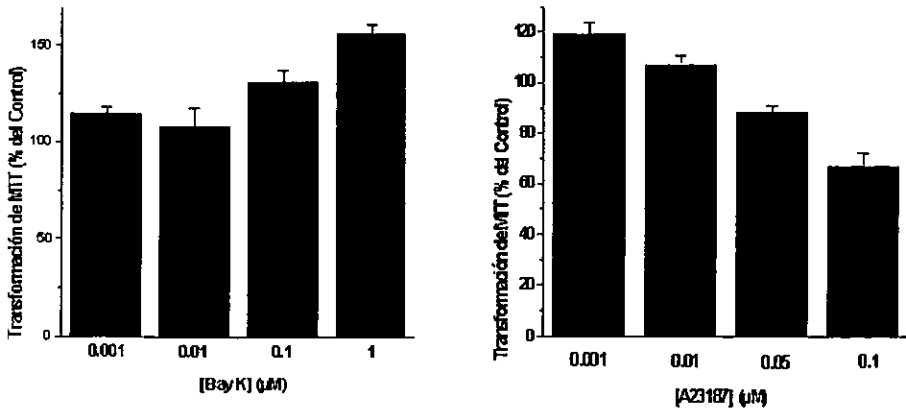


Figura 18. Efecto de Bay K y A23187 en la sobrevivencia de las CGC en cultivo. Las células fueron expuestas a diferentes concentraciones de ambos fármacos a los 2 DIV y la sobrevivencia fue evaluada a los 7 DIV como transformación de MTT. Los resultados están expresados como el promedio \pm el error estándar de 3 experimentos diferentes.

Por otra parte, la incorporación no selectiva de calcio a través de un ionóforo como el A23187 sólo promueve la sobrevivencia de las CGC a una concentración muy baja (0.001 μM) y el efecto sobre la misma es bastante discreto, aproximadamente de un 20 % sobre el control (Figura 18, panel derecho). Concentraciones de A23187 superiores a 0.001 μM son tóxicas para el cultivo, como puede apreciarse en el panel derecho de la figura 18. Estos resultados sugieren que no es una entrada masiva e inespecífica de calcio, sino un influjo controlado y compartamentalizado el que mantiene la sobrevivencia de las CGC en este estadio de maduración.

La acción crónica de estos fármacos adicionados a diferentes DIV y a las concentraciones capaces de promover la sobrevivencia de esta células, determinadas en la figura 17, produce un comportamiento similar al descrito para la acción del NMDA (Figura 16). Así, para ambos compuestos, y particularmente para Bay K, la capacidad de promover la sobrevivencia de estas células depende de la duración del estímulo (Figura 19).

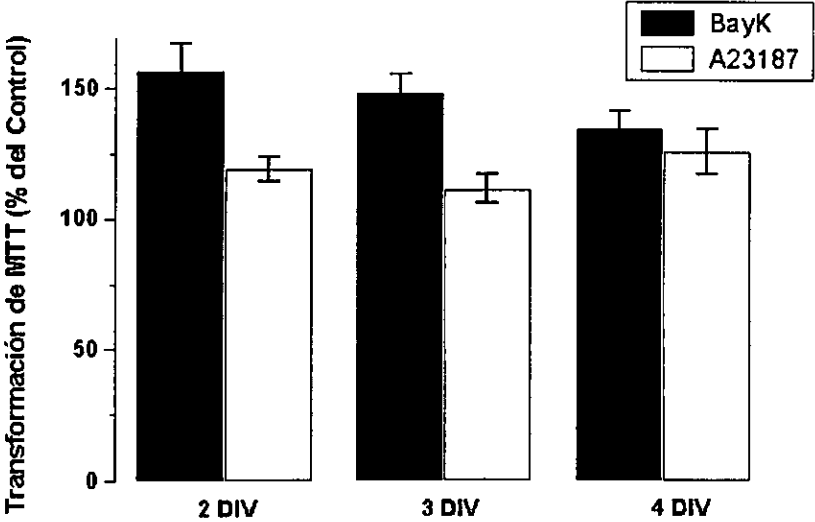


Figura 19. Efecto de la estimulación crónica con Bay K y A23187 en la sobrevivencia de las CGC. Cultivos de CGC fueron estimulados con Bay K (1 μM) o con A23187 (0.001 μM) a los tiempos indicados y la sobrevivencia fue evaluada a los 7 DIV como transformación de MTT. Los resultados están expresados como el promedio \pm el error estándar de 3 experimentos diferentes.

Resultados adicionales se presentan en el artículo: **NMDA RECEPTOR ACTIVATION AND APOPTOTIC DEATH OF CULTURED CEREBELLAR GRANULE NEURONS.**

Los resultados descritos en el apartado anterior sugieren que el proceso de muerte de las CGC presenta características morfológicas de un proceso apoptótico y que la exposición del cultivo a condiciones despolarizantes, como la activación del receptor a glutamato tipo NMDA, inhiben de manera significativa este proceso. Una característica relevante de la muerte programada, es la expresión de una serie de proteínas que participan activamente en este proceso. En este trabajo se exploró la posibilidad de que la inhibición de la síntesis de proteínas con Cicloheximida, fuera capaz de proteger cultivos de CGC del proceso de muerte que ocurre en condiciones no despolarizantes. Los resultados apoyan que el proceso de muerte de las células granulares de cerebelo que se desarrollan en cultivo bajo condiciones no despolarizantes requiere de síntesis de proteínas *de novo*.

La estimulación del receptor de NMDA a partir de los primeros días en cultivo, particularmente desde los 2 y 3 DIV, parece ser crítica para promover la sobrevivencia de estas neuronas (figura 17). En este trabajo se pretende determinar el tiempo mínimo de estimulación del receptor de NMDA capaz de inducir la sobrevivencia de las CGC en cultivo. Los resultados presentados en este artículo muestran que estimular este receptor 1-6 horas a los 2 y 3 DIV, es suficiente para incrementar la sobrevivencia de las CGC de manera significativa.

NMDA RECEPTOR ACTIVATION AND APOPTOTIC DEATH OF CULTURED CEREBELLAR GRANULE NEURONS

JULIO MORÁN¹, GUADALUPE DOMÍNGUEZ, SILVESTRE ALAVEZ

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

This work was partially supported by a grant from DGAPA-UNAM (IN-202093)

Abstract

When cerebellar granule neurons are cultured in a serum-containing medium they normally die after 5-7 days in vitro. This phenomenon shows some characteristics of apoptotic cell death rather than necrotic death. Some of the evidence includes the condensation and fragmentation of chromatin and the formation of phagosomes as well as the observation that cell death is blocked by protein synthesis inhibitors. On the other hand, N-Methyl-D-Aspartate (NMDA), an agonist of the glutamate synaptic receptor can rescue granule cells from death. The effect of NMDA on cell survival is dependent on calcium. The minimal time measured of NMDA stimulation required to induce cell survival was 60 min, indicating that NMDA receptor activation is able to trigger irreversibly a number of events. These results suggest that NMDA receptor stimulation during critical periods of granule cell development leads to the activation of a genetic program that interferes with the process of apoptotic cell death.

Key words: cultured neurons; trophic action; glutamate, apoptosis, NMDA

INTRODUCTION

Programmed neuronal death (PND) is a normal event during the development of the nervous system¹ that significantly contributes to the shaping of brain. It has been shown that PND is precisely controlled by extracellular influences, including trophic factors and other molecules provided by other cells and characterized as an active process regulated by internal programs.¹ PND can be recognized from other types of death like necrosis or degenerative death by some morphological and biochemical parameters that include: nuclear fragmentation and condensation, vacuolization of cytoplasm, cell rounding and wrinkling, formation of phagosomes, loss of mitochondrial function, DNA fragmentation into nucleosomal-size fragments, etc.²

It has been proposed that classical neurotransmitters are involved in Central Nervous System (CNS) development.³ *In vitro* studies have shown that neuronal stimulation with KCl or N-methyl-D-aspartate (NMDA), an agonist of one of the glutamate receptor subtypes, exerts a trophic action. In cultured cerebellar granule cells, chronic depolarization by potassium and NMDA receptor stimulation promotes cell survival.^{4,5} This effect is observed only during critical periods of time, i.e. after 7 days *in vitro* (DIV), corresponding to the time when cerebellar granule cells receive their presynaptic glutamatergic inputs from mossy fibers during development. It has been proposed, therefore, that NMDA or K⁺ could mimic these presynaptic inputs, that could be trophic signals for the survival of the recently innervated cells.⁵ In this study we analyzed the possibility that NMDA receptor activation rescues cerebellar granule cells from apoptotic cell death.

MATERIALS AND METHODS

Dissociated cell suspensions from the cerebellum of 8-day-old rats were plated in dishes coated with poly-L-lysine (1 mg/ml).⁶ The culture medium contained basal Eagle's medium supplemented with 10 % heat-inactivated fetal calf serum. After 2-3 days *in vitro* (DIV), cells were treated with NMDA (150 μ M) during different periods of time (24-72 h). Then cell survival and morphology were analyzed. Cell survival was estimated by measuring the reduction of tetrazolium bromide (MTT) to a coloured formazan product that was measured spectrophotometrically at 570 nm.⁷ In some cases, cells were fixed and processed for EM or incubated with the fluorescent dye Hoechst 33258 and samples were observed in a fluorescence microscope.

Dr. Julio Morán, Instituto de Fisiología Celular Universidad Nacional Autónoma de México Apdo. Postal 70-253, México 04510, D.F., Tel: (525) 622-5616; Fax: (525) 622-5607.

RESULTS

Cultured cerebellar granule neurons die after 5-7 DIV. The morphological analysis of these cells shows shrinking and rounding of the cell body. At EM level we could detect the formation of some structures that resemble phagosomes as well as the aggregation and margination of the chromatin. When cells were stained with the fluorescent dye Hoechst 33258 we could detect fragmentation and condensation of chromatin.

The addition of the protein synthesis inhibitor, cycloheximide (CHX, 1 mg/ml), to the medium at 4 or 5 DIV significantly increased cell survival measured at 7 DIV by MTT transformation. The effect of CHX was more efficient at 5 DIV and during short periods of time (1-12 h) (Table 1). The treatment of cultured cells with 150 mM NMDA markedly reduced cell death when added during different times at 2 and 3 DIV. The shortest period of time of NMDA treatment required to induce a reduction in cell death was 1 h (Fig 1). The effect of NMDA was markedly dependent on extracellular calcium (not shown). The effect of NMDA could be mimicked by Bay-K 8644 (10^{-6} - 10^{-3} mM) an activator of the voltage sensitive calcium channels and, to a lesser extent, by low concentrations (10^{-6} mM) of the calcium ionophore A23187.

Table 1
EFFECT OF CYCLOHEXIMIDE ON MTT TRANSFORMATION IN CULTURED CEREBELLAR CELLS

Condition	MTT Transformation (% of NMDA)	
	Age of Treatment (DIV)	
	4	5
None	18.4 ± 2.7	18.4 ± 2.7
CHX (1 h)	22.8 ± 3.3	41.2 ± 6.8
(4 h)	22.4 ± 6.0	44.7 ± 6.3
(12 h)	32.4 ± 6.3	30.7 ± 1.3
(24 h)	-	29.4 ± 5.8
(48-72 h)	nd	21.9 ± 1.9

Cultures of dissociated cerebellum from 8-day-old rats were prepared as detailed in Materials and Methods and at the end of the culture period (7 days) cell viability was determined using MTT reduction. Cultures were treated with cycloheximide (1 mg/ml) at different ages during the indicated times. Untreated cultures served as controls. Results ± SEM are averages of 4-6 individual cultures and are expressed as % of NMDA (100 %). (-) not performed; nd not detected.

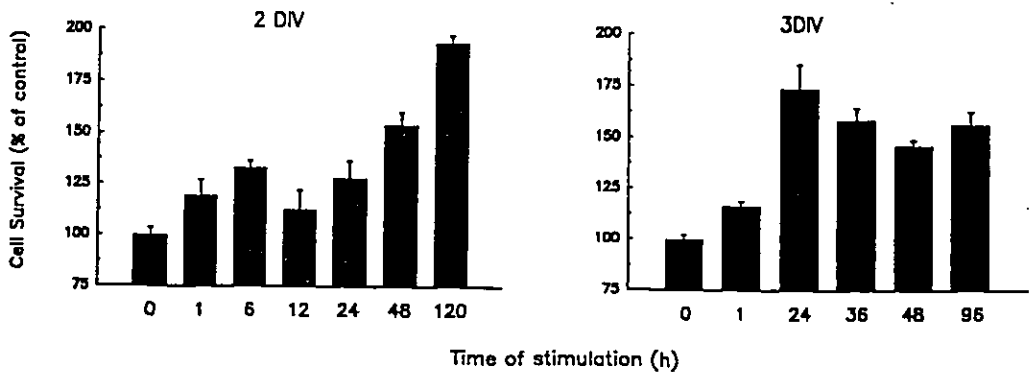


Fig. 1. Effect of different times of NMDA stimulation on cell survival at 2 and 3 DIV. Preparation of cultures was as detailed in Materials and Methods. After 2 or 3 DIV cultures were treated with 150 mM NMDA during the indicated times and cell survival was measured using MTT reduction at 7 DIV. Results are means ± SEM of 3-5 separated experiments and are expressed as % of controls.

DISCUSSION

The morphological characteristics of the granule cells that are in the process of cell death in control conditions strongly suggest that they are under the process of an apoptotic event. Some of these morphological features include: the presence of phagosomes, margination, condensation and fragmentation of the nuclear material and the preservation of the cytoplasmic membrane. In addition, the fact that cycloheximide promotes cell survival also supports this idea,^{1, 2} and supports the notion of apoptosis as an active process. Moreover, in agreement with our results, it has been shown in these cells that DNA is fragmented into nucleosomal-size fragments.^{3, 9}

It has been demonstrated previously that both KCl and NMDA can rescue cerebellar granule cells in culture.^{4, 5} We have observed that the incubation of these cells with NMDA for at least 1 h is enough to promote cell survival, indicating that NMDA receptor activation is able to trigger irreversibly a number of events related to cell survival. This process could be initially mediated by a rise in intracellular calcium as it was shown that this trophic action of NMDA is clearly dependent on extracellular calcium. It is interesting to note that, in contrast to developing cells, in mature neurons NMDA exerts a marked neurotoxic action, that leads to cell death in a process that requires extracellular calcium.¹⁰ All these results suggest that the stimulation of NMDA receptors during critical periods of granule cell development leads to the activation of genetic programs that could interfere with the process of apoptotic cell death and that the bipotential trophic and toxic action of NMDA could be mediated by the same intracellular metabolic pathways.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank Mr. Jorge Sepúlveda and Rodolfo Paredes for their excellent technical assistance.

REFERENCES

1. OPPENHEIM RW. Cell death during development of the nervous system. *Ann. Rev. Neurosci.*, 1991; 14: 453-501.
2. TOMEI LD, COPE FO. Apoptosis: the molecular basis of cell death. *Current Communications* 3. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1991:
3. SCHWARTZ JP. Neurotransmitters as neurotrophic factors: a new set of functions. *Int. Rev. Neurobiol.*, 1992; 34: 1-23.
4. GALLO V, KINGSBURY A, BALAZS R, JORGENSEN OS. The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J. Neurosci.* 1987; 7: 2203-2213.
5. BALÁZS R, JORGENSEN OS, HACK N. N-methyl-D-aspartate promotes the survival of cerebellar granule cells in culture. *Neuroscience.* 1988; 27: 437-451.
6. MORÁN J, PATEL AJ. Stimulation of the N-methyl-D-aspartate receptor promotes the biochemical differentiation of cerebellar granule neurons and not astrocytes. *Brain Res.*, 1989; 486: 15-25.
7. MOSMAN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol. Meth.* 1983; 65: 55-63.
8. D'MELLO SR, 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.*, 1993; 90: 10989-10993.
9. COPANI A, BRUNO VMG, BARRESI V, BATTAGLIA G, CONDORELLI DF, NICOLETTI F. Activation of metabotropic glutamate receptors prevents neuronal apoptosis in culture. *J. Neurochem.*, 1995; 64: 101-108.
10. CHOI, DW. Excitotoxic cell death. *J. Neurobiol.*, 1992; 23: 1261-1276.

PAPEL DE LAS PROTEÍNAS DE ESTRÉS EN LA SOBREVIVENCIA INDUCIDA POR NMDA Y K25 EN CULTIVOS DE CGC

Los resultados correspondientes a este apartado se describen y discuten en el artículo siguiente: **ROLE OF HEAT SHOCK PROTEINS IN THE EFFECT OF NMDA AND KCl ON CEREBELLAR GRANULE CELLS SURVIVAL**

Como ya se comentó, recientemente se ha asociado la inducción de algunos miembros de la familia de proteínas de estrés (particularmente las HSP-70 y 90) en la protección de cultivos neuronales contra estímulos excitotóxicos. En función a estos resultados, decidimos explorar la posibilidad de que algunas de estas proteínas pudieran participar activamente en la inhibición del proceso de muerte de las CGC en cultivo, inducido por condiciones despolarizantes. Así, en este trabajo se cuantificó el efecto de la despolarización en los niveles de HSP-70 y HSP-25 y se determinó si la inducción de la expresión de proteínas de estrés, a través de la adición de ETOH e incremento en la temperatura de incubación, es capaz de afectar el proceso de muerte que se observa en cultivos de CGC bajo condiciones despolarizantes.

Los resultados de este trabajo muestran que las condiciones despolarizantes disminuyen de manera significativa los niveles de HSP-70, mientras que HSP-25 se mantiene sin cambios durante el proceso de muerte y en el rescate inducido por NMDA y KCl. Este resultado sugiere que HSP-70 no está involucrada en el rescate de las CGC inducido por condiciones despolarizantes. Sin embargo, no descarta la participación de otra u otras proteínas de estrés en el proceso. Para explorar esta posibilidad, dos diferentes inductores de la respuesta a estrés se emplearon para probar si una sobreexpresión generalizada de estas proteínas es capaz de interferir el proceso de muerte de las CGC bajo condiciones no despolarizantes. En este sentido, ni la adición de ETOH ni un choque térmico son capaces de incrementar la sobrevivencia de estas células.

En conjunto, estos resultados sugieren que las proteínas de estrés no participan en el proceso de rescate de las CGC inducido por condiciones despolarizantes y que su sobreexpresión no es suficiente para inhibir el proceso de muerte que se observa en ausencia de éstas.

Role of Heat Shock Proteins in the Effect of NMDA and KCl on Cerebellar Granule Cells Survival

S. Alavez,¹ D. Pedroza,¹ and J. Morán^{1,2}

(Accepted October 27, 1999)

Cerebellar granule cells (CGC) die apoptotically after five days in culture (DIV) at physiological concentrations of potassium (5 mM; K5). When CGC are depolarized (K25) or treated with NMDA (150 μ M) cell survival is increased. CGC changed from K25 to K5 die after 24–48 h. It is known that heat shock protein (HSP) may protect from cell death. Here, we found that cells in K5 showed an increase in HSP-70 levels after 3 DIV. Similarly, in cells changed from K25 to K5, HSP-70 levels were increased after 6 h. Neither NMDA nor K25 treatment affected HSP-70 levels from 2–7 DIV. Ethanol or thermal stress induced HSP-70, but cell survival was not affected in K5 medium. These results suggest that HSP, particularly HSP-70, are not involved in the mechanisms by which NMDA and KCl promote cell survival.

KEY WORDS: Neuronal survival; apoptosis; Heat-Shock Proteins; HSP-70; NMDA.

INTRODUCTION

During embryogenesis, a large number of cells are created as a way to ensure that all of the target cells will be properly innervated. Once the appropriate connections are established, the redundant neurons are eliminated by a physiological mechanism called programmed cell death (PCD) or apoptosis (1,2). In cerebellum, it has been proposed that PCD of granule neurons (CGC) could be controlled through the activation of their NMDA receptors by glutamate released from mossy fibers during a critical period of time during development (3,4). This presynaptic input could be a trophic signal not only for inhibiting PCD but also for some events of the differentiation of CGC during early steps of development (5,6). In vitro, NMDA receptor activation or chronic depolarization by potassium promotes the dif-

ferentiation and the cell survival of CGC (5,6). These conditions induce the expression of molecules for the control of genetic expression (7–9), synaptic receptors (10,11) and enzymes for the synthesis of neurotransmitter glutamate (1,5,6,12). Under physiological concentrations of potassium (5 mM, K5) in the medium, CGC undergo cell death after 5 days in vitro (DIV). In contrast, when these cells are stimulated with KCl (>25 mM: K25) or NMDA (150 μ M) cell death is markedly delayed to 10–12 DIV (3,13,14). Cell death of these neurons shows characteristics of apoptotic death according to the morphological and biochemical changes observed (13,14). Similarly, when CGC grown in a K25 medium are changed to a K5 medium, cells die after 24–36 h showing characteristics of apoptosis, like nucleosomal DNA fragmentation and Caspase 3 activation (13,15,16).

Heat Shock Proteins (HSP) are one of the best-conserved proteins in nature (17). Following heat shock or other environmental, physiological and pathological forms of stress, the synthesis of these proteins increases in a significant manner (17). This kind of response is induced in mammalian brain by a variety of stresses (18) like status epilepticus (19,20) and ischemia (21). Many

¹Institute of Cell Physiology, National University of Mexico, Mexico City, Mexico.

²Address reprint request to: Dr. Julio Morán, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Apartado Postal 70-253, 04510, México D.F., México. Tel: (525) 622-5616, Fax: (525) 622-5607, E-mail: jmoran@ifisiol.unam.mx

studies have been focused on one member of the family of HSPs, the HSP-70. Interestingly, the expression of these proteins in response to a mild stress has been shown to be associated with a protective effect against a subsequent more severe stress. HSP-70 overexpression by heat shock in neuronal cells *in vitro* protects cortical neurons from glutamate neurotoxicity (22) and maintains the viability of ATP-deprived cells (23).

In the present work we explored the expression of HSP-70 and HSP-25 during the process of CGC death and the role played by these proteins in the protecting action of NMDA and KCl on CGC survival. We found a time-dependent increase in the levels of HSP-70, but not HSP-25, in CGC grown in a K5 medium, which correlated with cell survival. NMDA and K25 markedly reduced the increase of HSP-70 levels during this period of time. An induction of HSPs by heat-shock or ethanol, was ineffective in rescuing CGC from cell death when maintained in a K5 medium. These results suggest that although HSP's could be indirectly involved in the process of cell death, they do not seem to play a key role in the mechanisms carried out during the control of CGC death/survival in response to trophic influences during development.

EXPERIMENTAL PROCEDURE

Materials. Fetal calf serum and penicillin/streptomycin were obtained from GIBCO (Grand Island, NY). Poly-L-lysine (molecular weight >300,000), trypsin, soybean trypsin inhibitor, DNase, NMDA and 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) were obtained from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO). Reagents for sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), nitrocellulose membranes, enhanced chemiluminescence detecting agent for phosphatase alkaline-conjugated antibodies and molecular weight markers (kaleidoscope) were purchased from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA). Monoclonal antibody for HSP-72/73 (Cat. 1441 906) and anti-mouse alkaline phosphatase-conjugated (was obtained from Boehringer (Mannheim, Germany), monoclonal anti-HSP-25 (Cat. H-0148) were purchased from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO). All other chemicals were of the purest grade available from regular commercial sources.

Cell Cultures. Cerebellar granule neurons were obtained as previously described by Morán and Patel (5,6). Briefly, the dissociated cell suspensions from the cerebellum of 8-day-old rats were plated at a density of 265×10^3 cells/cm² in plastic dishes previously coated with poly-L-lysine (5 µg/ml). The culture medium contained basal Eagle's medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 2 mM glutamine, 50 U/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin. The culture dishes were incubated at 37°C in a humidified 5% CO₂/95% air atmosphere. Granule neurons were added with cytosine arabinoside (10 µM) at approximately 20 h after seeding. Granule cells were grown in the presence of 10 mM KCl instead of 5 mM to abolish the blockade by Mg²⁺ of NMDA receptor (6). After different DIV, cells were treated with NMDA (150 µM) or ETOH (0.15, 0.6 and 1.2 M) for 1 h, 3 h or all the time of incubation. Cells were grown until 5 DIV. For the experiment with change of medium,

granule cells were grown in presence of 25 mM of KCl. After 7 DIV, the medium was replaced for other containing 5 mM of KCl without serum. The enrichment of cultures in neurons was determined by immunostaining counting using polyclonal antibodies against neuron-specific enolase (Dakoparts, Carpinteria, CA) as marker for neurons and against Glial Fibrillar Acidic Protein (GFAP) for glial cells. Cultures contained about 95% neurons from total number of cells and from those 90% corresponded to glutamatergic granule cells. The remaining 5% neurons represents GABAergic non granule cells (stellate and basketed neurons) as previously demonstrated by release and immunohistochemical studies (24,25).

Heat Shock and Alcohol Treatment. Varying amounts of alcohol were previously diluted in culture medium and then added to the cultures to obtain the desired alcohol concentration (0.01–1.2 M). For chronic treatments, appropriate amounts of alcohol were added to the cultures once a day. In short time exposure experiments (1–3 h), one dose of alcohol was added to the cultures. For heat shock experiments, neurons were heated to 40–41°C for 1 h. in a humidified 5% CO₂/95% air atmosphere. Cells were allowed to recover for 2 h after treatment and then prepared for immunodetection or maintained at optimal conditions until required for survival assays.

Immunoblot. After different times of treatment, cells were rinsed twice with phosphate-buffered saline (PBS) at 37°C, resuspended and sonicated at 4°C in a homogenization buffer containing 25 mM Tris-HCl (pH 7.4), 50 mM NaCl, 2% NP-40, 0.2% SDS, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 50 µg/ml aprotinin and 10 µg/ml leupeptin. The protein levels of cell homogenates were determined by the method of Bradford (26). Equal masses of each protein sample (40 µg) were run under non reducing conditions in a one dimensional 12.5% SDS-PAGE (27) and then electroblotted onto PVDF membranes (Bio-rad Laboratories) at 100 V for 1 h. Blots were then blocked with Tris-buffered saline/Tween 20 (TTBS) buffer (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, and 0.1% Tween 20, pH 7.5) containing 5% non fat dry milk powder for 3 h at 4°C, washed three times with TTBS and incubated with the HSP-72/73 primary antibody (1 µg/ml) overnight. After further washing, the blots were incubated with alkaline phosphatase-conjugated anti-mouse secondary antibody (1:200) for 1 h at room temperature. After washing, the blots were processed for visualization using the enhanced chemiluminescence system according to the manufacturer's recommendations (Bio-Rad Laboratories) and exposed to Kodak XAR-5 film. The images were obtained by GEL SCAN program.

MTT Assay. Yellow MTT is converted to the formazan blue product only by metabolically active mitochondria, and the absorbance is directly proportional to the number of viable cells (28). MTT (0.5 mg/ml) was added to the cultures and the cells were incubated 1 h at 37°C. After aspiration of the medium, 800 µl of isopropanol-HCl (0.2 N) was used to dissolve the dark purple formazan compound formed during the incubation. Samples were read at a test wavelength of 570 nm and a reference wavelength of 630 nm. The data were calculated as the absorbance at 570 nm minus the absorbance at 630 nm and expressed as percentages of control groups.

Statistical Analysis. Results are expressed as mean ± SEM values, and statistical significance of the results were determined by one way analysis of variance (ANOVA) followed by a Fisher's test. A value of $p < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

NMDA and KCl Increases the Survival of CGC in Culture. In agreement with previous reports (3,4,

13,30), when CGC were cultured from 2 DIV in a medium containing 25 mM KCl (K25) or 150 μ M NMDA, cell survival was longer in comparison to neurons maintained in a K5 medium. During the first 3–4 DIV, no apparent morphological differences were observed under both conditions. However, after 5 DIV, cell morphology of neurons grown in a K5 medium displayed characteristics of apoptosis like cytoplasmic blebbing, vacuolization, thinness of neurites and a marked soma shrinkage, followed by cell death (3,4,13,30). The observed morphological features of CGC showed a correlation with the cell viability measured by MTT transformation assay. Fig. 1 shows that cell survival of CGC cultured for 7 DIV with 150 μ M NMDA or in a K25 medium was increased by 75% and 105% as compare to cells grown in a K5 medium, respectively.

Effect of NMDA, K25, and KCl Deprivation on HSP-70 Levels. The levels of HSP-70 and HSP-25 were measured in cells grown in K5, K25 or 150 μ M NMDA during 2–7 DIV (Fig. 2). In control neurons (K5) a constitutive expression of HSP-70 was found from 2 DIV. In these cells, a band of approximately 72 kD showed a marked increase with time in culture (Fig. 2A), reaching an increase of 182.1% at 5 DIV and 220.7% at 7 DIV as compared to 2 DIV when measured densito-

metrically (not shown). On the other hand, cells treated with NMDA or K25 from 2 DIV also showed a constitutive expression of HSP-70, which did not change with time and was significantly lower than K5 cells after 5 DIV (Fig. 2A). In contrast, neither age in culture nor NMDA treatment significantly alter the expression of HSP-25 (Fig. 2C).

When cells cultured for 7 DIV in a K25 medium were changed to a K5 medium, the levels of HSP-70 were markedly raised by 215% at 6h, 253% at 12h and 203% at 24 h after change of medium (Fig. 3) as compare to cells grown in a K25 medium and switched to a K25 medium. Under these conditions, more than 60% of CGC die within 2 days with characteristics of apoptosis (not shown), as previously reported (13,15,16,46).

Effect of ETOH and Thermal Stress on HSP-70 Levels. When CGC cultured for 2 DIV in a K5 medium were subjected to stressing conditions like 0.15 mM ETOH for 1 h or a thermal stress (41°C by 1 h) a marked increase of 70% in HSP-70 levels was observed after 24 h (Fig. 2B). HSP-25 was also increased by ethanol treatment under the same conditions, but this change

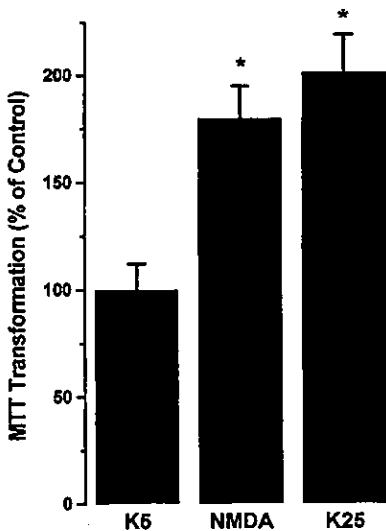


Fig. 1. Effect of NMDA and K25 treatment on the survival of cerebellar granule neurons. Results are expressed as percent of control (K5). Bars are means \pm SEM of 3 separated experiments. The asterisks indicate a significant difference ($p < 0.05$) from the K5 medium.

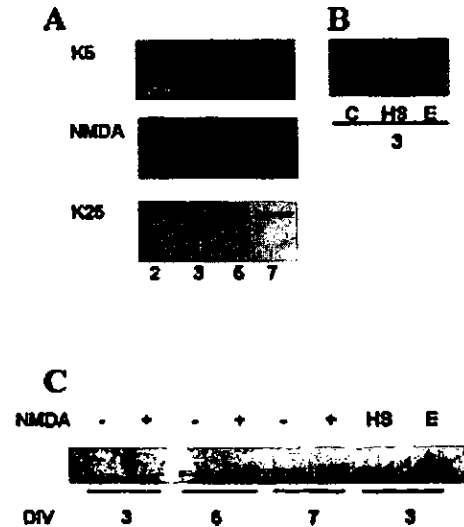


Fig. 2. Effect of NMDA on the levels of HSP-70 and HSP-25 in CGC. Homogenates from neurons cultured in K5, K25 or stimulated with NMDA at 2 DIV were processed for Western blot at the indicated ages as described in methods. A: Left panel shows HSP-70 levels in CGC grown in K5 or 150 μ M NMDA at the indicated times. Right panel shows the induction of HSP-70 after 24 h of treatment with ethanol (E) (0.15 M; 24 h) or heat shock (HS) (41°C, 1 h). B: Immunoblot of HSP-25 from cells grown in a K5 medium (-) or stimulated with 150 μ M NMDA (+) from 2 DIV.

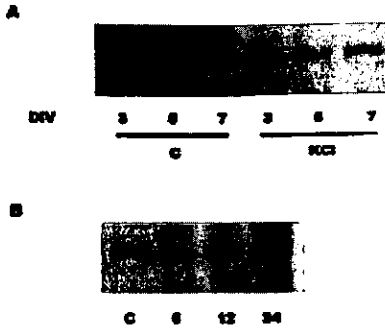


Fig. 3. Effect of KCl reduction on the levels of HSP-70 in CGC. Cells are cultured in a K25 medium for 8 DIV and then replaced by another containing K5. Homogenates from these cells were obtained at the indicated times and processed for Western blot and the levels of HSP-70 were immunodetected as described in methods. Control (C) were cells changed from K25 to a K25 medium.

was less marked (20%) than that observed for HSP-70 (not shown).

Effect of Heat Shock and Ethanol on CGC Survival.

To evaluate a possible participation of HSP in the survival of CGC, cultures grown in a K5 medium were exposed to different inducers of cellular stress response, like heat shock and ethanol, and survival was measured at 7 DIV. Cell survival did not show any significant change when cultures were heated to 40°C (Fig. 4A) or 41°C (Fig. 4B) by one hour at 2–6 DIV. Similarly, when cells cultured in a K25 medium during 7 DIV were heated at 40 or 41°C for 1 h and after 8 h switched to a K5 medium, CGC survival was not increased after 24–48 h (not shown). On the other hand, cells cultured in a K5 medium and chronically exposed to ETOH (0.01–0.075 M) at 2 DIV, did not alter their survival at 7 DIV (Fig. 5A). Higher ETOH concentrations resulted toxic for CGC chronically treated (Fig. 5A). To avoid a toxic effect of ETOH, we treated cells for shorter periods of time (1 and 3 h) and with higher ETOH concentrations (0.15–1.2 M), a condition which induce stress protein expression (29), particularly HSP-70 (Fig. 5). However, under these conditions only 1-h treatment with 0.15 M ethanol induced a slight increase of CGC survival (Fig. 5B).

DISCUSSION

There are many examples in a variety of cell types in which a previous mild stress protects cells against a

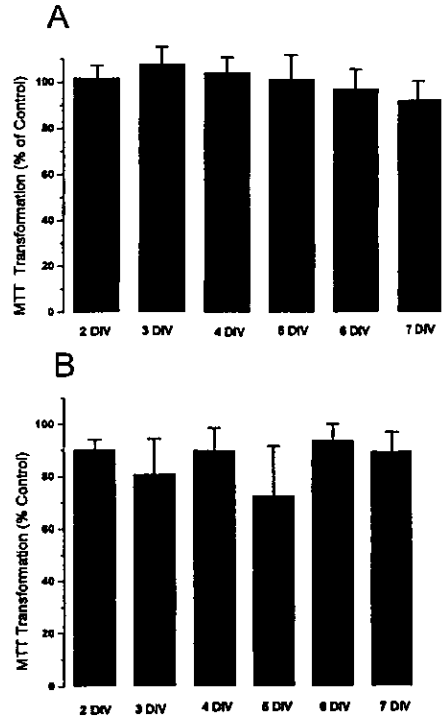


Fig. 4. Effect of thermal stress on the survival of cerebellar granule cells. Cells were cultured in a K5 medium and cell survival was estimated as MTT transformation at 7 DIV as detailed in Methods. Cultures were heated for 1 h and then returned to 37°C at the indicated ages. A: Cells heated at 40°C. B: Cells heated at 41°C. Results are expressed as percent of control (untreated cells). Bars are means \pm SEM of 3 separated experiments.

subsequent more severe stimuli (31). It is well known that a mild stress is able to induce the expression of some proteins, which act as chaperonins that contribute to reduce the adverse conditions that could lead to cell damage and ultimately cell death (Reviewed in 17). One of these proteins, HSP-70, can be induced by different stimuli like heat and alcohol (17,29,32). In neurons, heat shock has been shown to protect against a subsequent damage by light (33), ischemia (34), glutamate neurotoxicity (22,35) or serum-deprivation (32). In most of these studies the protecting effect has been correlated to an increase in the synthesis of members of the HSP family (35–39). Besides, HSP expression can

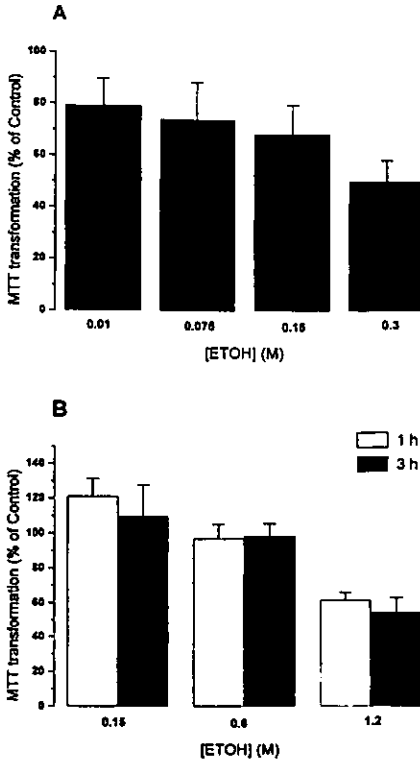


Fig. 5. Effect of ethanol exposure on cerebellar granule cells survival. Cells were cultured in a K5 medium and cell survival was estimated as MTT transformation at 7 DIV as detailed in Methods. A: Chronic treatment. Different concentrations of ethanol were added to the cultures daily from 2 DIV to 5 DIV and survival was measured at 7 DIV. B: Effect of acute ethanol treatment. Cells were exposed by one (empty bars) or three hours (black bars) at the indicated concentrations of ethanol and then the medium was changed by fresh medium. The medium in control cells was also changed. Results are expressed as percent of control (untreated cells). Bars are means \pm SEM of 3 separated experiments.

also be related to a severe intracellular damage, probably as a result of extreme stress conditions, particularly when this increase appear near in time to cell death. (38,40,41).

In this study we found a constitutive expression of HSP-70 and HSP-25 in homogenates from CGC grown in K5 medium from 2 DIV, a condition leading to apoptotic cell death. Among the HSP measured, only HSP-

70 levels were increased with time in culture in CGC maintained in a K5 medium. This observation was further confirmed when we found that the levels of HSP-70 were also markedly increased in CGC transferred from a K25 to a K5 medium at 8 DIV. These findings therefore do not support the idea that HSP-70 could contribute in the rescue of CGC from apoptotic cell death and are in agreement with other studies showing increases in HSP-70 during apoptotic cell death (42,43, 44). The observed increase in the levels of HSP-70 during this process could be the result of a stressing condition leading to cell death without any contribution to the process of apoptosis itself. Alternatively, this increase could be the result of the participation of HSP70 as an active component in the machinery of apoptosis designed to contribute to the organization of the cellular material before and during the process of death. The early increase in time of HSP-70 (about 3 DIV), when no detectable morphological alteration of CGC is observed, rather supports the last possibility. However further experimental evidence is necessary to clarify this suggestion.

Another observation from this study was that NMDA and K25 stimulation, which promote cell survival in CGC, did not modify the expression of HSP-70 nor HSP-25 with time in culture (2-7 DIV). HSP-70 levels were similar or lower than those observed in K5 cells at all ages studied. Again, these results point out to the suggestion that HSP-70 is not involved in the protection of CGC during apoptosis and strongly support the idea that NMDA and KCl are not acting through HSP-70 to rescue CGC from death. An explanation for the observed lower HSP-70 levels in NMDA and K25 than in K5 conditions could be that CGC chronically depolarized are healthier and less stressed than those in K5. It is known that during development chaperonins are required for the transport, translocation and folding of proteins (17). Thus, the constitutive and constant expression of HSP-70 observed when these cells are stimulated with NMDA/K25 could be the result of the process of synthesis and organization of proteins as part of the differentiation induced by NMDA and K25 in CGC. Others and we have shown that both KCl and NMDA stimulation not only promote cell survival, but also induce a marked process of differentiation in cultured. This process includes the expression of synaptic receptors, expression and activation of neurotransmitter synthesizing enzymes, among others (1,3,4,12,16,30).

A recent study showed that in neuronal cells, both HSP-70 and 90 did not protect cells from apoptosis (37). It is possible then, that other HSPs than HSP-70 could be involved in the rescue of apoptotic cell death.

However, when apoptotic CGC were subjected to two different conditions known to increase HSPs, like thermal and ethanol stress, cell survival was not affected. Thus, other induced HSPs are not probably involved in the survival of CGC during this time of development. These results do not agree with a study carried out in neurons (32) in which different inducers of HSPs protected from apoptosis evoked by serum-deprivation. This discrepancy could be due to the different cell types studied, but mainly to the signals inducing apoptosis. This is supported by Buzzard et al (45) who showed that HSP could protect from apoptosis induced by some stimuli, but not all of them.

Others and we (16,46) have found an activation of caspase-3 in CGC cultured in a K5 medium. This protease is a conspicuous member of the cysteine proteases family involved in apoptosis (16,46,47). Recently, it has been suggested a relationship between HSP-70 and caspase-3 in apoptosis (45,48). However, although the mechanisms responsible for the apoptotic cell death in CGC by lack of depolarization is similar to others involving similar pathways (i.e. caspase-3) no involvement of HSP-70 was found.

In conclusion, we found that during apoptotic cell death of CGC there is an increase in the levels of HSP-70 and that NMDA and KCl stimulation do not modify the expression of HSP-70 during this period of time. These results, together with the fact that ethanol or thermal stress do not rescue CGC from death, suggest that HSP do not participate in the protective action of NMDA and KCl.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by PAPIIT-UNAM (IN202097; JM), CONACYT (25521N; JM) and PADEP (project-030501; SA). The authors thank the excellent technical assistance of Miss Andrea Caballero, Ms. Guadalupe Domínguez, and Mr. Jorge Sepúlveda.

REFERENCES

- Davies, A. M. 1988. Role of neurotrophic factors in development. *Trends Genetics* 4:139-143.
- Oppenheim, R. W. 1991. Cell death during development of the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 14:453-501.
- Balázs, R., Jørgensen, O. S., and Hack, N. 1988. N-methyl-D-aspartate promotes the survival of cerebellar granule cells in culture. *Neuroscience* 27:437-451.
- Balázs, R., Hack, N., and Jørgensen O. S. 1988b. Stimulation of the N-methyl-D-aspartate receptor has a trophic effect on differentiating cerebellar granule cells. *Neurosci. Lett.* 87:80-86.
- Morán, J., and Patel, A. J. 1989. Effect of potassium depolarization on phosphate-activated glutaminase activity in primary cultures of cerebellar granule neurons and astroglial cells during development. *Dev. Brain. Res.* 46:97-105.
- Morán, J., and Patel, A. J. 1989. Stimulation of the N-methyl-D-aspartate receptor promotes the biochemical differentiation of cerebellar granule neurons and not astrocytes. *Brain Res.* 486:15-25.
- Didier, M., Roux, P., Piechaczyk, M., Mangeat, P., Devilliers, G., Bockaert, J., and Pin, J. P. 1992. Long-term expression of the c-fos protein during *in vitro* differentiation in cerebellar granule cells induced by potassium or NMDA. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 12:249-258.
- Sakurai, H., Kurusu, R., Sano, K., Tsuchiya, T., and Tsuda, M. 1992. Stimulation of cultured cerebellar granule cells via glutamate receptor induces TRE- and CRE- binding activities mediated by common DNA-binding complexes. *J. Neurochem.* 59:2067-2075.
- Bulleit, R. F., Cui, H., Wang, J. C., and Lin, X. 1994. NMDA receptor activation in differentiating cerebellar cell cultures regulates the expression of a new Pou gene, CNS-1. *J. Neurosci.* 14:1584-1595.
- Grayson, D. R., Szekely, A. M., and Costa, E. 1990. Glutamate-induced gene expression in primary cerebellar neurons. Pages 185-202, *in* Guidotti A (ed): Neurotoxicity of Excitatory Amino Acids, Raven Press, New York.
- Balázs, R. 1992. NMDA treatment and K⁺-induced depolarization selectively promote the expression of an NMDA-preferring class of the ionotropic glutamate receptors in cerebellar granule neurons. *Neurosci. Lett.* 137:109-113.
- Morán, J., and Rivera-Gaxiola, M. 1992. Effect of potassium and NMDA on the aspartate aminotransferase activity in cultured cerebellar granule cells. *J. Neurosci. Res.* 33:239-247.
- D'Mello, S. R., Galli, C., Ciotti, T., and Calissano, P. 1993. Induction of apoptosis in cerebellar granule neurons by low potassium: inhibition of death by insulin-like growth factor I and cAMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:10989-10993.
- Morán, J., Domínguez, G., and Alavez, S. 1996. NMDA receptor activation and apoptotic death of cultured cerebellar granule neurons. *Bol. Estud. Med. Biol.* 44:49-51.
- Galli, C., Meuccio, O., Scorziello, A., Werge, T. M., Calissano, P., and Schettini, G. 1995. Apoptosis in cerebellar granule cells is blocked by high KCl, forskolin and IGF-1 through distinct mechanism of action: the involvement of intracellular calcium and RNA synthesis. *J. Neurosci.* 15:1172-1179.
- Morán, J., Itho, T., Reddy, U. R., Chen, M., Alnemri, E., and Pleasure, D. 1999. Caspase-3 expression by cerebellar granule neurons is regulated by calcium and cyclic AMP. *J. Neurochem.* 73:568-577.
- Morimoto, R. I., Sargies, K. D., and Avravya, K. 1992. Transcriptional regulation of heat shock genes. *J. Biol. Chem.* 267(31):21987-21990.
- Miller, E., Raese, J. D., and Morrison-Bogorad M. 1991. Expression of heat shock protein 70 messengers RNAs in rat cortex and cerebellum after heat shock or amphetamine treatment. *J. Neurochem.* 56:2060-2071.
- González, M. F., Shiraishi, K., Hisanaga, K., Sagar, S. M., Mandabach, M., and Sharp, F. R. 1989. Heat shock proteins as markers of neural injury. *Mol. Brain Res.* 6:93-100.
- Vass, K., Berger, M. L., Novak, T. S. J., Welch, W. J., and Lassman, H. 1989. Induction of stress protein HSP-70 in nerve cells after status epilepticus in the rat. *Neurosci. Lett.* 100:259-264.
- Simon, R., Cho, H., Gwinn, R., and Lowenstein, D. 1991. The temporal profile of 72 kd heat shock protein expression following global ischemia. *J. Neurosci.* 11:881-889.
- Rodorf, G., Koroshetz, W. J., and Bonventre, J. V. 1991. Heat shock protects cultured neurons from glutamate toxicity. *Neuron.* 7:1043-1051.
- Kavakov, A. E., and Gabai, V. L. 1994. Heat shock proteins maintain the viability of ATP-depleted cells: what is the mechanism? *Trends In Cell. Biol.* 4:193-195.
- Aloia, F., Ciotti, M. T., and Levi, G. 1985. Characterization of GABAergic neurons in cerebellar primary cultures and selective neurotoxicity of a serum fraction. *J. Neurosci.* 5:2001-2008.

25. Gallo, G., Ciotti, M. T., Aloisi, F., and Levi, G. 1986. Developmental features of rat cerebellar neural cells cultured in a chemically defined medium. *J. Neurosci. Res.* 15:289-301.
26. Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
27. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature.* 227:680-685.
28. Mossman, T. 1983. Rapid colorimetric assay of cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 65:55-63.
29. Neuhäus-Steinmetz, U., Xu, C., Fracella, F., Oberheitmann, B., Richter-Landsberg, C., and Resing, L. 1994. Heat shock response and cytotoxicity in C6 rat glioma cells: Structure-activity relationship of different alcohols. *Mol. Pharmacol.* 45:36-41.
30. Gallo, V., Kingsbury, A., Balázs, R., and Jorgensen, O. S. 1987. The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J. Neurosci.* 7:2203-2213.
31. Yellon, D. M., and Lachman, D. S. 1980. Stress proteins in myocardial protection. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 24:113-124.
32. Mailhos, C., Howard, M. K., and Latchman, D. S. 1993. Heat shock protects neuronal cells from programmed cell death by apoptosis. *Neuroscience.* 55:621-627.
33. Barbe, M., Tytell, M., Gover, D., and Welch, W. 1988. Hyperthermia protects against light damage in the rat retina. *Science.* 241:1817-1820.
34. Chopp, M., Chen, H., Ho, K. L., Dereski, M. O., Brown, E., Hetzel, F. W., and Welch, K. M. 1989. Transient hyperthermia protects against subsequent forebrain ischemic cell damage in the rat. *Neurology.* 39:1396-1398.
35. Lowenstein, D. H., Chart, P. H., and Miles, M. F. 1991. The stress protein response in cultured neurons: characterization and evidence for a protective role in excitotoxicity. *Neuron.* 7:1053-1060.
36. Lindquist, S. 1988. The heat shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* 22:631-677.
37. Mailhos, C., Howard, M. K., and Latchman, D. S. 1994. Heat shock proteins hsp90 and hsp70 protect neuronal cells from thermal stress but not from programmed cell death. *J. Neurochem.* 63(5):1787-1795.
38. Cumming, D. V., Heads, R. J., Brand, N. J., Yellon, D. M., and Latchman, D. S. 1996. The ability of heat stress and metabolic preconditioning to protect primary rat cardiac myocytes. *Basic. Res. Cardiol.* 91(1):79-85.
39. Freyaldenhoven, T. E., and Ali, S. F. 1997. Role of heat shock proteins in MPTP-induced neurotoxicity. *Ann-N-Y-Acad-Sci.* (15)825:167-178.
40. Mehlen, P., Shulze-Osthoff, K., and Arrigo, A. P. 1996. Small stress proteins as novel regulators of apoptosis. Heat shock protein 27 blocks Fas/APO-1- and staurosporine-induced cell death. *J. Biol. Chem.* 271(28):16510-4.
41. Gordon, S. A., Hoffman, R. A., Simmons, R. L., and Ford, H. R. 1997. Induction of the heat shock protein 70 protects thymocytes against radiation-induced apoptosis. *Arch. Surg.* 132(12):1277-1282.
42. Chant, I. D., Rose, P. E., and Morris, A. G. 1996. Susceptibility of AML cells to in vitro apoptosis correlates with heat shock protein 70 (hsp 70) expression. *Br. J. Haematol.* 93(4):898-902.
43. Edwards, M. J., Walsh, D. A. and Li Z. 1997. Hyperthermia, teratogenesis and the heat shock response in mammalian embryos in culture. *Int. J. Dev. Biol.* 41(2):345-358.
44. Imuta, N., Ogawa, S., Maeda, Y., Kuwabara, K., Hori, O., Ueda, H., Yanagihara, T., and Tohyama, M. 1998. Induction of 72-kD Inducible Heat shock protein (HSP-72) in cultured rat astrocytes after energy depletion. *J. Neurochem.* 70(2):550-557.
45. Katayama, S., Shuntoh, H., Matsuyama, S., and Tanaka, C. 1994. Effect of heat shock on intracellular calcium mobilization in neuroblastoma X glioma hybrid cells. *J. Neurochem.* 62(6):2292-2299.
46. Schultz, J. B., Weller, M., and Klockgether, T. 1996. Potassium deprivation-induced apoptosis in cerebellar granule neurons: a sequential requirement for new mRNA and protein synthesis, ICE-like protease activity and reactive oxygen species. *J. Neurosci.* 16:4696-4706.
47. Buzzard, K. A., Giaccia, A. J., Killender, M., and Anderson, R. L. 1998. Heat shock protein-72 modulates pathways of stress-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 273 (27):17147-17153.
48. Alavez, S., Gutierrez-Kobeh, L., and Morán, J. 1996. Characterization of the activation of glutaminase induced by N-Methyl-D-Aspartate and potassium in cerebellar granule cells. *J. Neurosci. Res.* 45:637-646.

PAPEL DE BCL-2, BAX Y CITOCROMO-C EN LA SOBREVIVENCIA DE LAS CÉLULAS GRANULARES DE CEREBELO EN CULTIVO

Los resultados correspondientes a este apartado se describen en el manuscrito siguiente: **ROLE OF BCL-2, BAX AND CYTOCHROME-C IN THE SURVIVAL OF CEREBELLAR GRANULE CELLS**

Bcl-2 y Bax son dos de las principales moléculas involucradas en el control de muerte apoptótica en una gran variedad de tipos celulares, incluyendo el SN. Recientemente se ha propuesto que la liberación del citocromo-c al citosol es un evento importante en este proceso de muerte. El citocromo-c forma parte de un complejo capaz de activar a la caspasa-9, iniciando así la activación de una vía de caspasas. En este trabajo se explora el papel de estas moléculas reguladoras del proceso apoptótico en la muerte de las CGC bajo condiciones no despolarizantes y en la sobrevivencia inducida por NMDA y KCl en estas células.

Los resultados de este trabajo sugieren que Bcl-2 y Bax no participan en el proceso de muerte inducido por privación de estimulación despolarizante, pero Bcl-2 podría participar en el rescate inducido por NMDA y KCl. Las CGC parecen presentar una regulación diferencial del proceso de muerte inducido por la privación de estimulación despolarizante en función al estado de maduración en cultivo. Así, las CGC inmaduras no liberan citocromo-c ni presentan un incremento significativo de caspasa-9; mientras que las CGC consideradas maduras, liberan una pequeña fracción de citocromo-c que puede asociarse a un incremento en la actividad de caspasa-9. En ambos casos, existe una clara actividad de caspasa-3 asociada al proceso de muerte. La actividad de esta caspasa puede ser inhibida por la NMDA y KCl en CGC inmaduras.

ROLE OF BCL-2, BAX AND CYTOCHROME-C IN THE SURVIVAL OF CEREBELLAR GRANULE CELLS

Alavez S., Pedroza D. and Morán J.

Institute of Cell Physiology, National University of Mexico, Mexico City, Mexico

ABSTRACT

Cerebellar granule cells (CGC) cultured under 5mM KCl (K5) undergo apoptosis after 5 days *in vitro* (DIV). CGC death is reduced by chronic treatment with 25 mM KCl (K25) or NMDA. Also, when CGC cultured for 6-8 DIV in K25 are transferred to a K5 medium, cells die apoptotically. On the other hand, Bcl-2 and Bcl-xL protect neurons from apoptosis, while Bax and Bcl-xS may act as proapoptotic proteins. It is suggested that these members of the Bcl-2 family may be involved in the control of cytochrome-c release to the cytosol. Cytochrome-c is able to form a complex with other proteins to activate a cascade of proteases. In this work, we found that Bcl-2 levels in K5 cells did not show any change during 2-7 days *in vitro* (DIV); but cells grown with NMDA and K25 displayed an increase (55% approximately) of Bcl-2 from 4 DIV, as compared to control. Bax levels showed a clear tendency to increase with age in control cells and NMDA/K25 induced a reduction of approximately 10% in Bax levels from 4 DIV. On the other hand, in cells maintained in K25 during 7 DIV and then switched to a K5 medium, the levels of Bax showed an unexpected and consistent decrease (30% after 8 h). Under these conditions the Bcl-2 levels did not show any significant change after 24 h. Cytochrome c levels were unaffected under K5, NMDA and K25. Just a marginal increase, at 6 h after switching, was detected in the cytosol. We also found that caspase-9 is only activated under K25-deprivation but caspase-3 is involved in both experimental protocols. These results suggest that Bcl-2 and Bax are involved in CGC death induced by K5. These proteins could regulate this process in a different manner depending on the experimental paradigm.

Running title: Role of Bcl-2, Bax and cytochrome c in cerebellar granule neurons survival

INTRODUCTION

It has been suggested that during development, once the appropriate neuronal interconnections are completed, the redundant neurons are eliminated by an intrinsic program of cell death called apoptosis (Oppenheim, 1993). Apoptosis can be recognized from other types of death like necrosis by some morphological and biochemical parameters that include: cell rounding and shrinking, formation of apoptotic bodies, nuclear condensation, DNA fragmentation into nucleosomal-size fragments, loss of mitochondrial function, translocation of phosphatidylserine, etc. (Kerr and Harmon, 1993; Nijhawan et al., 2000). A large variety of molecules are involved in apoptosis by acting as antiapoptotic or proapoptotic elements. It has been proposed that the initiation and execution phases of apoptosis are controlled by a sequential cascade of activation of cysteine proteases termed caspases that cleave substrates after specific aspartic acid residues. The family of caspases includes caspase-3 and -9, which act as effector and initiator proteases during apoptosis, respectively (Fernandes-Alnemri, et al., 1994; Martin and Green, 1995; Tewari et al., 1995; Postmantur et al., 1997). It has been suggested that cytochrome c (cyt-c) released to cytosol interacts with Apaf-1 and ATP forming a complex in mitochondria that activates caspase-9, which in turn activates other caspases like caspase-3. On the other hand, Bcl-2 has been implicated in the control of apoptosis under several pathological and physiological conditions, including development (reviewed in Adams and Cory, 1998). Bcl-2 is a small protein with a molecular weight of 25 kDa and is localized in the mitochondria, endoplasmic reticulum and nucleus. The overexpression of Bcl-2 decreases apoptotic death in a number of cell types including myeloid cells, lymphocytes (reviewed in Chao and Korsmeyer, 1998) and neurons (García et al., 1992; Allsopp et al., 1993).

Address correspondence and reprint request to:

Dr. Julio Morán
Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Apartado Postal 70-253
04510, México D.F., México
TEL (525) 622-5616
FAX (525) 622-5607
email: jmorán@ifisiol.unam.mx

The mechanism of neuroprotection of this protein is still unclear but it is suggested that Bcl-2 could reduce apoptosis by blockade of cyt-c release (Khuck et al., 1997; Yang et al., 1997). Other proteins of the Bcl-2 family with proapoptotic action include Bax, Bcl-xS, BAD and Bak. It has been shown that Bax translocate to mitochondria and undergo conformational changes upon several apoptotic stimuli (Wolter et al., 1997). Furthermore, recombinant Bax can elicit cyt-c release from mitochondria in intact cells (Krajowski et al., 1993). It is suggested that Bcl-2 can form a heterodimer with Bax blocking its proapoptotic action. So, the ratio Bcl-2/Bax may determine if the cell survives or dies following an apoptotic stimulus (Oltvai et al., 1993).

When cerebellar granule cells (CGC) are cultured chronically under physiological concentrations of potassium (5 mM; K5) for more than 5 days *in vitro* (DIV), cells die with biochemical and morphological features of apoptosis (D'Mello et al., 1993; Morán et al., 1996). It has been shown that the survival and differentiation of these cells in culture is markedly increased in the presence of high concentrations of potassium (25 mM KCl; K25) or agonists of glutamatergic receptors like NMDA (Gallo et al., 1987; Balázs et al., 1988a; Morán and Patel, 1989a,b). On the other hand, when CGC cultured in K25 during 6-8 DIV are transferred to a serum-free medium containing K5 most cells die after 24-48 h. CGC death induced by K5 shows characteristics of apoptosis, including DNA condensation and caspase-3 activation (D'Mello et al., 1993; Galli et al., 1995; Schulz et al., 1996; Armstrong et al., 1997; Morán et al., 1999; Valencia and Morán, 2001). It has been proposed that the action of NMDA in culture could mimic the glutamatergic innervation that CGC receives *in vivo* from mossy fibers by 12 postnatal day (P12) (Balázs et al., 1988b).

In this study we analyzed the possibility that NMDA and K25 stimulation rescues CGC cultured chronically in K5 from apoptotic cell death by regulating the expression or relocalization of bcl-2 and/or bax. We also explored the role of cyt-c release in the apoptotic death of CGC induced by K5. To assess this, we evaluated the levels of Bcl-2 and Bax in cells chronically treated with K5, K25 and NMDA (150 μ M). The

activity of caspase-3 and 9 as well as the levels of mitochondrial and cytosolic *cyt-c* were also analyzed under these conditions.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials

Fetal calf serum and penicillin/streptomycin were obtained from GIBCO (Grand Island, NY). Poly-L-lysine (molecular weight >300,000), trypsin, soybean trypsin inhibitor, DNAsa, NMDA and 3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) were obtained from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO). Reagents for gel electrophoresis (SDS-PAGE), nitrocellulose membranes, chemiluminescence kit for phosphatase alkaline-conjugated antibodies and molecular weight markers were purchased from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA). Polyclonal antibody for *Bcl-2*, *Bax* and anti-mouse alkaline phosphatase-conjugated were obtained from Santa Cruz (Santa Cruz, CA). Polyclonal antibody against horse cytochrome-c was a generous gift from Dr. Diego Gonzalez (Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Mexico). All other chemicals were of the purest grade available from regular commercial sources.

Cell Cultures

Cerebellar granule neurons were obtained as previously described by Morán and Patel (1989a,b). Briefly, the dissociated cell suspensions from the cerebellum of 8-day-old rats were plated at a density of 265×10^3 cells/cm² in plastic dishes previously coated with poly-L-lysine (5 µg/ml). The culture medium contained basal Eagle's medium supplemented with 10 % heat-inactivated fetal calf serum, 2 mM glutamine, 50 U/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin. The culture dishes were incubated at 37 °C in a humidified 5 % CO₂/95 % air atmosphere. Granule neurons were added with cytosine arabinoside (10 µM) at approximately 20 h after seeding. Granule cells were grown in the presence of 10 mM KCl instead of 5 mM to abolish the blockade by Mg²⁺ of NMDA receptor (Morán y Patel, 1989b). After 2 DIV, cells were treated with NMDA (150 µM) for 1-5 days. For the experiments with change of medium, granule cells were grown in presence of 25 mM of KCl. After 8 DIV, the medium was replaced with a serum-free medium containing 5 mM KCl. The enrichment of cultures in neurons was determined by immunostaining counting using polyclonal antibodies against neuron-specific enolase (Dakoparts, Carpinteria, CA) as marker for neurons and against Glial Fibrillar Acidic Protein (GFAP) for glial cells. Cultures contained about 95 % neurons from total number of cells and from those 90 % corresponded to glutamatergic granule cells. The remaining 5 % neurons represents GABAergic non-granule cells (stellate and basketed neurons) as previously demonstrated by release and immunohistochemical studies (Aloisi et al., 1985; Gallo et al., 1986).

Immunoblot

At different times after treatment, cells were rinsed twice with phosphate-buffered saline (PBS) at 37 °C, resuspended and sonicated in a homogenization buffer containing 25 mM Tris-HCl (pH 7.4), 50 mM NaCl, 2 % NP-40, 0.2 % SDS, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 10 µg/ml pepstatin, 50 µg/ml aprotinin and 10 µg/ml leupeptin at 4°C. The protein levels were determined by the method of Bradford (1976). Cell homogenates (40 µg protein per lane) were run under non-reducing conditions in a one dimensional 17 % SDS-PAGE (Laemmli, 1970) and then electroblotted onto PVDF membranes (Bio-Rad Laboratories) at 100 V for 1 h. Blots were then blocked with Tris-buffered saline/Tween 20 (TTBS) buffer (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, and 0.1 % Tween 20, pH 7.5) containing 5 % non fat dry milk powder for 3 h at 4 °C, washed three times with TTBS and incubated with the *Bcl-2*, *Bax* (1 µg/ml) or cytochrome-c

(1:250) polyclonal antibodies overnight. After further washing, the blots were incubated with alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG secondary antibody (1:1000) for 1 h at room temperature. After further washing, the blots were processed for visualization using the enhanced chemiluminescence system according to the manufacturer's recommendations (Bio-Labs, Inc.) and exposed to Kodak XAR-5 film. In some cases PVDF blots were completely stripped of the primary and secondary antibodies using a procedure described by Bio-labs. Briefly, blots were immersed in stripping buffer (100 mM 2-mercaptoethanol, 2.0% sodium dodecylsulphate, 62.5 mM Tris-HCl, 7.4) for 30 minutes at 50 °C. Following a series of rinses, some blots were re-probed with a different antibody using the method described above. This procedure allowed for the direct comparison of the expression of more than one protein in the same sample set. The images obtained were quantified by Image-J program.

CGC fractionation

At indicated times, cells were homogenized in 400 µl of fractionation buffer containing 0.3 M mannitol, 5 mM 3-[N-Morpholino]propanesulphonic acid (MOPS), 1 mM EGTA, 4 mM KH₂PO₄ added with protease inhibitors (1 mM PMSF, 10 µg/ml pepstatin, 50 µg/ml aprotinin and 10 µg/ml leupeptin) at 4 °C. After a brief sonication homogenates were centrifuged at 650 X g for 10 minutes at 4 °C and the resultant supernatant centrifuged at 10 000 X g at 4 °C for 45 minutes to sediment the mitochondria. The pellet was resuspended in 100 µl of fractionation buffer and the supernatant were centrifuged at 100 X g for 45 minutes at 4 °C. The supernatant is the cytosolic fraction.

MTT assay

MTT is converted to the blue formazan product only by metabolically active mitochondria, and the absorbance is directly proportional to the number of viable cells (Mossmann, 1983). MTT (0.5 mg/ml) was added to the cultures and the cells were incubated 1 h at 37 °C. After aspiration of the medium, 1 ml of dimethyl sulfoxide (DMSO) was used to solubilize the dark purple formazan compound formed during the incubation. Samples were read at a test wavelength of 570 nm and a reference wavelength of 630 nm. The data were calculated as the absorbance at 570 nm minus the absorbance at 630 nm and expressed as percentages of those control groups. Mitochondrial activity was tested at 7 DIV in the majority of the whole experiments.

Caspase-9 and caspase-3 activities

CGC were washed with PBS and then homogenized in lysis buffer. The homogenates were diluted 1:1 (vol/vol) with glycerol and stored at -70 °C. Caspase activities were assayed by a fluorometric method (Thornberry, 1994) in a luminescence spectrometer (Spectronic Instruments, SLM Aminco-Bowman, Rochester, NY) using the tetrapeptides acetyl-Leu-Glu-His-Asp-□-(4-methylcoumarinyl -7-amide) (Ac-LEHD-AMC) and acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-□-(4-methylcoumarinyl -7-amide) (Ac-DEVD-AMC) as substrates to detect caspase-9 and caspase-3, respectively. The reactions were followed by 15 min after addition of substrate (25 µM) and cell homogenate (30 mg/ml) in a standard solution of 100 mM N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid] (HEPES), 10 % (wt/vol) sucrose, 0.1 % (wt/vol) 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propane sulphate (CHAPS), 10 mM diethylenetriamine (DET), 1 mM PMFS, 2 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml pepstatin and 5 µg/ml leupeptin.

Statistical analysis

Results are expressed as mean ± SEM values, and statistical significance of the results was determined by one way analysis

of variance (ANOVA) followed by a Fisher's test. A value of $p < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Effect of NMDA, K25 and K25 deprivation on the survival of CGC in culture

CGC obtained from 8-day-old rats were cultured in a medium containing KCl 10 mM (K10), K10 plus NMDA 150 μ M or KCl 25 mM (K25). No apparent morphological differences were detected under any of these conditions during the first 72 h. After 4 DIV most of CGC grown in the presence of NMDA or K25 showed a large proportion of soma aggregates interconnected by thick neurites. After 5-7 DIV, in agreement with previous observations (Balázs et al., 1988a,b; Gallo et al., 1987), control cells (K10) exhibited a morphological deterioration characterized by thinness of neurites, cell detachment and neuronal death. In contrast, cultures treated with NMDA or K25 remained healthy for more than 8 DIV. The effect of NMDA and K25 on the viability of CGC was evaluated as MTT transformation (Fig. 1A). NMDA or K25 treatment showed an optimal effect on CGC survival at 2 DIV, when cell viability was maintained approximately 100% over control cells (K10).

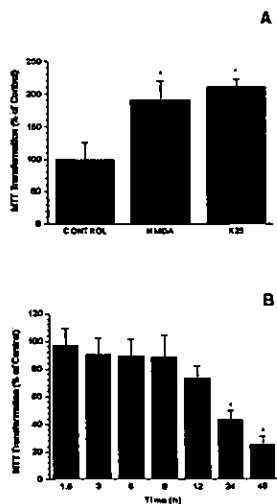


Fig. 1. Effect of NMDA and K25 and K25 deprivation on the CGC survival. Cerebellar granule neurons were prepared as described in Methods. In A cells were cultured in 10 mM KCl and after 2 DIV cultures were treated with 150 μ M NMDA or 25 mM KCl and cell survival was evaluated at 7 DIV as MTT transformation as described in Methods. Results are expressed as the percentage of cells grown in a K10 medium. In B, neurons were cultured with 25 mM KCl for 7 DIV and then medium was replaced by a serum-free medium containing 5 mM KCl and MTT transformation was measured at the indicated times. Results are expressed as the percentage of cells switched to a K25 serum-free medium. Bars are means of 4 separated experiments \pm SEM. The asterisks indicate a significant difference from the control.

When cells cultured with K25 for 8 DIV were transferred to a K5 serum-free (K5), cells die after 12-48 h (Fig. 1B). As it has been extensively documented (D'Mello et al.,

1993; Galli et al., 1995; Schulz et al., 1996; Armstrong et al., 1997; Morán et al., 1999; Valencia and Morán, 2001) the observed CGC death shows morphological characteristics of apoptosis (not shown). Figure 1B shows that K25 deprivation of CGC induces a reduction of approximately 55% and 75% of MTT transformation after 24 and 48 h, respectively.

Effect of NMDA and K25 stimulation on the Bcl-2 and Bax levels.

To explore the possible participation of Bcl-2 and Bax in the survival of CGC induced by depolarizing conditions, the levels of these proteins were measured by immunoblot in homogenates of cell cultures of 2-8 DIV which were treated with NMDA, K25 or K10 at 2 DIV (Fig. 2A). The presence of Bcl-2 was confirmed in control neurons by detecting a band of approximate 29 kDa with a polyclonal antibody for Bcl-2. The 29 kDa band did not show any appreciable change in homogenates from cultures of 2, 4, 6 or 8 DIV (Fig. 2A, upper panel). On the other hand, cells treated with 150 μ M NMDA showed an increase in Bcl-2 levels from 4 to 8 DIV, reaching a plateau (55%) at 6 DIV as compared to control cells (Fig. 2A, upper panel).

Bax was also detected by immunoblot in CGC and showed relatively higher levels in control cells at 2 DIV, which declined with time in culture until 8 DIV (Fig. 2A, lower

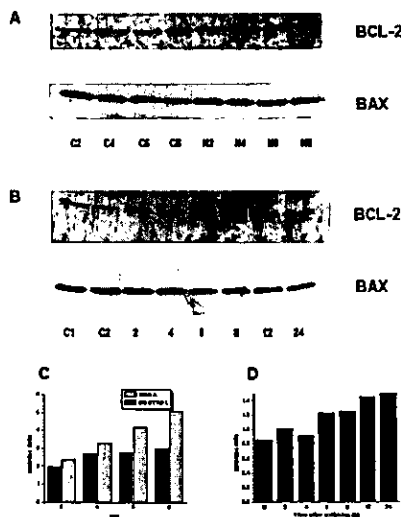


Fig. 2. Effect of NMDA and K25 on the Bcl-2 and Bax levels in CGC cultures. Cerebellar granule neurons were prepared as described in Methods. In A cells were cultured in 10 mM KCl (C) and after 2 DIV cultures were treated with 150 μ M NMDA (N) and cultures were processed at the indicated DIV to immunodetect Bcl-2 and Bax as described in methods. In B, neurons were cultured with 25 mM KCl for 7 DIV and then medium was replaced by a serum-free medium containing 5 mM KCl and cells were processed to immunodetect Bcl-2 and Bax at the indicated times after K5 treatment (2-24 h). Representative blots of 3 different experiments are shown in A and B. C) Densitometric analysis of immunoblots from homogenates of cells treated chronically with NMDA (C) or transferred to K5 (D) were expressed as Bcl-2/Bax ratio.

panel). NMDA treatment did not modified significantly this tendency at the times tested (2, 4, 6 and 8 DIV) (Fig. 2A, lower panel). Similar results for Bcl-2 and Bax levels were obtained when cells were treated with K25 (not shown).

In order to correlate the levels of Bcl-2 and Bax with cell death we calculated the Bcl-2/Bax ratio at different times in culture under different experimental conditions (Figure 2C). The Bcl-2/Bax ratio was similar at 2-4 DIV in control cells. In contrast, this ratio is markedly increased by NMDA treatment by about 80 % over control at 8 DIV (Fig. 2C).

Effect of K25 deprivation on the levels of Bcl-2 and Bax.

The expression of Bcl-2 and Bax was also studied by Western blot analysis in CGC cultured for 8 DIV in a K25 medium and then transferred to a K5 medium. Under these conditions Bcl-2 levels did not show significant changes at any time after switching (Fig. 2B, upper panel). On the other hand, Bax levels were gradually diminished with time after treatment with a K5 medium. Bax levels reduction was more pronounced after 6 h reaching a maximal decrease at 12 and 24 h as compared to control cells (Fig. 2B, lower panel). The observed Bax reduction in these cells was responsible of the increase in the Bcl-2/Bax ratio that shows a clear tendency to increase by 40 % at 12 and 24 h after switching (Fig. 2D).

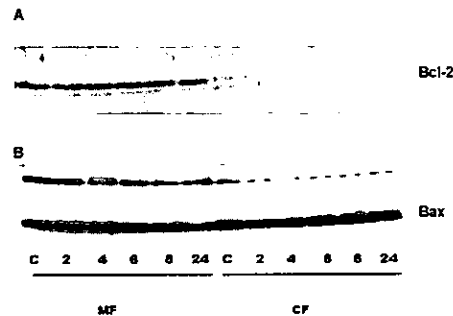


Fig. 3. Effect of K25 deprivation on the relocation of Bcl-2 and Bax. Subcellular fractions of homogenates of CGC cultured in K25 for 7 DIV and switched to a K5 medium were processed to immunodetect Bcl-2 (A) and Bax (B) at the indicated times. Representative blots of 3 different experiments are shown. MF, mitochondrial fraction; CF, cytosolic fraction.

We explored the possibility of a redistribution rather than a change in the levels of Bcl-2 and/or Bax in response to K25 deprivation, as it has been previously reported in other preparations (Wolter et al., 1997). Subcellular fractions of CGC grown in K25 for 7 DIV and then switched to a K5 medium were processed to detect the Bcl-2 and Bax levels by immunoblot analysis. Figure 3A shows that Bcl-2 is basically located in the mitochondrial fraction (MF) and that the protein does not seem to redistribute to cytosol with time after K5 treatment. On the other hand, Bax (Fig. 3B) was detected in both the mitochondrial and cytosolic fractions. In contrast to what we found for the total protein, using the fractionation procedure we detected a second band of higher molecular weight that could correspond to a modified form of Bax (Fig. 3B). We found that only a small fraction of both bands was

reduced in the mitochondrial fraction from 6 h concomitantly to a small tendency to increase in the cytosolic fraction. Although this could suggest a possible release of Bax from mitochondria to cytosol in response to K5 it seems not enough to explain the reduction in the total levels of the protein.

Effect of NMDA, K25 and K25 deprivation on cyt-c mitochondrial release

The participation of cyt-c in the apoptotic death of CGC was explored by measuring by immunoblot the levels of this protein in subcellular fractions of cells cultured chronically in K10 or cultured in K25 and transferred to K5. Figure 4A shows the presence of cyt-c in cells cultured in K10 for 3-7 DIV. A band of 17 kDa corresponding to cyt-c was detected in the cytosolic fraction. Cytosolic cyt-c was always less abundant than the cyt-c present in the mitochondrial fraction (Fig. 4A). The levels of cyt-c did not show any change as compare with NMDA in both the CF and MF with time in culture (Fig. 4A, upper panel). Similar results were observed when subcellular fractions were obtained from cells cultured with K10 plus 150 μ M NMDA for 3-7 DIV (Fig. 4A, lower panel). On the other hand, when CGC were cultured with K25 for 7 DIV and then transferred to K5, the levels of cyt-c in the CF and MF did not change markedly (Fig. 4B) although a small increase of cyt-c was observed in CF after 6 h concomitantly to a slight decrease of cyt-c in MF.

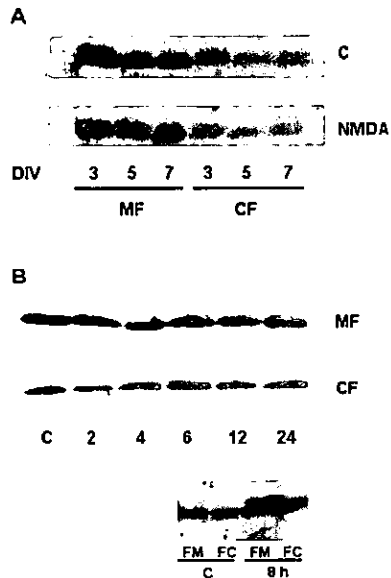


Fig. 4. Effect of NMDA, K25 and K25 deprivation on the relocation of cyt-c in CGC cultures. A) Subcellular fractions from CGC cultured in K10 (C) and K10 plus NMDA were processed at the indicated days in culture to immunodetect cyt-c as described in methods. B) Subcellular fractions from homogenates of CGC deprived of K25 were processed at the indicated hours after switching to immunodetect cyt-c. Inset: Subcellular fractions obtained from CGC grown in K25 for 7 DIV and then added with staurosporine (15 μ M) were processed at 0 (C) and 8 h after treatment to immunodetect cyt-c. Representative blots of 3 different experiments are shown. MF, mitochondrial fraction; CF, cytosolic fraction.

To test the ability of cyt-c to be released from mitochondria in this preparation we incubated the MF in the presence of digitonin (0.5%) and 10 μ M EGTA and we found that almost 90% of cyt-c present in this fraction was released to the soluble fraction (not shown). Besides, a significant release of mitochondrial cyt-c to the FC was observed in CGC treated for 8 h with 0.5 μ M staurosporine (Fig. 4, inset), which has been previously shown to induce cyt-c release in this (unpublished results) and other preparations (Kluck et al., 1997).

Effect of NMDA, K25 and K25 deprivation on the activity of caspases

The activity of caspase-9 and caspase-3 was measured fluorimetrically by using two substrates, IETD-AMC and DEVD-AMC, which are cleaved preferentially for caspase-9 and 3, respectively. Figure 5A shows that a basal activity of caspase-9 was detected in homogenates from CGC grown in K10 and that this activity was not significantly different during the time in culture (2-8 DIV). The activity of caspase-9 was not modified by NMDA or K25 (Fig. 5A). Under these conditions, the activity of caspase-3 in homogenates from cells grown in K10 was increased almost three times at 4 DIV and this increase was sustained until 6 DIV when the activity of the caspase was decreased (Fig. 5B). The treatment of CGC with NMDA and K25 markedly abolished this increase. However, under these depolarizing conditions, a little increase at 8 DIV was detected. As previously shown (Gerhardt et al., 2001), when cells grown in K25 were switched to a K5 medium, the activity of caspase-9 was increased about twice after 6h (Fig. 5C). Similarly, it was observed an increase in the activity of caspase-3 in this preparation after 8-12 h (Fig. 5D) in agreement to previous studies in this preparation (Armstrong et al., 1997; Morán et al., 1999).

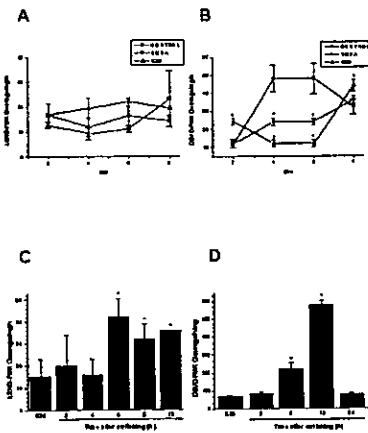


Fig. 5. Effect of NMDA, K25 and K25 deprivation on the activity of caspase-9 and caspase-3 in CGC cultures. Homogenates from CGC grown in K10, K10 plus NMDA and K25 were processed at the indicated day in culture to test caspase-9 (A) and caspase-3 (B). Results are expressed as mean \pm SEM of 3-5 experiments. Values are means of 4 separated experiments \pm SEM. The asterisks indicate a significant difference from the control. Homogenates from CGC deprived of K25 were processed at the indicated times in culture to test caspase-9 (C) and caspase-3 (D). Results are expressed as mean \pm SEM of 3-5 experiments. Bars are means of 4 separated experiments \pm SEM. The asterisks indicate a significant difference from the control.

DISCUSSION

Cerebellar granule cells suffer an apoptotic process when they are grown in K5 during 7 DIV (D'Mello et al., 1996; Morán et al., 1996). If these cells are chronically cultured with NMDA (150 μ M) or under depolarizing conditions like K25 the survival of the cultures is markedly increased (Balázs et al., 1988a,b; Gallo et al., 1987). On the other hand, when CGC grown in K25 for more than 5-6 DIV are transferred to a K5 medium, cells die apoptotically 24-48 h later (D'Mello et al., 1993; Galli et al., 1995; Schulz et al., 1996; Morán et al., 1999). Here, we confirmed these results and we studied the involvement of Bcl-2 and Bax in the apoptotic death of CGC induced by these conditions.

A large body of evidence suggest that Bcl-2 and Bax participate in apoptosis in different models however, limited information exists about the role of these proteins in the apoptotic death of CGC induced by K deprivation and whether they are regulated by NMDA or K25 treatment. We found a constitutive expression of Bcl-2 and Bax in CGC from 2 DIV. When these cells were cultured in a K5 medium, a condition leading to cell death, Bcl-2 levels were unaffected while Bax levels slightly decreased with time in culture. These results may suggest that Bax and Bcl-2 could not be directly involved in the regulation of the process of cell death observed in CGC under non-depolarizing conditions. In other preparations it has been proposed that the Bcl-2/Bax ratio could determine if cells survive or die after an apoptotic stimulus (Oltan et al., 1993; Yin et al., 1994). In contrast to these results, NMDA or K25 treatment, two conditions that rescue CGC from death, lead to a significant increase in Bcl-2 levels together with a decrease in Bax levels. The calculated Bcl-2/Bax ratio is significantly increased when cells are treated with NMDA or K25. Similarly, when neurons were deprived of depolarizing conditions after 7-day with K25, the levels of Bcl-2 showed a small increase concomitantly to a marked decrease in the levels of Bax. Thus, during CGC death induced by chronic or acute treatments there is occurs a decrease in Bax levels without a significant modification of Bcl-2. Different possibilities could explain the lack of correlation between the levels of both proteins and cell death. One possibility is a post-translational regulation of Bcl2 and/or Bax that could be involved in the regulation of the interaction of these proteins. Recently, Gleichmann and co-workers (1998) did not find any modification in the mRNA expression of several members of the Bcl-2 family in cells subjected to potassium deprivation. Another possibility is that CGC cell death could be determined by a mitochondrial relocation of Bax from cytosol in response to an apoptotic stimulus, as it has been recently proposed (Wolter et al., 1997; Gross et al., 1998). However, under our conditions we could not detect any redistribution of both Bcl-2 and Bax in CGC subject to a deprivation of depolarizing conditions (Fig. 3). A plausible possibility is that rather than a change in the levels or redistribution of these proteins, a change in the relationship with themselves and other proteins is occurring. Finally, the unexpected diminution in Bax levels under deprivation of depolarizing conditions it could be the result of proteases activation (e. g., calpain) associated with advanced events of cell death process. Thus, Bax and Bcl-2 could be acting in the death process by interacting as homo or heterodimers. It has been proposed that Bax is able to form homodimers or heterodimers with other members of the Bcl-2 family and elicit alterations in the mitochondrial homeostasis (Yin et al., 1994; Sedlack et al., 1995; Yang et al., 1998).

The difference observed in the protein levels of Bcl-2 and Bax in CGC chronically treated with K5 from those cultured in K25 and transferred to K5 could be explained in terms of cell maturation. It has been shown that K25 and NMDA stimulation promotes cell differentiation (Balázs et al., 1988a,b; Morán et al., 1989a,b; Alavez et al., 1996), inducing the expression of NMDA and GABA receptors, c-fos, POU domain, TRE- and CRE-binding activity, etc. (Grayson et al.,

1990; Balázs, 1992; Didier et al., 1992; Sakuray et al., 1992; Bulleit et al., 1994). This idea is in agreement with previous reports showing a differential response of "mature" and "immature" CGC to treatments with cytokines and neurotrophines (De Luca, 1996).

One of the consequences of the mitochondrial alterations during the apoptotic death is the release of cyt-c to the cytosol (reviewed in Reed, 1997; Cai et al., 1998). It has been proposed that the released cyt-c forms a complex with Apaf-1 and ATP, which activates caspase-9 (Zou et al., 1997) that in turn activates other executioner caspases like caspase-3 (Liu et al., 1996). An interesting observation of the present study was that no mitochondrial release of cyt-c was detected in CGC grown chronically in K5 (Fig. 4A). In cells grown in K25 and transferred to K5, we observed a reduction of cyt-c levels from mitochondrial fraction at early times simultaneously to a small increase in the cytosolic fraction. This result, however contrast with the observed effect of staurosporine that induces apoptosis in CGC as K5 does but induces an appreciable release of cyt-c (Fig. 4, inset). These results strongly suggest that apoptosis in "immature" CGC chronically treated with K5 is not mediated by cyt-c. Recent studies (Chauhan et al., 1997; Li et al., 1997; Tang et al., 1998; Adachi et al., 1998) suggest a cyt-c dependent and independent death that is determined by the cell type and the inductor of apoptosis. Our results about cyt-c are in agreement with the observed lack of activity of caspase-9 in CGC chronically grown in K5. Although no explanation for the observed basal activity of caspase-9 in K10 cells exist, we could speculate that it could be due to unspecific processing of the exogenous peptide an/or to caspase activation in other cell like astrocytes. Whatever the explanation is, it can be concluded that it is not related to the observed death in CGC because it was not markedly modulated with time in culture and, more importantly, it was not modified by NMDA or K25 treatment. In contrast, the activity of caspase-9 was increased in CGC transferred from K25 to K5 in accordance to the observed release of cyt-c. Under both conditions the process involved the activation of caspase-3, as it was previously shown for the switching model (D'Mello et al., 1993; Galli et al., 1995; Morán et al., 1999).

In conclusion, the events triggered by non-depolarizing conditions to induce apoptosis in CGC, depends of the time in culture. We have seen that, under non-depolarizing conditions, CGC cultures show a down-regulation of Bax. We have also seen that the apoptotic process in "immature" CGC is independent of cytochrome c release and this result is supported by the lack of caspase-9 activation suggesting the participation of other initiator caspases to activate caspase-3. On the other hand, in "mature" CGC the regulation of Bcl-2/Bax seems not to be related to the control of apoptosis in these cells. Also, the apoptotic process in "mature" CGC seems independent on cytochrome c release. However, it is not clear if this small increase is sufficient to the caspase-9 activation detected in "mature" neurons under deprivation of depolarizing conditions. Finally, the apoptotic process observed in "mature" and "immature" CGC involved the activation of caspase-3. It is possible that the degree of maturation of CGC could be critical to regulate the mechanisms responsible for the apoptotic death of cultured CGC.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by PADEP-UNAM (030501; SA) and grants from PAPIIT-UNAM (IN203400; JM) and Conacyt (25521N; JM). SA was supported by a DGAPA-UNAM scholarship. The authors thank the excellent technical assistance of Ms. Guadalupe Domínguez, Miss Andrea Caballero, and Miss Miriam Vázquez.

REFERENCES

- Adachi, S., Gottlieb, R.A., 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. *Journal of Biological Chemistry* 273, 19892-19894.
- Adams, J.M., Cory, S., 2001. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends in Biochemical Sciences* 26, 61-66.
- Alavez, S., Gutierrez-Kobeh, L., Morán, J., 1996. Characterization of the activation of glutaminase induced by N-Methyl-D-Aspartate and potassium in cerebellar granule cells. *Journal of Neuroscience Research* 45, 637-646.
- Allsopp, T.E., Kiselev, S., Wyatt, S., Paterson, H.F., Davies, A.M., 1993. The proto-oncogene bcl-2 can selectively rescue neurotrophic factor-dependent neurons from apoptosis. *Cell* 73, 295-307.
- Aloisi, F., Ciotti, M.T., Levi, G., 1985. Characterization of GABAergic neurons in cerebellar primary cultures and selective neurotoxicity of a serum fraction. *Journal of Neuroscience* 5, 2001-2008.
- Armstrong, R., Aja, T., Hoang, K., Gaur, S., Bai, X., Alnemri, E., Litwack, G., Karanewsky, D., Fritz, L., Tomaselli, K., 1997. Activation of the CED3/ICE-related protease CPP32 in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis but not necrosis. *Journal Neuroscience* 17, 553-562.
- Balázs, R., 1992. NMDA treatment and K⁺-induced depolarization selectively promote the expression of an NMDA-preferring class of the ionotropic glutamate receptors in cerebellar granule neurons. *Neuroscience Letters* 137, 109-113.
- Balázs, R., Hack, N., Jorgensen O.S., 1988b. Stimulation of the N-methyl-D-aspartate receptor has a trophic effect on differentiating cerebellar granule cells. *Neuroscience Letters* 87, 80-86.
- Balázs, R., Jorgensen, O.S. and Hack N., 1988a. N-methyl-D-aspartate promotes the survival of cerebellar granule cells in culture. *Neuroscience* 27, 437-451.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Bulleit, R.F., Cui, H., Wang, J.C., Lin, X., 1994. NMDA receptor activation in differentiating cerebellar cell cultures regulates the expression of a new Pou gene, CNS-1. *Journal of Neuroscience* 14, 1584-1595.
- Cai, J., Yang, J., Jones D.P., 1998. Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. *Biochimica et Biophysica Acta* 1366, 139-149.
- Chao, D., Korsmeyer, S., 1998. Bcl-2 family: regulator of cell death. *Annual Review of Immunology* 16, 395-419.
- Chauhan, D., Pandey, P., Ogata, A., Teoh, G., Krett, N., Halgren, R., Rosen, S., Kufe, D., Kharbanda, S., Anderson, K., 1997. Cytochrome c-dependent and independent induction of apoptosis in multiple myeloma cells. *Journal of Biological Chemistry* 272, 2995-2997.
- D'Mello, S.R., Galli, C., Ciotti, T., Calissano, P., 1993. Induction of apoptosis in cerebellar granule neurons by low potassium: inhibition of death by insulin-like growth factor I and cAMP.

Proceedings of the National Academy of Sciences of USA 90, 10989-10993.

De Luca, A., Weller, M., Frei, K., Fontana, A., 1996. Maturation-dependent modulation of apoptosis in cultured cerebellar granule neurons by cytokines and neurotrophins. *European Journal Neurosciences* 8, 1994-2005.

Didier, M., Roux, P., Piechaczyk, M., Mangeat, P., Devillers, G., Bockaert, J., Pin, J.P., 1992. Long-term expression of the c-fos protein during in vitro differentiation in cerebellar granule cells induced by potassium or NMDA. *Brain Research. Molecular Brain Research* 12, 249-258.

Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G., Alnemri, E. S., 1994. CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Journal of Biological Chemistry* 269, 30761-30764.

Galli, C., Meuccio, O., Scorziello, A., Werge, T.M., Calissano, P., Schettini, G., 1995. 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. *Journal of Neuroscience* 15, 1172-1179.

Gallo, V., Kingsbury, A., Balázs, R., Jorgensen, O.S., 1987. The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *Journal of Neuroscience* 7, 203-2213.

García, I., Martinou, I., Tsujimoto, Y., Martinou, J.C., 1992. Prevention of programmed cell death of sympathetic neurons by the bcl-2 proto-oncogene. *Science* 263, 826-828.

Gerhardt, E., Kugler, S., Leist, M., Beier, C., Bediocchi, L., Volbracht, C., Weller, M., Bahr, M., Nicotera, P., Schulz, J. B., 2001. Cascade of caspase activation in potassium-deprived cerebellar granule neurons: targets for treatment with peptide and protein inhibitors of apoptosis. *Molecular and Cellular Neurosciences* 17, 717-31.

Gleichmann, M., Beinroth, S., Reed, J., Krzajewski, S., Schulz, J., Wüllner, U., Klockgether, T., Weller, M., 1998. Potassium deprivation-induced apoptosis of cerebellar granule neurons: cytochrome c release in the absence of altered expression of Bcl-2 family proteins. *Cellular Physiology and Biochemistry* 8, 194-201.

Grayson, D.R., Szekely, A.M., Costa, E., 1990. Glutamate-induced gene expression in primary cerebellar neurons. In: Guidotti, A. (Ed) *Neurotoxicity of Excitatory Amino Acids* Raven Press, New York, pp. 185-202.

Gross, A., Joekel, J., Wei, M., Korsmeyer, J., 1998. Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO Journal* 17, 3878-3885.

Kerr, J.F.R., Harmon, B.V., 1990. Definition and incidence of apoptosis: An historical perspective. In: Tornei, L.D., Cope, F.O. (Ed) *Apoptosis, the molecular basis of cell death*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 5-30

Kluck, R.M., Bossy-Wetzel, E., Green, D.R. Newmeyer, D.D. 1997. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for bcl-2 regulation of apoptosis. *Nature* 275: 1132-1136.

Krajewski, S., Tanaka, S., Takayama, S., Schibler, M.J., Fenton, W., Reed, J.C., 1993. Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope,

endoplasmic reticulum and other mitochondrial membranes. *Cancer Research* 53, 4701-4714.

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assemble of the head of bacteriophage. *Nature*. 227, 680-685.

Li, F., Srinivasan, A., Yu, W., Armstrong, R.C., Tomaselli, K.J., Frütz, L.C. 1998. Cell specific induction of apoptosis by microinjection of cytochrome c. Bcl-xL has activity independent of cytochrome c release. 1997. *Journal of Biological Chemistry* 272, 30299-30305

Liu, X., Kim, C., Yang, J., Jemmerson, R., Wang, X., 1996. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86, 147-157.

Martin, S., Green, D., 1995. Protease activation during apoptosis: death by thousand cuts? *Cell* 82, 349-352.

Martin, S. J., Green, D. R., 1995. protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts?. *Cell* 82, 349-352.

Morán, J., Patel, A.J., 1989a. Effect of potassium depolarization on phosphate-activated glutaminase activity in primary cultures of cerebellar granule neurons and astroglial cells during development. *Developmental Brain Research* 46, 97-105.

Morán, J., Patel, A.J., 1989b. Stimulation of the N-methyl-D-aspartate receptor promotes the biochemical differentiation of cerebellar granule neurons and not astrocytes. *Brain Research* 486, 15-25.

Morán, J., Domínguez, G., Alavez, S., 1996. NMDA receptor activation and apoptotic death of cultured cerebellar granule neurons. *Boletín de Estudios Médicos y Biológicos*. 44, 49-51.

Morán, J., Itho, T., Reddy, U.R., Chen, M., Alnemri, E., Pleasure, D., 1999. Caspase-3 expression by cerebellar granule neurons is regulated by calcium and cyclic AMP. *Journal of Neurochemistry* 73, 568-577.

Mossman, T., 1983. Rapid colorimetric assay of cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunology Methods* 65, 55-63.

Nijhawan, D, Honnorpour, N. And Wang, X., 2000. Apoptosis in neural development and disease. *Annual Review of Neuroscience* 23:73-87.

Oltavi, Z., Millman, C., Korsmeyer, J., 1993. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with conserved homolog Bax that accelerates programmed cell death. *Cell* 74, 609-619.

Oppenheim, R.W., 1991. Cell death during development of the nervous system. *Annual Review of Neurosciences* 14, 453-501.

Posmantur, R., McGinnis, K., Nadimpalli, R., Gilbertsen, R. B., Wang, K. K., 1997. Characterization of CPP32-like protease activity following apoptotic challenge in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Journal of Neurochemistry* 68, 2328-2337

Reed, J.C., 1997. Cytochrome c: Can't Live with It—Can't Live without It. *Cell* 91, 559-562.

Sakurai, H., Kunsu, R., Sano, K., Tsuchiya, T., Tsuda, M., 1992. Stimulation of cultured cerebellar granule cells via glutamate receptor induces TRE- and CRE- binding activities mediated by common DNA-binding complexes. *Journal of Neurochemistry* 59, 2067-2075.

Sedlak, T., Oltvai, Z., Yang, F., Wang, K., Boise, L., 1995. Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective

dimerizations with Bax. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 92, 7834-7838.

Schultz, J.B., Weller, M., Klockgether, T., 1996. Potassium deprivation-induced apoptosis in cerebellar granule neurons: a sequential requirement for new mRNA and protein synthesis, ICE-like protease activity and reactive oxygen species. *Journal of Neuroscience* 16, 4696-4706.

Tang, D.G., Li, L., Zhu, Z., Joshi, B., 1998. Apoptosis in the absence of cytochrome c accumulation in the cytosol. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 242, 380-384.

Tewari, M., Quan, L. T., O'Rourke, K., Desnoyers, S., Zeng, Z., Beidler, D. R., Poirier, G. G., Salvesen, G. S., Dixit, V. M., 1995. Yama/ CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CcrA-inhibitible protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* 81, 801-809.

Thomberry, N. A., 1994. Interleukin-1 beta converting enzyme. *Methods in Enzymology* 244, 615-631.

Thomberry, N., Lazebnik, Y., 1998. Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312-1316.

Valencia, A., Morán, J., 2001. Role of oxidative stress in the apoptotic cell death of cultured cerebellar granule neurons. *Journal of Neurochemistry* 64, 284-297.

Wolter, K., Hsu, Y.T., Smith, C., Nechushtan, A., Xi, X.G., Joule, R., 1997. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 139, 1281-1292.

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

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

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

DISCUSIÓN GENERAL

Los cultivos de células granulares del cerebelo son un excelente modelo para estudiar los eventos asociados a su desarrollo postnatal. Se ha demostrado que las células granulares del cerebelo de rata en cultivo que no reciben estimulación despolarizante inician un proceso degenerativo a partir de los 5 DIV (Gallo et al, 1987). Estímulos capaces de producir una despolarización en la membrana neuronal, como altas concentraciones de KCl (Gallo et al, 1987) y la estimulación del receptor a glutamato tipo NMDA (Balázs et al, 1988a), pueden inhibir este fenómeno. Recientemente se ha demostrado que esta muerte presenta características apoptóticas y que puede inhibirse bajo diferentes condiciones experimentales (Yan et al, 1994; 1995). En el presente trabajo encontramos que la estimulación del receptor a glutamato tipo NMDA es capaz de inhibir eventos tanto morfológicos como bioquímicos asociados al proceso de muerte apoptótica que se observa en CGC privadas de estimulación despolarizante (Figuras 12, 14, 15 y artículo 1). Se ha sugerido que esta dependencia de despolarización podría reflejar una influencia trófica recibida por las CGC a través de una población glutamatérgica de las fibras musgosas durante el desarrollo postnatal de la rata (Balázs et al, 1988a). Esta hipótesis se basa en evidencias morfológicas que sugieren que las fibras musgosas alcanzan la capa granular interna a partir del día 12 PN, que podría ser equivalente al tiempo en que los cultivos de CGC inician su dependencia de estimulación despolarizante. A pesar de que esta hipótesis fue propuesta hace más de 10 años (Balázs et al, 1988a), no existen en la literatura reportes que demuestren la relevancia de la porción glutamatérgica, a través del receptor tipo NMDA, en la sobrevivencia de las CGC *in vivo*. En estudios previos hemos demostrado que la administración sistémica de MK-801, un

antagonista no competitivo de los receptores a NMDA, es capaz de influenciar la actividad una de las principales enzimas involucradas en la síntesis del glutamato utilizado como neurotransmisor durante el desarrollo del cerebelo (Morán et al, 2000). Recientemente, hemos encontrado que la administración sistémica de éste fármaco modula la muerte apóptotica, durante etapas críticas del desarrollo del cerebelo, modulando la actividad de caspasas (Alavez et al, en preparación).

Por otra parte, las mismas CGC crecidas bajo condiciones despolarizantes (K25) pueden ser inducidas a un proceso de muerte apoptótica al ser privadas de este estímulo (D'Mello et al, 1993; Galli et al, 1995; Morán et al, 2000). Así, las CGC maduras 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 encontrarse células en buen estado aún 24 horas después del cambio. En este sentido, Miller y colaboradores (1996) sugieren que este modelo presenta un proceso bifásico en el que existen neuronas con diferente sensibilidad. Así, una pequeña población neuronal sensible a la falta de suero, muere durante las primeras horas y otra, considerablemente mayor, sensible a la disminución en las concentraciones de potasio muere más lentamente. En relación a esto, cabe mencionar que una buena parte de los resultados que conforman este trabajo se han obtenido utilizando una técnica basada en la capacidad de las mitocondrias para transformar una sal de tetrazolio (MTT) a un producto colorido insoluble (azul de formazan). Como ya se comentó, esta técnica refleja muy adecuadamente la sobrevivencia de los cultivos de CGC (Balázs et al, 1990). Por otra parte, se ha demostrado que después de 7 DIV bajo condiciones no despolarizantes (K5) solo

sobrevive el 40 % de las CGC existentes a 1 DIV, mientras que bajo condiciones despolarizantes sobrevive aproximadamente un 80 % (Toescu, 1997). Estos resultados correlacionan muy cercanamente con los porcentajes del control reportados en este trabajo y están en concordancia con una gran cantidad reportes existentes en la bibliografía (artículo 2, figura1; artículo 3, figura 1A). En este trabajo, confirmamos algunos resultados de estos grupos con relación a la naturaleza apoptótica de este proceso. En este modelo, la despolarización crónica producida por las altas concentraciones de potasio parece promover la maduración de las CGC (Balázs et al, 1988b; Morán y Patel, 1989b; Balázs et al, 1992b; Bessho et al, 1994; Alavez et al, 1996). En este contexto, el término maduración hace referencia a la expresión diferencial de subunidades del receptor a glutamato tipo NMDA, a la activación de enzimas relacionadas con la síntesis del glutamato y la modificación del patrón de disparo de las CGC en respuesta a diversos estímulos. De acuerdo a lo anterior, puede proponerse que existen al menos dos procesos de muerte apoptótica detectables en cultivos de CGC, que dependen del tiempo en cultivo y que se producen por la privación de estimulación despolarizante. Parece haber diferencias significativas entre ambos procesos ya que uno de estos se presenta en CGC consideradas inmaduras o en proceso de maduración que no reciben estimulación despolarizante, mientras que el otro ocurre en neuronas consideradas maduras que han recibido este estímulo, y en las que la privación de condiciones despolarizantes desencadena el proceso de muerte apoptótica. Se sabe que el tratamiento de las células granulares inmaduras con NMDA o K25 aumenta la sobrevivencia, inhibiendo el programa apoptótico. El incremento de calcio intracelular provocado por la estimulación del receptor tipo NMDA y por la activación de canales de calcio sensibles a voltaje promovido por altas concentraciones de potasio, podría activar directa o

indirectamente alguna vía de señalización que tuviera efecto sobre la expresión de genes relacionados con la regulación de la muerte con efectos directos en la sobrevivencia del cultivo. En función a esto, decidimos estudiar los mecanismos básicos involucrados tanto en la inducción del proceso de muerte en estos dos modelos como en el mecanismo promovido por la estimulación con NMDA y K25 para inhibir este proceso.

Desde el descubrimiento de las proteínas de estrés, se les ha asociado a mecanismos de protección y defensa celular a condiciones adversas del entorno. Recientemente, se ha propuesto que la exposición a condiciones de estrés suaves puede proteger a las neuronas de la toxicidad por glutamato (Rodorf et al 1991) y mantener la viabilidad de neuronas con niveles bajos de ATP (Kavakov y Gabai, 1996) a través de la sobreexpresión de HSP-70, un miembro particularmente activo de la familia de HSP. Aunado a su función de chaperonina, muy recientemente se ha propuesto que HSP-70 es capaz de interactuar con Apaf-1 para inhibir la formación del complejo proteico (apoptosoma) que permite la activación de la caspasa-9 (Beere et al, 2000; Saleh et al, 2000). Así, la resistencia conferida por HSP-70 a ciertos estímulos apoptóticos podría ser el resultado de la modulación directa de la función del apoptosoma.

Los resultados de este trabajo muestran que la privación de estimulación despolarizante, produce un incremento considerable y selectivo en los niveles de HSP-70 tanto en células maduras como inmaduras (Figura 2A y 3, artículo 2), sin afectar otras HSP como la HSP-25. Este incremento parece estar relacionado con una función de chaperonina, característica de las HSP, más que con una participación directa de HSP-70 como componente activo de la maquinaria apoptótica. A pesar de

que en ambos modelos la privación de estimulación despolarizante incrementa de manera significativa los niveles de HSP-70, en este trabajo detectamos actividad significativa de caspasa-9 cuando las células son privadas de este estímulo, una vez alcanzado cierto grado de maduración en cultivo (Figura 5, artículo 3). Sin embargo, no se puede descartar que las HSP puedan proteger a las CGC maduras sometidas a condiciones menos drásticas de privación de estimulación despolarizante (e. g. una depolarización de K25 a K12.5). Hecha esta aclaración, estos resultados parecen sugerir que en las CGC, HSP-70 funciona predominantemente como chaperonina y, de presentar actividad anti apoptótica, estaría restringida a estadios tempranos de maduración (Figura 21). Sin embargo, el hecho de que la estimulación de estas células con NMDA y K25 disminuya los niveles de HSP-70 (Figura 2A, artículo 2) sin alterar la actividad enzimática de la caspasa-9 (Figura 5, artículo 3), parece descartar esta posibilidad o bien sugiere la participación de otra caspasa iniciadora en el proceso de muerte observado en las CGC durante el desarrollo en cultivo (Figura 20). La posible participación de otras proteínas de estrés en este fenómeno parece poco probable dado que inductores generales de la respuesta a estrés, como el calor y el ETOH (Figuras 4 y 5, artículo 2) no producen ningún efecto significativo en la sobrevivencia de estas células. Así, el papel de HSP-70 durante el proceso de muerte observado en CGC maduras e inmaduras inducido por privación de estimulación despolarizante parece estar restringido a un mecanismo de protección que es insuficiente para revertir el proceso de muerte apoptótica iniciada por esta clase de estímulo.

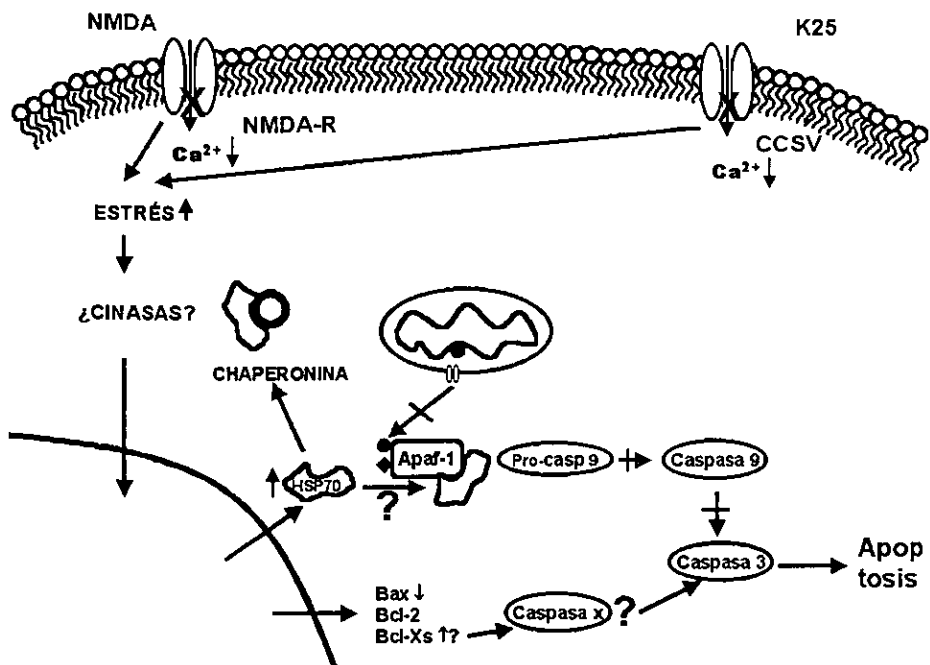


Figura 20. Mecanismos involucrados en el proceso de muerte apoptótica observada en CGC inmaduras, producido por privación de estimulación despolarizante. En este diagrama se integran los resultados obtenidos en el presente trabajo para sugerir un modelo de muerte para las CGC privadas de estimulación despolarizante durante el desarrollo en cultivo. CCSV, canales de calcio sensibles a voltaje; NMDA-R, receptor tipo NMDA; •, citocromo-c; ♦, ATP.

Por otra parte, se sabe que la actividad de la caspasa-9, una de las principales caspasas iniciadoras, depende de una manera crítica de la liberación del citocromo-c de la mitocondria y de los niveles de algunos miembros de la familia de Bcl-2. En este trabajo determinamos los niveles de dos de las proteínas más estudiadas de esta familia, Bax y Bcl-2, en los dos modelos de muerte observados en cultivos de CGC por la privación de estimulación despolarizante. Los resultados de nuestro estudio muestran que tanto las CGC que crecen en un

medio con condiciones fisiológicas de potasio como las CGC maduras privadas de estimulación despolarizante, presentan una clara disminución de los niveles de Bax (Figuras 2A y 2B, artículo 3). Los resultados descritos pueden correlacionarse con el decremento general de Bax en homogenados de cerebelo que se ha reportado durante el desarrollo *in vivo* de la rata, a partir de P8 (Vekrellis et al, 1997). Por otra parte, cuando las CGC son privadas de estimulación despolarizante, no encontramos cambios significativos en los niveles de Bcl-2 (Figuras 2A y 2B, artículo 3) independientemente del estado de maduración de estas neuronas. Estos resultados sugieren un proceso de muerte independiente de la expresión de Bcl-2 y Bax en las CGC en cultivo. El grupo de D'Mello reporta una disminución en los niveles del mensajero de bcl-2 y bcl-xL 4 horas después de que las CGC maduras son privadas de estimulación despolarizante y un aumento del de bcl-xs a las 2 horas (D'Mello et al, 1997). Estos resultados, en concordancia con los obtenidos en este trabajo, descartan la participación de Bax en el proceso y sugieren la participación de Bcl-2 y Bcl-xL en la regulación de Bcl-xS, posible responsable de la muerte observada bajo estas condiciones. Sin embargo, nuestros resultados muestran que Bcl-2 no se modifica de manera significativa durante en CGC maduras bajo estas condiciones. Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que son Bcl-xL y Bcl-xS las moléculas involucradas en el control del proceso de muerte que se observa en CGC maduras privadas de estimulación despolarizante.

El tratamiento con NMDA o K25 no modificó la tendencia a la disminución en los niveles de Bax (Figura 2A, artículo 3). Este resultado sugiere una vez más la participación de una molécula proapoptótica, diferente de Bax, en el proceso de muerte que se observa en CGC maduras e inmaduras en cultivo. Por otra parte, Bcl-2 parece participar en la vía de inhibición de la muerte inducida por condiciones

despolarizantes en función al incremento que se observa cuando las CGC son estimuladas con NMDA (Figura 2A, artículo 3). Este incremento se presenta en un periodo importante durante el desarrollo de estas células en el cultivo, en el que parece definirse la sobrevivencia en función a la presencia o ausencia de estimulación despolarizante.

En este trabajo exploramos también la posibilidad de que la liberación del citocromo-c fuera una parte importante del programa de muerte inducido por privación de estimulación despolarizante durante el desarrollo de las células granulares en cultivo. 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, en función del tiempo en el que las células permanecen en cultivo. Recientemente, se ha propuesto que Bcl-2 puede ejercer su acción antiapoptótica inhibiendo la liberación del citocromo-c (Kluck et al, 1997a; Yang et al, 1997). Sin embargo, el aumento de Bcl-2 observado en las CGC cultivadas bajo condiciones despolarizantes difícilmente podría estar relacionado con esta acción ya que no se observa liberación del citocromo-c en CGC inmaduras crecidas en K5 (Figura 4A, artículo 3). Esto es congruente con la total ausencia de relocalización de Bax en CGC inmaduras comprometidas a morir bajo condiciones no-despolarizantes (Figura 3, artículo 3) y sugiere otro mecanismo de acción para Bcl-2.

La actividad de caspasas en este modelo, también sugiere un modelo de muerte independiente de la liberación del citocromo-c, al no presentar actividad de caspasa-9 (Figura 5A, artículo 3). Sin embargo, la caspasa-3 se activa significativamente y las condiciones despolarizantes inhiben de manera significativa y selectiva esta activación (Figura 5, artículo 3) por lo que, como ya se mencionó, debe participar alguna otra caspasa iniciadora, diferente a la caspasa-9.

En conjunto, estos resultados sugieren un modelo de muerte para las CGC inmaduras con características apoptóticas en el que ni HSP-70 ni Bax juegan un papel preponderante, independiente de la liberación del citocromo-c y en el que la caspasa-3 no es activada por la caspasa-9.

En concordancia con reportes previos (Gleichmann et al, 1998, Bobba et al, 1999), en este estudio encontramos una pequeña liberación del citocromo-c a la fracción citosólica, pocas horas después de la privación de estimulación despolarizante (Figura 4B, artículo 3). Este resultado coincide temporalmente con la actividad de la caspasa-9 y la caspasa-3, encontrada en este trabajo (Figura 5C, artículo 3), y sugiere que esta cascada de caspasas es inducida por el citocromo-c.

En el presente trabajo no encontramos cambios significativos en los niveles de Bax y Bcl-2, que puedan asociarse a la liberación del cit-c, ni tampoco a una relocalización de Bax hacia la mitocondria que sugieran la participación de esta molécula en este proceso. Tampoco se observa un aumento en la relación de los niveles de Bax/Bcl-2 (Figura 2D, artículo 3), que permita sugerir la participación de Bax en la liberación del citocromo-c a través de interacciones proteína-proteína entre estos dos miembros de la familia de Bcl-2. No obstante, no puede descartarse que estas proteínas puedan estar involucradas en el proceso de muerte de las CGC maduras, regulando su actividad pro y antiapoptótica mediante cambios postraduccionales, como fosforilaciones, fragmentaciones o interacciones con otras proteínas (Ito et al, 1997; Datla et al, 1997; Cheng et al, 1997; Clem et al, 1998).

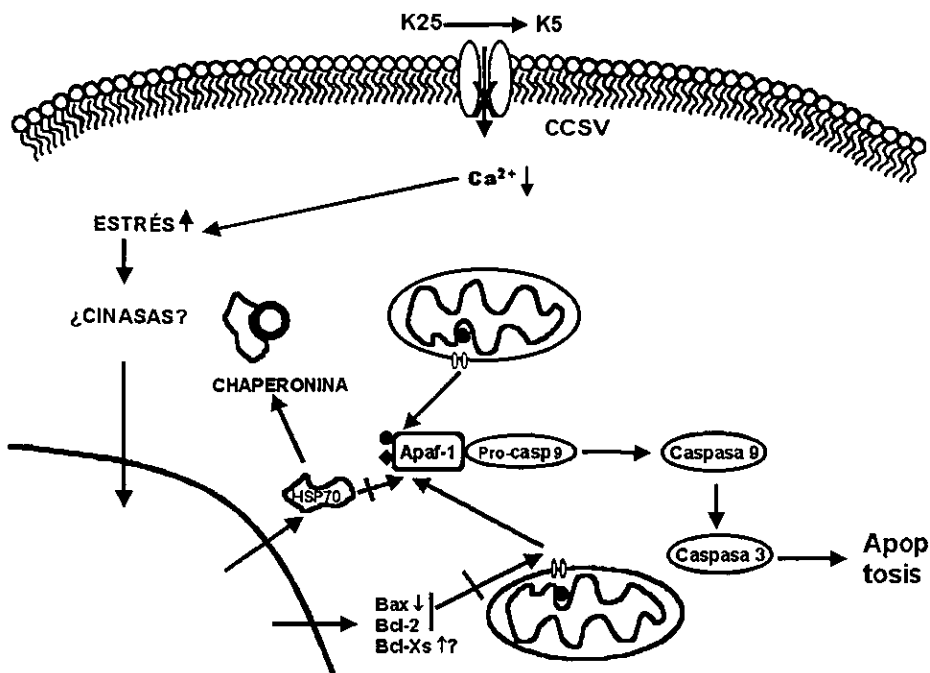


Figura 21. Mecanismos involucrados en el proceso de muerte apoptótica observado en CGC maduras, producido por privación de estimulación despolarizante. En este diagrama se integran los resultados obtenidos en el presente trabajo para sugerir un modelo de muerte para las CGC privadas de estimulación despolarizante, una vez alcanzado cierto grado de maduración en cultivo. CCSV, canales de calcio sensibles a voltaje; •, citocromo-c; ♦, ATP.

En conjunto, estos resultados sugieren un modelo de muerte para las CGC maduras con características apoptóticas en el que ni HSP-70 ni Bax juegan un papel preponderante, pero en el que la liberación del citocromo-c parece activar una cascada de caspasas en la que se distingue la acción secuencial de la caspasa-9 y la caspasa-3.

Nuestros resultados sugieren que el proceso de muerte inducido en CGC tanto maduras como inmaduras por la privación de estimulación despolarizante y la

consecuente disminución en los niveles intracelulares de calcio, presentan ciertas similitudes pero también diferencias substanciales en lo que respecta a los mecanismos moleculares involucrados en el proceso (Figuras 20 y 21).

CONCLUSIONES

- Las CGC en cultivo, tanto maduras como inmaduras, inician un proceso de muerte con características apoptóticas al ser privadas de estimulación despolarizante.
- La estimulación con NMDA o K25 es capaz de revertir este proceso en CGC inmaduras.
- El tiempo mínimo de estimulación del receptor tipo NMDA capaz de inhibir significativamente esta muerte es de 1 h, pero el efecto máximo se alcanza con una estimulación crónica a partir del 2 DIV.
- Las CGC en cultivo expresan HSP-70 y HSP-25 de manera constitutiva e inducen la expresión de HSP-70 en respuesta a la privación de estimulación despolarizante.
- La estimulación de CGC inmaduras con NMDA o K25 disminuye esta inducción.
- La inducción en la expresión de HSP-70 por ETOH y calor no es capaz de proteger a las CGC de la muerte inducida por la privación de estimulación despolarizante.
- Los niveles de Bcl-2 y Bax no se modifican de manera que sugieran su participación directa en el proceso de muerte apoptótica inducido por la privación de estimulación despolarizante en cultivos de CGC.
- La privación de estimulación despolarizante no induce la liberación del citocromo-c en CGC inmaduras pero produce una liberación discreta de esta molécula en CGC maduras.
- Existe una correlación directa entre la liberación del citocromo-c y la actividad de la caspasa-9 que se observa en CGC maduras al ser privadas de estimulación despolarizante.

- La privación de estimulación despolarizante en cultivos de CGC, tanto maduras como inmaduras, induce una marcada activación de la caspasa-3.
- Esta activación puede ser inhibida por la estimulación con NMDA y K25 en CGC inmaduras.
- La muerte neuronal inducida por la privación de estimulación despolarizante en las CGC maduras e inmaduras, presenta algunas similitudes pero también diferencias importantes en los mecanismos y moléculas que participan en este fenómeno.

BIBLIOGRAFÍA

- Alavez, S., Gutierrez-Kobeh, L. y Morán, J. Characterization of the activation of glutaminase induced by N-Methyl-D-Aspartate and potassium in cerebellar granule cells. *J. Neurosci. Res.* 45, 637-646 (1996).
- 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. y Davies, A.M. The proto-oncogene bcl-2 can selectively rescue neurotrophic factor-dependent neurons from apoptosis. *Cell* 73, 295-307 (1993).
- Altman, J. Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. *J. Comp. Neur.* 145, 465-514 (1972).
- Antonsson, B., Conti, F., Ciavatta A.M., Montessuit, S., Lewis, S., Martinou, I., Bernasconi, L., Bernard, A., Mermod, J.J., Mazzei, G., Maundrell, K., Gambale, F., Sadoul, R. y Martinou, J.C. Inhibition of Bax channel forming activity by Bcl-2. *Science* 277, 370-372 (1997).
- Atlante, A., Gagliardi, S., Marra, E. y 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. y 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. y 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. y Kingsbury, A. Effect of depolarization on the maturation of cerebellar granule cells in culture. *Dev. Brain Res.* 40, 269-279 (1988b).
- Balázs, R., Jorgensen, O. y Hack, N. Selective stimulation of excitatory amino acid receptor subtypes and the survival of cerebellar granule cells in culture. *Neurosci.* 37(1), 251-258.
- Balázs, R., Hack, N., Resink, A., Aronica, E. y 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. y 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. y 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).

Bellmann K, Jaattela M, Wissing D, Burkart V, Kolb H. Heat shock protein hsp70 overexpression confers resistance against nitric oxide. *FEBS Lett.* 391, 185-188 (1996).

Bessho, Y., Nawa, H. y 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).

Bossy-Wetzel, E. y Green, D. R. Apoptosis: checkpoint at the mitochondrial frontier. *Mutant. Res.* 434, 243-51 (1999)

Bulleit, R.F., Cui, H., Wang, J.C., Lin, X. NMDA receptor activation in differentiating cerebellar cell cultures regulates the expression of a new Pou gene, CNS-1. *J. Neurosci.* 14, 1584-1595 (1994).

Burgoyne, R., Graham, M y Cambray-Deakin, M. Neurotrophic effects of NMDA receptor activation on developing cerebellar granule cells. *J. Neurocytology* 22, 689-695 (1993).

Buzzard, K. A., Giaccia, A. J., Killender, M. y Anderson, R. L. Heat shock protein-72 modulates pathways of stress-induced apoptosis. *J Biol Chem* 273, 17147-17153 (1998).

Cai, J., Yang, J. y Jones, D. Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. *Biochimica et Biophysica Acta* 1366, 139-149 (1998).

Chang, J. y 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. y Korsmeyer, S. Bcl-2 family: regulator of cell death. *Annu. Rev. Immunol.* 16, 395-419 (1998).

Cheng, E., Kirsh, D., Clem, R., Ravi, R., Kastan, M., Bedi, A., Veno, K. y 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 an CED-9: a molecular framework for cell death. *Science* 275, 1122-1126 (1997).

Clem, R., Cheng, E., Karp, C., Kirsch, D., Veno, K., Takahashi, A., Kastan, M., Griffin, D., Earnshaw, W., Velivona, M. y Hardwick, J. Modulation of cell death by bcl-xL through caspase interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (2), 554-559 (1998).

Collingridge, G. y Watkins, J. *The NMDA receptor*. Oxford University Press. Great Britain. 1994.

De Luca, A., Weller, M., Frei, K. y 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. y Korsmeyer, S. Bax is required for neuronal death after trophic factor deprivation and during development. *Neuron* 17, 401-411 (1996).

DeLong, M. R. *The cerebellum* in Kandel, E. R., Schwartz, j. H. y Jessell, T. M. (eds.). *Principles of Neural Science*. McGraw-Hill, Inc. USA. pp. 832-852 (2000).

Dessi, F., Charriaud-Marlangue, C., Khrestchatisky, M. y Ben-Ari, Y. Glutamate-induced neuronal death is not a programmed cell death in cerebellar culture. *J. Neurochem.* 60, 1953-1955 (1993).

Didier, M., Roux, P., Piechaczyk, M., Mangeat, P., Devilliers, G., Bockaert, J., Pin, J. P. Long-term expression of the c-fos protein during in vitro differentiation in cerebellar granule cells induced by potassium or NMDA. *Brain Research. Molecular Brain Research* 12, 249-258 (1992).

D'Mello, S., Galli, C., Ciotti, T. y 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. y 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. y 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. y 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. y Jorgensen, O. The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J. Neurosci.* 7 (7), 2203-2213 (1987).
- García, I., Martinou, I., tsujimoto, Y. 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. y 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).
- Green D. y Reed, J. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312 (1998).
- Gross, A., Jockel, J., Wei, M. y Korsmeyer, J. Enforced dimerization of BAX results in its translocation mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J.* 17 (14), 3878-3885 (1998).
- Grayson, D.R., Szekely, A.M., y Costa, E. Glutamate-induced gene expression in primary cerebellar neurons. En: Guidotti, A. (Ed) *Neurotoxicity of Excitatory Amino Acids* Raven Press, New York, pp. 185-202 (1990).
- 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).
- Hockenbery, D., Zutter, M., Hickey, W., Nahm, M. y 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., Milliman, C. y Korsmeyer, S. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75, 241-251 (1993).
- Hockenbery, D. Bcl-2, a novel regulator of cell death. *BioEssays* 17 (7), 631-638 (1995).
- Ito, M. *The cerebellum and neural control.* Raven Press, New York, pp. 12 (1984).
- Ito, T., Deng, X., Carr, B. y May, S. Bcl-2 phosphorylation required for anti-apoptosis function. *J. Biol. Chem.* 272 (18), 11671-11673 (1997).
- Jaattela M, Wissing D, Bauer PA, Li GC. Major heat shock protein hsp70 protects tumor cells from tumor necrosis factor cytotoxicity. *EMBO J.* 11, 3507-12 (1992).
- Jacobson, M., Burne, J., King, M., Miyashita, T., Reed, J. y Raff, M. Bcl-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. *Nature* 361, 365-369 (1993).

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

Kane, D., Sarafion, T., Anton, R., Hahn, H., Gralla, E.B., Valentine, J.S., Örd, T. y 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. y 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).

Kerr, J. F. R. y Harmon, B. V. Definition and incidence of apoptosis: An historical perspective in Tomei, L. D. y Cope, F. O. (eds.). *Apoptosis: The molecular Basis of cell death*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA. pp. 5-29 (1991).

Kavakov, A. E. y Gabai, V. L. Heat shock proteins maintain the viability of ATP-deprived cells: what is the mechanism?. *Trends In Cell. Biol.* 4, 193-195 (1994).

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

Kluck, R., Martin, S., Hoffman, B., Zhou, Green, D. y 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. y Korsmeyer, S. Bcl-2 and Bax function independently to regulate cell death. *Nature Genetics* 16 (4), 358-363 (1997).

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

Korsmeyer, S. J., Yin, X. M., Oltvai, Z. N., Veis-Novack, D. J., Linette, G. P. Reactive oxygen species and the regulation of cell death by the Bcl-2 gene family. *Biochim. Biophys. Acta.* 1271, 63-6 (1995).

Kroemer, G., Zamzami, N. y Susin, S. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunology Today* 18, 45-51 (1997).

Lahm, M., Dubyak, G., Chen, L., Nuñez, G., Miesfeld, R. y Disterhorst, C. Evidence that Bcl-2 represses apoptosis by regulating endoplasmic reticulum associated Ca²⁺ fluxes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 6569-6573 (1994).

Lasher, R. y 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. y Fallon, J. (ed.). *Neurotrophic factors*. Academic Press, Inc. USA. pp. 565-598 (1993).

Liu, X., Kim, C., Yang, J., Jemmerson, R. y Wnag, 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. y 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. y Green, D. Protease activation during apoptosis: death by thousand cuts? *Cell* 82, 349-352 (1995).

Meier, E., Hertz, L. y Shousboe, A. Neurotransmitters as developmental signals. *Neurochem. Int.* 19 (1/2), 1-15 (1991).

Merry, D., Veis, D., Hickey, W. y Korsmeyer, S. Bcl-2 protein expression is widespread in the developing nervous system and retains in the adult PNS. *Development* 120, 301-311 (1994).

Merry, D. y 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. y 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. y 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. y Thompson, C. Bcl-x_L forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature* 385, 353-357 (1997).
- Morán, J. y 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. y 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. y 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).
- Morán, J., Domínguez, G. y Alavez, S. NMDA receptor activation and apoptotic death of cultured cerebellar granule neurons. *Boletín de Estudios Médicos y Biológicos.* 44, 49-51 (1996).
- Morán, J., Itho, T., Reddy, U.R., Chen, M., Alnemri, E. y Pleasure, D. Caspase-3 expression by cerebellar granule neurons is regulated by calcium and cyclic AMP. *J. Neurochem.* 73, 568-577 (1999).
- Murphy, A., Bredesen, D., Cortopassi, G., Wang, E. y Fiskum, G. Bcl-2 potentiates the maximal calcium uptake capacity of neural cell mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 9893-9898 (1996).
- Oltavi, Z., Milliman, C. y 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. y 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).
- Raff, M., Barres, B., Burne, J., Coles, H., Ishizaki, Y. 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).

Rodorf, G., Koroshetz, W. J. y Bonventre, J. V. 1991 Heat shock protects cultured neurons from glutamate toxicity. *Neuron* 7, 1043-1051 (1991).

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. y Borner, C. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature* 391, 496-499 (1998).

Sakahira, H., Enari, M. y Nagata, S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391 (6662), 96-99 (1998).

Sakurai, H., Kurusu, R., Sano, K., Tsuchiya, T. y Tsuda, M. Stimulation of cultured cerebellar granule cells via glutamate receptor induces TRE- and CRE- binding activities mediated by common DNA-binding complexes. *J. Neurochem* 59, 2067-2075 (1992).

Samali, A., y Cotter, T. G. Heat shock proteins increase resistance to apoptosis. *Exp. Cell. Res.* 223, 163-70 (1996)

Schendel, S., Xie, Z., Montal, M., Matsuyama, S., Montal, M. y Reed, J. Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (10), 5113-5118 (1997).

Schulz, J., Weller, M. y 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. y Boise, L. Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 7834-7838 (1995).

Shimizu, S., Equichi, Y., Kamiike, W., Funahashi, Y., Mignon, A., Lacronique, V., Matsuda, H. y 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. y Nahorski, S. Involvement of intracellular stores in the Ca²⁺ responses to N-methyl-D-aspartate and depolarization in cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* 61 (2), 760-763 (1993).

Simpson, P., Challiss, R.A. y 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).

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

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

Toescu, E. C. Activity of voltage-operated calcium channels in rat cerebellar granule neurons and neuronal survival. *Neurosci.* 94(2), 561-570 (1999).

Van der Valk, J., Resink, A. y 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. y Ham., J. Bax promotes neuronal cell death and is downregulated during the development of the nervous system. *Development* 124, 1239-1249 (1997).

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

White, F. Keller-Peck, C., Knudson, M., Korsmeyer, S. y 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. y Joule, R. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J. Cell Biol.* 139 (5), 1281-1292 (1997).

Wood, K., Dispasquale, B y 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 y Nuñez, G. Interaction and regulation of subsellular localization of CED-4 and CED-9. *Science* 275, 1126-1129 (1997).

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

Yan, G. M. Y., Lin, S. Z. L., Irwin, R. P. y Paul, S. M. Activation of muscarinic cholinergic receptors blocks apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *Mol Pharmacol* 47, 248-257 (1995).

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

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

Yin, X. M., Oltavi, Z. y 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. y 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).

Zhong, L-T., Sarafin, T., Kane, D., Charles, A., Mah, S., Edwards, R. y 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. y 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).

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA