

03062

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO

5

Título de la Tesis para obtener el grado de
**“Papel de proteínas de Matriz Extracelular en la
diferenciación de células granulares en cultivo”.**

Maestro en Investigación Biomédica Básica

Biol. Alette Ortega Gómez

Tutor: Dr. Julio Morán Andrade

2002



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.

**PAPEL DE PROTEINAS DE MATRIZ EXTRACELULAR EN LA
DIFERENCIACION DE CELULAS GRANULARES EN CULTIVO**

INDICE

I.- RESUMEN

II.-INTRODUCCION

- 2.1 Desarrollo del Sistema Nervioso
- 2.2 Desarrollo del cerebelo
- 2.3 Neuroquímica del cerebelo
- 2.4 Papel del NMDA y KCl en la viabilidad y sobrevivencia neuronal
- 2.5 Componentes extracelulares durante el desarrollo del Sistema Nervioso Central
- 2.6 Papel de componentes de la matriz extracelular durante el desarrollo del SNC
- 2.7 Papel de proteínas de adhesión y factores solubles en el desarrollo del SNC
- 2.8 Participación de componentes extracelulares en el desarrollo del cerebelo

III.-OBJETIVO GENERAL

IV.-OBJETIVOS PARTICULARES

V.- METODOS

- 5.1 Cultivo celular
- 5.2 Extracción de la Fracción celular a partir de cultivos celulares
- 5.3 Incorporación de Leucina Radioactiva.
- 5.4 Método de Hoescht.
- 5.5 Evaluación de la sobrevivencia neuronal
- 5.6 Evaluación de la actividad enzimática de la PAG
- 5.7. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford
- 5.8 Inmunohistoquímica

5.9 Evaluación morfológica
6.0 Estadística

VI.-RESULTADOS

6.1. Incorporación de leucina radioactiva a proteínas de fracciones celular y extracelular.
6.2. Interacciones en el cultivo.
6.3.Morfometría y morfología de células granulares en cultivos sembrados en los diferentes sustratos experimentales

6.3.1. Morfología

6.3.1.1. Células granulares cultivadas sobre componentes de células granulares
6.3.1.1.1. Densidad normal
6.3.1.1.2. Densidad baja
6.3.1.2. Células granulares cultivadas sobre componentes extracelulares de astrocitos
6.3.1.2.1. Densidad normal
6.3.1.2.2. Densidad baja

6.3.3. Morfometría

6.3.3.1. Células granulares crecidas sobre células granulares
6.3.3.1.1. Densidad normal
6.3.3.1.2. Densidad baja
6.3.3.3. Células crecidas sobre componentes extracelulares de astrocitos
6.3.3.3.1. Densidad normal
6.3.3.3.2. Densidad baja

6.4 Viabilidad neuronal

6.5. Actividad de la glutaminasa activada por fosfato

VII.- DISCUSION

VIII- CONCLUSIONES

IX.- BIBLIOGRAFIA

I. RESUMEN

Durante el desarrollo, la despolarización o la activación de los receptores glutamatérgicos ejercen una acción trófica en las células granulares de cerebelo. Estudios *in vitro* han mostrado que el NMDA y el KCl promueven la sobrevivencia y aceleran la diferenciación celular. Por otro lado, las proteínas de matriz extracelular (MEC) representan una señal trófica importante dentro del desarrollo. Estas proteínas se han asociado a algunos eventos biológicos que van desde la estructuración de un soporte mecánico hasta procesos complejos como la migración, proliferación, diferenciación celular, crecimiento de neuritas y muerte celular. Los principales constituyentes proteicos extracelulares caracterizados en el sistema nervioso central son los proteoglucanos, fibras de colágeno y glicoproteínas. Los cambios en la composición molecular de las proteínas que constituyen a la matriz extracelular de células nerviosas durante el desarrollo dependerá de la síntesis, recambio y degradación de estos componentes.

En este trabajo se estudió la influencia de diferentes sustratos sintetizados por células granulares (1-5 DIV) tratadas con NMDA y KCl o producidos por astrocitos en los patrones de crecimiento, morfología, actividad de enzimas como la PAG (Glutaminasa activada por fosfato) y viabilidad neuronal de las células granulares en cultivo (CGC).

Los resultados mostraron que las CGC tienen características morfológicas diferentes cuando se crecen en poli-lisina a densidad normal (DN) que en (DB). Los cultivos a DN mostraron una tendencia a organizarse en grandes cúmulos de células y a formar procesos muy largos y gruesos resultantes de la suma de los procesos correspondientes al cúmulo. Esta formación de cúmulos fue mayor en las CGC en presencia de NMDA y KCl que en el

control. Así los sustratos de CGC a DN condicionados por NMDA y KCl reproducen e incrementan los valores cuantitativos evaluados en la morfología. Estas estructuras no se observaron a DB; aunque las CGC mostraron buena adhesión al plato de cultivo, las células se mantuvieron separadas y los procesos siempre fueron delgados y largos. Bajo estas condiciones los estudios morfométricos mostraron que los somas neuronales presentaron un diámetro de $6.566 \mu\text{m}$. Se observó una longitud promedio de los procesos de $500 \mu\text{m}$ y un diámetro de $1.1314 \mu\text{m}$. Las neuronas presentaron 2.28 ramificaciones por neurona en un área promedio de 131.107mm^2 y la distribución de sus somas fue homogénea a lo largo de la caja de cultivo.

Las células que se crecieron sobre las proteínas sintetizadas por las CGC en cultivo por 5 DIV (proteínas extracelulares, MEC) mostraron una buena adhesión a la caja de cultivo, observándose alrededor de 180 células por cajas de cultivo. Se observó un diámetro de los somas de $7.087 \mu\text{m}$, una longitud de sus procesos de $387.87 \mu\text{m}$ con un mayor diámetro ($1.2046 \mu\text{m}$). Se cuantificaron 3.5 ramificaciones por célula en un área promedio de 119.08mm^2 . Cuando las CGC se crecieron sobre sustratos producidos por células tratadas crónicamente con NMDA ($150 \mu\text{M}$) se observó un número promedio de 151 neuronas con un diámetro de sus somas de $3.807 \mu\text{m}$. Sus procesos fueron más largos en comparación al control ($665.85 \mu\text{m}$) y el diámetro de sus procesos fue de $0.545 \mu\text{m}$. Se presentaron 3.3 ramificaciones por célula en un área total de $119676.5 \mu\text{m}^2$. Cuando las CGC se crecieron sobre sustratos producidos por células tratadas crónicamente con KCl (40mM) se cuantificaron en un área de 117.876mm^2 un total de 132 células con un diámetro de sus somas de $3.803 \mu\text{m}$. Sus procesos midieron $586.17 \mu\text{m}$ de largo y $0.541 \mu\text{m}$ de grosor. Así

los sustratos de las CGC a DB condicionados por NMDA o KCl incrementan significativamente la longitud de sus procesos.

La morfometría evaluada en las CGC a DN crecidas sobre sustratos generados por astrocitos de diferentes edades presentan cúmulos muy grandes ($x=109\pm 52 \mu\text{m}$), los procesos son muy largos ($x=470\pm 48 \mu\text{m}$ a la primera semana; $x=2460\pm \mu\text{m}$ a la 2^a. Semana y $x=700.77\pm \mu\text{m}$ a la 3^a. semana). En este caso las estructuras se agrupan unas con otras formando estructuras muy grandes en el cultivo. Para obtener datos de células individuales este método es ineficiente por lo que se cuantificó la morfometría de las CGC sobre estos sustratos a DB. Morfométricamente las CGC a DB crecidas sobre sustratos generados por astrocitos de diferentes edades presentan cambios en el tamaño de los somas con respecto al control sobre PLL ($x=6.76 \mu\text{m}$), CGC crecidas sobre sustratos generados de astrocitos de 1 semana $x=4.125\pm 1.95$) y de 3 semanas de edad $x=4.35\pm 2.19\mu\text{m}$). Con respecto al diámetro de los procesos también hay diferencias (1 semana $x=1.50\mu\text{m}$; 2 semanas $x=1.89 \mu$ y 3 semanas $x=0.918$) con respecto al control sobre PLL ($x=1.25$).

Los estudios de viabilidad mostraron un aumento de casi 100% y 150% con respecto al control cuando las CGC se crecieron en sustratos sintetizados por CGC tratadas con 150 μM NMDA o 40 mM KC, respectivamente. Las CGC crecidas sobre los diferentes sustratos sintetizados por astrocitos mostraron una disminución en la viabilidad celular hasta de un 40% después de una semana con respecto al control. Dos semanas después no hubo cambios con respecto al control. Finalmente la actividad de la glutaminasa, no se vió modificada bajo ninguna condición experimental. Las CGC crecidas en sustratos generados por astrocitos en de diferentes edades no afectan a la viabilidad celular con respecto al control (PLL) (100%). Estos resultados sugieren que el sustrato influye en el patrón de

crecimiento de las CGC. Las señales tróficas inducidas por NMDA y potasio parecen ejercer sus efectos sobre la diferenciación celular de forma directa, pero también a través de la modificación de las proteínas liberadas extracelularmente, que parecen afectar básicamente la morfología de los procesos, así como la viabilidad neuronal. El sustrato parece no alterar otros parámetros de la diferenciación como la expresión de enzimas marcadoras de maduración como la GAF.

II. INTRODUCCION

2.1. DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO

Durante el desarrollo embrionario se forman tres capas blastodérmicas: el ectodermo, el endodermo y el mesodermo. A partir del ectodermo se origina el sistema nervioso central (SNC) y el sistema nervioso periférico (SNP). En vertebrados, el ensanchamiento de una parte del ectodermo forma una estructura aplanada conocida como placa neural en la superficie dorsal del embrión. Los márgenes de esta placa se elevan, se doblan hacia la línea ventromedial y se fusionan a partir de la parte anterior para formar el tubo neural. Simultáneamente ocurre una proliferación celular en la parte anterior del tubo neural. Simultáneamente ocurre una proliferación celular en la parte anterior del tubo neural (Sauer, 1935, Fujita, 1963, Rackic, 1974). Finalmente el tubo neural y su ensanchamiento anterior forman vesículas que darán lugar a las distintas partes del cerebro y a la médula espinal. El prosencéfalo, parte más anterior del tubo, dará lugar a los hemisferios cerebrales; el mesencéfalo originará al cerebro medio y el romboencéfalo formará el tallo cerebral (bulbo raquídeo y médula) y el cerebelo (Cowan, 1978,79).

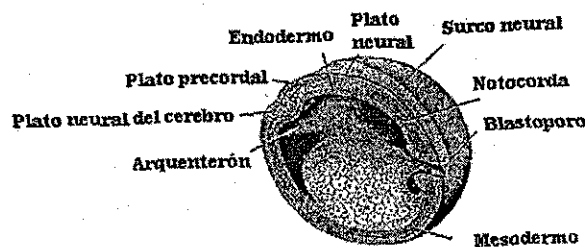


Figura 1. Gástrula tardía.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.2. DESARROLLO DEL CEREBELO

La corteza cerebelar está constituida por 5 tipos neuronales: las células granulares, estrelladas, de canasta, de Golgi y de Purkinje; las cuáles se acomodan en 3 capas: la molecular, la de Purkinje y la granular. La capa molecular externa está compuesta por las dendritas de las células de Purkinje y las fibras paralelas que corresponden a los axones de las células granulares. Esta capa también incluye a las interneuronas en canasta y estrelladas. Por debajo de la capa molecular se encuentran los somas de las células de Purkinje (50-80 μM), lo que le dá el nombre a esta capa. Estas neuronas extienden sus dendritas hacia la capa molecular y sus axones hacia la sustancia blanca. La capa granular contiene a las neuronas granulares, las cuáles están densamente empacadas.

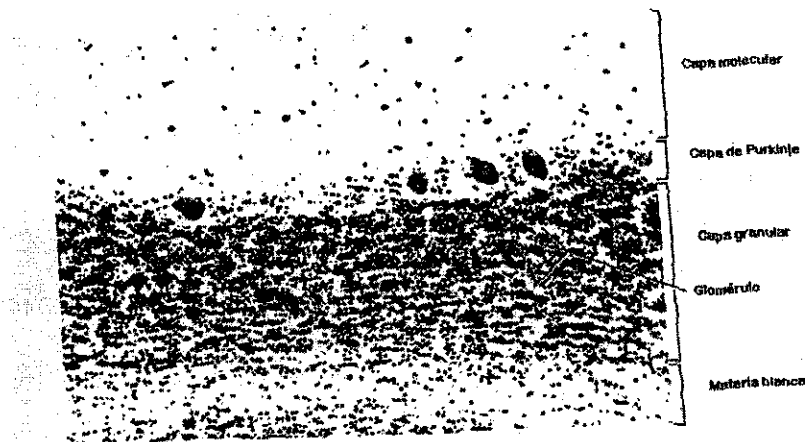


Figura 2. Esquema de un corte transversal de la corteza cerebelar. Se observan algunos tipos neuronales y su organización estructural (Modificado de Martin, Neuroanatomy, 1989).

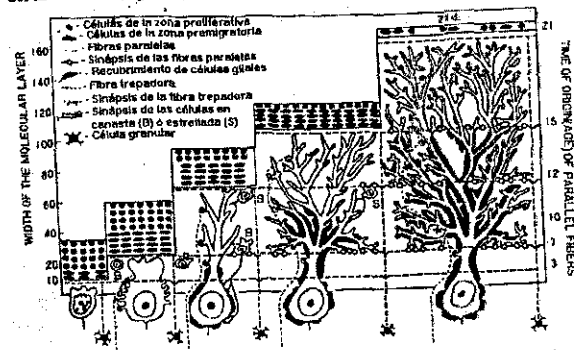
Debido a sus características, el cerebelo es una estructura ideal para estudiar los mecanismos involucrados en el desarrollo neuronal. (Burgoyne y Cambray, 1988). Esta estructura está formada por un número reducido de tipos celulares que se acomodan en capas definidas estructuralmente. Además, una parte importante de su desarrollo ocurre en etapas postnatales. Al igual que el resto del sistema nervioso, durante el desarrollo del cerebelo, las neuronas pasan por una serie de eventos que difieren de célula a célula en el tiempo y que incluye una fase de proliferación, migración, diferenciación, formación y eliminación de procesos y sinapsis, y muerte neuronal.

Durante el desarrollo del cerebelo ocurren dos migraciones celulares, la primera dará lugar a la capa granular externa y la segunda originará células que migran a capas menos superficiales y que posteriormente se diferenciarán en células de Purkinje. Las células contenidas en la zona ventricular y en la capa granular externa migran en direcciones contrarias y formarán las unidades estructurales del cerebelo maduro (Ito, 1984). Anterior a la formación de la placa cerebelar ocurre una primera migración de células indiferenciadas que forman una capa germinal y que darán lugar a las neuronas granulares y otras interneuronas de la corteza cerebelar y a las células gliales. Estas neuronas migran posteriormente hacia la parte más interna para formar una segunda capa germinal conocida como capa granular externa.

Las neuronas de esta capa toman su sitio definitivo, se internalizan a capas más profundas para formar la capa granulosa interna y aquí las células se diferencian en Golgi y células granulares. De los neuroblastos que se originaron durante la primera migración se originan células en canasta y estrelladas. Durante el tiempo en que las células granulares se sitúan en su lugar definitivo se extienden las fibras paralelas. La migración de las células

granulares concluye postnatalmente y de esta manera la corteza cerebelosa queda constituida por una capa externa, una intermedia o de Purkinje y una más interna, la capa granular. En el cerebelo de rata los procesos de diferenciación y migración ocurren alrededor de las tres primeras semanas de vida postnatal.

Como se mencionó antes, las células de la capa granular externa migran sobre la superficie del cerebelo desde su parte rostral a la capa germinal en la placa alar formándose la pared del cuarto ventrículo. El mecanismo por el cual se da lugar a la migración de las células de la capa externa no es del todo comprendido. La migración de las células granulares se lleva a cabo debido al contacto que presentan con la lámina basal que estimula la movilidad y los procesos de meiosis (Hausmann, 1985). Las células granulares están en contacto con axones que actúan como guías para el proceso de migración. En los vertebrados, la capa granular externa se incrementa en espesor de una monocapa de células a una capa de 6 a 8 células en grosor como resultado de la proliferación de las células granulares externas. La capa granular externa persiste por un periodo que varía de acuerdo a la especie, pero eventualmente se reduce en grosor a una monocapa hasta que finalmente desaparece aproximadamente para el día 21. En la rata, las células granulares pasan a la zona basal en su primer día de vida y a los tres días llegan a la capa granular. Los somas de las células granulares se van moviendo hacia la parte más interna, dejando un axon largo y bifurcado (fibras paralelas) en la capa molecular. La capa granular interna se forma durante la segunda semana de vida postnatal.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 3. Desarrollo de las neuronas del cerebelo. Formación de sinápsis y crecimiento de las capas a través del desarrollo (modificado de Itho, M., *The cerebellum and neural control*, 1984),

Uno de los eventos críticos que modulan el desarrollo de muchos grupos neuronales es la actividad sináptica. Las fibras musgosas excitadoras provenientes del puente y médula espinal representan una aferencia sináptica determinante para la diferenciación y la sobrevivencia de las células granulares durante el desarrollo del cerebelo (Altman, 1982). Este evento se lleva a cabo a partir del 5° día postnatal (Arsenio y Sotelo, 1985), con un máximo después del día 10-12 (Altman, 1982). Las células granulares tienen su principal blanco en las células de Purkinje (Burgoyne y Cambray, 1988), las cuáles también influyen en la diferenciación y sobrevivencia de las propias células granulares (Sotelo y Changeux, 1974; Burgoyne y Cambray, 1988).

2.3. NEUROQUIMICA DE LAS CELULAS GRANULARES

Existe una serie de evidencias bioquímicas y fisiológicas que demuestran que las neuronas granulares del cerebelo son glutamatérgicas (Hudson et al., 1976; Fonnum, 1984). A partir de estudios farmacológicos, electrofisiológicos y moleculares se ha

demostrado la presencia de todos los receptores a glutamato en las células granulares del cerebelo. Existen dos grandes grupos de receptores: los preferentes al N-metil-D-aspartato (NMDA) y los de tipo no-NMDA. Estos últimos se subdividen a su vez en 3 dependiendo del mecanismo de acción y agonista preferencial: los receptores al AMPA, al kaínato y los metabotrópicos. Los receptores para NMDA se caracterizan por permitir el flujo de calcio al ser estimulados. Los receptores de tipo NMDA en las diferentes regiones del cerebelo presentan diferentes perfiles farmacológicos que reflejan las distintas isoformas existentes de este receptor en el SNC de mamíferos (Stone y Burton, 1988). Los receptores al AMPA tienen como agonista no selectivo al ácido quisquálico (QUIS), mientras que los receptores al kaínico son activados selectivamente por el propio ácido kaínico (Coyle, 1983). Los receptores de tipo metabotrópico están acoplados a un sistema de señalización mediada por segundos mensajeros.

El glutamato es sintetizado por 5 enzimas principales: glutaminasa activada por fosfato (GAF), aspartato-amino-transferasa (AAT), glutamato-deshidrogenasa, glutamina sintetiza y glutamina descarboxilasa. La GAF y la AAT parecen ser las enzimas más importantes para la formación del neurotransmisor glutamato. La localización y regulación de la GAF son de gran importancia para la síntesis del glutamato. La GAF se encuentra distribuida subcelularmente en mitocondrias. La GAF es un marcador selectivo para terminales de neuronas glutamatérgicas. Existen evidencias que sugieren que la AAT también puede ser marcador de neuronas glutamatérgicas. La AAT se localiza en el cerebro, incluyendo al cerebelo, a manera de dos isoenzimas con diferentes propiedades cinéticas (Fonnum, 1968). Las otras enzimas, como la glutamato deshidrogenasa, parecen no estar directamente relacionadas con la síntesis del glutamato como neurotransmisor, sino con el

metabolismo general del aminoácido en neuronas y células gliales. (Berl; 1962, Clake; 1978).

2.4. PAPEL DEL NMDA Y DEL KCl EN LA VIABILIDAD Y LA SOBREVIVENCIA NEURONAL

Se sabe que la activación de al menos un subtipo de receptor de L-glutamato, el de tipo NMDA, juega un papel importante en algunos de los eventos del desarrollo de las células granulares del cerebelo. La activación de los receptores de tipo NMDA y la despolarización por potasio afectan los procesos de migración de estas neuronas (Rossi et al, 1993; Hockberger et al, 1987). También, contrario a lo que se observa en neuronas maduras, la estimulación de células granulares promueve la sobrevivencia en cultivo. (Gallo et al., 1987; Balázs et al, 1988). Las células granulares reciben aferencias sinápticas excitadoras de tipo glutamatérgico provenientes de las fibras musgosas del puente y la médula (Fonnum, 1984; Garthwaite, y Garthwaite, 1986). En estudios previos, nosotros demostramos que en neuronas granulares de cerebelo el NMDA (150 μ M) y el KCl (40 mM) promueven la activación de la glutaminasa activada por fosfato (PAG) a los 3-5 DIV (Morán et. al., 1992). Este efecto es dependiente de la edad del cultivo y es específico para enzimas relacionadas con la síntesis de L-glutamato como neurotransmisor, ya que otras enzimas como la lactato deshidrogenasa (LDH) y la glutamato deshidrogenasa (GLDH) no modificaron su actividad .

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

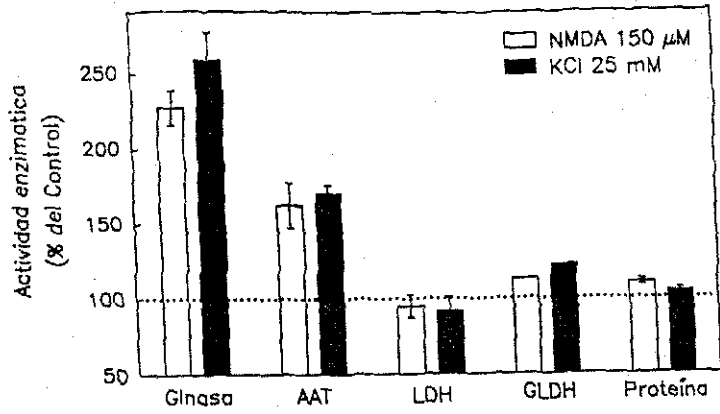


Fig 4. Efecto del KCl y NMDA en la actividad de la glutaminasa y la aspartato aminotransferasa en células granulares. El tratamiento crónico con NMDA y KCl aumentan la síntesis de enzimas que están involucradas con la síntesis del glutamato. Otros parámetros como la actividad de la deshidrogenasa láctica (LDH) y deshidrogenasa glutámica (GLDH) y contenido de proteína no se alteran.

Por otro lado, tanto la despolarización con potasio crónico (25-40 mM) o NMDA (150 μM) también promueven la sobrevivencia de neuronas granulares de cerebelo (Balázs, 1988, 1989, 1990; Gallo et al., 1987). Estas acciones del NMDA contrastan con sus efectos en neuronas maduras donde la activación de los receptores de tipo NMDA tiene un efecto tóxico agudo. Se ha propuesto que este efecto está mediada por un incremento en los flujos de calcio a través de los canales acoplados a los receptores de NMDA (Hartley, 1993) o por la activación de los canales de calcio sensibles a voltaje.

Existen datos experimentales que demuestran que para promover la sobrevivencia y la diferenciación de las células granulares se requiere de un aumento en la concentración intracelular de calcio (Balázs et al., 1992; Gallo, et al, 1987; Irving et al, 1992; Morán et al, 1989; Collins et al., 1991) sin que se conozca exactamente el mecanismo a través del

cual el calcio participa en los mecanismos de la muerte programada y la diferenciación neuronal. El tiempo que estas neuronas en cultivo requieren de potasio o NMDA es relativamente corto y coincide con el tiempo en que las fibras musgosas inervan a las células granulares durante su desarrollo *in vivo* por lo que se cree que la activación de los receptores glutamatergicos y la despolarización de potasio mimetiza el efecto trófico de estas fibras en un periodo crítico del desarrollo de las células granulares en cultivo.

2.5. COMPONENTES EXTRACELULARES DURANTE EL DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO

El funcionamiento del SNC depende del patrón de crecimiento y la conectividad neuronal. Durante la neurogénesis de las células granulares de cerebelo participan varios elementos relacionados con la identidad neuronal, como son moléculas que difunden desde las células blanco y que funcionan como atractores (Ramón y Cajal, 1989; Sperry, 1963), moléculas que promueven el crecimiento neurítico como las de la matriz extracelular (MEC) (Venstrom y Reichard, 1993; Masuda-Nakasawa y Wiedman, 1992), neurotransmisores (Zheng, 1994), neurotrofinas (Ernfors et al., 1994; Hoyle et al., 1993; Diamond et al., 1992) y moléculas que funcionan como guía durante el desarrollo o que regulan la actividad eléctrica necesaria para la formación de patrones precisos de conectividad neuronal (Stryker y Harris, 1986).

Anteriormente se pensaba que los componentes de matriz extracelular tenían como función estructural dar soporte a los tejidos. Sin embargo, ahora sabemos que tienen un papel mucho más activo y que sus componentes se comporta de manera compleja.

Las proteínas que forman parte de la familia de las moléculas de matriz extracelular se clasifican en: glicosaminoglicanos, las proteínas estructurales y proteínas de adhesión celular. Los glicosaminoglicanos son cadenas de polisacáridos no ramificados compuestos de unidades de azúcar (disacáridos) principalmente de N-acetilglucosamina o N-acetil galactosamina. Los principales grupos de glicosaminoglicanos en el sistema nervioso central son los sulfatos de heparano, condroitino, keretano y dermatano. Estos, al unirse a las proteínas, forman los proteoglucanos que también son componentes de MEC relacionados con el almacenaje de factores tróficos que las neuronas emplean durante su desarrollo.

Dentro de las proteínas de carácter estructural están las colágenas y la elastina. Ambas permiten fortalecer y dar flexibilidad a los diferentes tejidos en el sistema nervioso. Dentro de las moléculas de adhesión celular y reconocimiento intercelular se incluyen a la laminina y fibronectina (Alberts et al., 1989). Existe una gran variedad de proteínas de MEC que están relacionadas con los procesos del desarrollo de las CGC (Tabla A) (Venstrom y Reichard, 1998; Masuda-Nakawa y Wiedmann, 1992). Dentro de este grupo se incluye a proteínas que están presentes en el sistema nervioso como son la laminina, la fibronectina, la tenascina y la trombospondina. Estas glucoproteínas están compuestas de dos o más cadenas polipeptídicas.

Moléculas de	Matriz Extracelular	Papel en el crecimiento neurítico
<p>as de ión. proteínas)</p>	<p>Lamininas Fibronectina Tenascinas Trombospondina</p>	<p>Promueven regeneración de neuronas centrales y periféricas. Participa en crecimiento neurítico de neuronas periféricas. Permite la adhesión neuronal. Se presentan durante el desarrollo, particularmente durante la migración de las células de las crestas neurales. Participa en la migración celular y crecimiento neurítico (Neugebauer et al, 1991).</p>
<p>inas cturales</p>	<p>Colágenas Elastina</p>	<p>Las fibras de colágena ayudan a fortalecer y organizar a moléculas de matriz extracelular. Confiere elasticidad al tejido.</p>
<p>oglicanos</p>	<p>Sulfato de heparano (Perlecano) Sulfato de Condroitino (Neurocano) Sulfato de Dermatano (Decorina) Acido hialurónico</p>	<p>Sólo o con laminina promueve el crecimiento neurítico (Hantas-Ambroise et al., 1987). Se expresa sólo en sistema nervioso central y participa en el desarrollo de la corteza cerebral. Se expresa en zonas del sistema nervioso donde hay daño. Participa durante el desarrollo del sistema nervioso, expresándose en grandes cantidades durante este tiempo y posteriormente se degrada.</p>

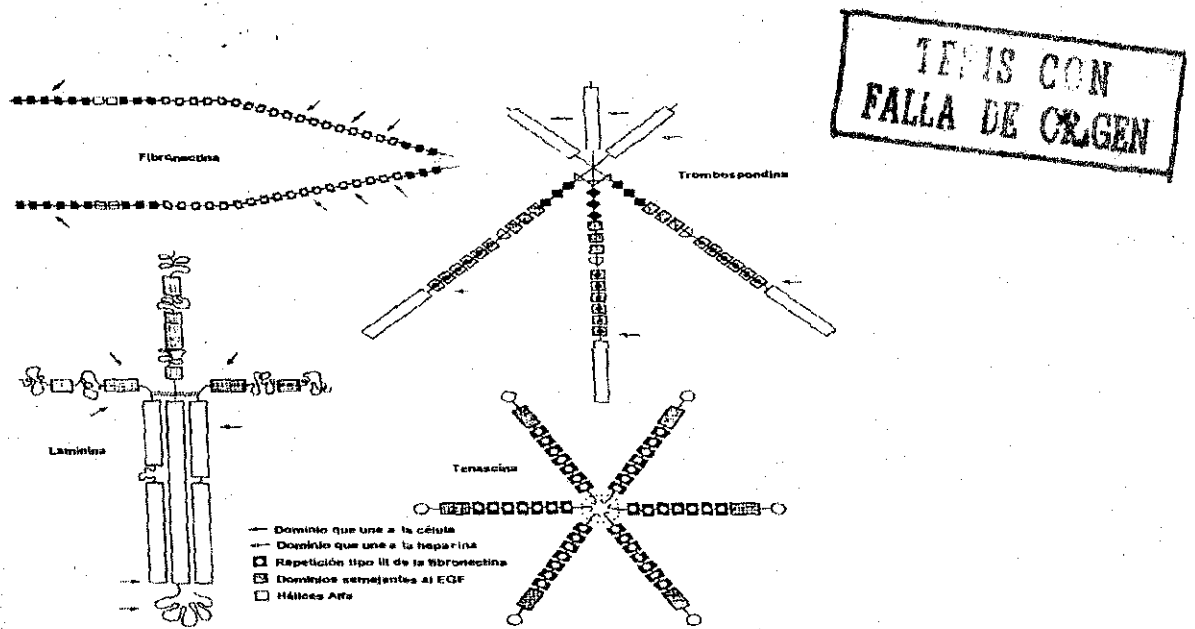
Tabla A. Participación de diferentes moléculas de matriz extracelular en procesos del desarrollo en el Sistema Nerviso Central.

2.6. PAPEL DE COMPONENTES DE LA MATRIZ EXTRACELULAR DURANTE EL DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

Los componentes de las membranas basales biológicas están altamente conservadas a lo largo de la escala filogenética. El papel biológico de gran trascendencia de las membranas basales y su relación con su estructura se ilustran en una gran cantidad de enfermedades en donde su estructura y función se encuentran alteradas. Algunos de los elementos que mayormente constituyen a las membranas basales tienen una función dual. Los componentes de esta matriz basal son, entre otros, colágeno tipo IV y sus variantes genéticas como la laminina, entacnina/nidogenica, fibronectina, osteonectina. Las membranas basales se localizan entre la capa epitelial celular y el tejido conectivo. Existen diferencias estructurales y funcionales entre las membranas basales en diferentes estadios del desarrollo, en diferentes tejidos y en diferentes tipos celulares. La gran diversidad de componentes presentes en las membranas basales parecería estar creada por variaciones en sus elementos como resultado de sustituciones de isoformas genéticas de laminina y colágeno. Dentro de la organización supramolecular se tiene a la laminina como uno de los mayores constituyentes de las membranas basales. Esta es una glicoproteína de 800 kD formada a partir de tres cadenas polipeptídicas (A,B1,B2) que contienen múltiples dominios. La fibronectina y la laminina son dos glicoproteínas mayormente distribuidas en la matriz extracelular que interactúan con integrinas y tienen sus efectos importantes en procesos de adhesión celular. La laminina específicamente es el mayor componente de las membranas basales en tejidos no neurales y de la lámina basal del sistema nervioso periférico. Las diferencias funcionales entre la laminina y sus variantes son un campo aún

no muy explorado. Algunas células o grupo de células necesitan secretar la glicoproteína adecuada y precursores de proteoglicanos en cantidades apropiadas que difunden al espacio. Sin embargo, es su citoarquitectura la principal consecuencia de la estructura y flexibilidad de grandes macromoléculas asimétricas de membranas basales y de la topografía y afinidades en los sitios de unión.

La fibronectina está constituida por dos subunidades unidas por puentes disulfuro, cada una de las cuáles presenta muchos sitios o dominios diferentes de interacción con otras moléculas. La fibronectina es secretada por fibroblastos y por otras células mesenquimatosas se encuentra también en el SNP donde está involucrada con procesos de migración de las células de las crestas neurales y posiblemente con la regeneración de axones dañados. Esta molécula, como las lamininas, está presente en la matriz extracelular en el sistema nervioso inmaduro, siendo necesario para promover el crecimiento del cono axónico (procesos neuríticos). En el sistema nervioso maduro, la laminina y la fibronectina persisten en la periferia, pero están ausentes en el cerebro y médula espinal. Estas moléculas están involucradas también en la migración de las células de las crestas neurales.



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Figura 5. Algunas de las proteínas de matriz extracelular. Cada glicoproteína contienen numerosas cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro (líneas punteadas). La fibronectina y la tenascina presentan varias repeticiones del tipo III de fibronectina, La laminina, la tenascina y la trombospondina tienen varias repeticiones de los dominios al Factor de crecimiento epidérmico (EGF) (modificado Lander (1989) y Nicholls et al.1992).

2.7. PAPEL DE PROTEINAS DE ADHESION Y FACTORES SOLUBLES EN EL DESARROLLO DEL SNC.

La adhesión celular es un requisito indispensable durante el desarrollo, mantenimiento y función de organismos multicelulares. En los últimos años, las glicoproteínas han sido propuestas como mediadoras de los eventos adhesivos entre células en una gran cantidad de tipos celulares. Este tipo de moléculas pertenece a uno de los tres tipos de la familia de las integrinas, así como moléculas de la familia de las inmunoglobulinas, proteínas de adhesión celular (NCAM) independiente de calcio y las

caderinas (N-caderinas) dependientes de calcio. Las proteínas CAM se expresan en el desarrollo tardío del sistema nervioso y están altamente concentradas en los sitios de adhesión. Estas proteínas se estabilizan en los sitios de contacto a través de proteínas de unión (espectrina y ankirina), estabilizando de igual manera los contactos célula-célula o célula-matriz. Las proteínas CAM de tipo neural (N-CAM) realizan contactos célula-célula a través de proteínas que se expresan en células adyacentes a través de dominios extracelulares de las proteínas de adhesión. Estas proteínas interactúan indirectamente con proteínas de citoesqueleto (actina o filamentos intermedios) a través de dominios citoplásmicos.

Las proteínas transmembranales caderinas realizan contactos celulares mediante interacciones homotípicas aunque se ha encontrado que también lo realizan a través de interacciones heterotípicas en varios tipos celulares. La caderina neural (N-caderina) es una de las isoformas que representa una subfamilia dentro de la super familia de caderinas. La región carboxilo terminal es la región que afecta la actividad de la proteína con el citoesqueleto. Otras proteínas citoplásmicas, las cateninas, realizan contactos con el citoesqueleto a través de las caderinas y son importantes para que haya una buena adhesión célula-célula. La propiedad adhesiva de las cateninas se pierde si en el complejo no se encuentra la caderina. La tenacina-C, otro miembro de la familia de proteínas de MEC, está involucrada en procesos de adhesión durante el crecimiento de procesos de neuronas y astrocitos (Gotz y Sholze, 1996; Meiners, 1995; Retting, 1994).

El papel de la MEC en el crecimiento y en la formación de sinapsis ha sido difícil de evaluar por la complejidad estructural y funcional del sistema nervioso. Sin embargo, existen estudios realizados en preparaciones de vertebrados bloqueando selectivamente

moléculas de adhesión, los cuales sugieren una acción concertada de distintas moléculas (Bixby et al, 1988; Chiquet et al, 1988).

Existen otros factores que participan directamente en los procesos del desarrollo del Sistema Nervioso. Esto incluye factores que son liberados por las propias neuronas como los neurotransmisores. La función clásica de los neurotransmisores ha sido la de mediar la comunicación intercelular, sin embargo en fechas recientes, se le han atribuido otros papeles durante el desarrollo del sistema nervioso. Se ha propuesto que la diferenciación y sobrevivencia neuronal podrían estar moduladas por neurotransmisores durante el desarrollo del SNC. Se sabe que muchos neurotransmisores regulan la división celular, la sobrevivencia neuronal, el crecimiento neurítico, la movilidad de procesos y el fenotipo neural. En algunos casos los neurotransmisores funcionan como reguladores negativos. Por ejemplo, en neuronas piramidales de corteza, a diferencia de lo que ocurre en células cerebelares e hipocampales, el glutamato inhibe el crecimiento de neuritas e induce muerte neuronal (Mattson y Kater, 1989). Muchos de estos neurotransmisores tienen que ver con la citoarquitectura del sistema nervioso.

Las acciones tróficas de los neurotransmisores y otros factores parecen estar mediadas por la regulación intracelular de calcio, ya sea por canales iónicos activados por despolarización, por canales acoplados a un neurotransmisor o por reservorios de calcio intracelular. Muchas son las vías de señalización intracelular controladas por neurotransmisores involucradas en el crecimiento de procesos, la movilidad del cono de crecimiento y la muerte neuronal. Existe también una estrecha relación funcional entre receptores de adhesión, proteínas citoplásmicas y del citoesqueleto mediada por fosforilación de los propios receptores proteicos. Se sabe también que la activación de

proteínas cinasas en ciertas células se asocia a una reducción en los procesos de adhesión celular (Stappert et al., 1993).

2.8. PARTICIPACION DE COMPONENTES EXTRACELULARES EN EL DESARROLLO DEL CEREBELO

Son muchos los componentes de matriz extracelular que interactúan durante el desarrollo de neuronas en el Sistema Nervioso Central *in vivo*, sin embargo en el cerebelo poco se sabe acerca de su participación, sobre todo durante el desarrollo. Existen algunos reportes en donde la participación de los componentes extracelulares están relacionados con el proceso de migración y con la elongación durante la sinaptogénesis. En particular, la restrictina, una de las isoformas de la tenascina, promueve el crecimiento neurítico al asociarse a una proteína axonal llamada F11 en células granulares de cerebelo (Norenberget et al., 1996). Por otro lado, la trombospondina parece favorecer los procesos de migración y crecimiento neurítico en células granulares de cerebelo (O'Shea, 1999). En los cultivos de células granulares existe un pequeño grupo de células gliales (alrededor 1-2%) las cuales también parecen sintetizar algunas proteínas de matriz extracelular dentro de las cuales se encuentran la fibronectina, vitronectina y la laminina (Oh et al., 1995) y están relacionadas con la elongación de procesos de oligodendroglia. Por otro, lado se sabe de la expresión de tenascina en astrocitos tipo-2 de ratón adulto donde parece promover la elongación de procesos neuríticos (Bartsch et al., 1993).

Durante el desarrollo del SNC, la interacción entre las neuronas y los componentes extracelulares representa un evento crítico para la adecuada función de muchos de los procesos antes descritos. Es por ello que los procesos de diferenciación y muerte neuronal

podrían ser regulados por la composición y organización del sustrato con relación a la acción trófica dada por el NMDA y KCl en células granulares de cerebelo. Hasta ahora no se conoce la interacción de las células granulares de cerebelo con su sustrato con relación a los procesos de muerte neuronal, diferenciación bioquímica y morfológica. Una estrategia para estudiar este evento sería utilizar sustratos nativos en que los componentes extracelulares se mantengan intactos y que las neuronas crecidas en ellos estén libres de interacciones con otras células o factores.

III. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el papel de la MEC, particularmente las producidas por las células granulares y gliales que se depositan extracelularmente durante los procesos de diferenciación y sobrevivencia de las neuronas granulares de cerebelo. Conocer la influencia de la activación de receptores tipo NMDA y la despolarización por potasio en este proceso.

IV. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Caracterizar morfológicamente las neuronas granulares de cerebelo cultivadas por 5 DIV en diferentes sustratos como poli-lisina y proteínas provenientes de células gliales y neuronales.
- 2) Analizar morfométricamente y relacionar los patrones de crecimiento de las células granulares cultivadas en los diferentes sustratos empleados.
- 3) Estudiar la morfometría, viabilidad y diferenciación bioquímica de células granulares cultivadas en sustratos sintetizadas por neuronas tratadas con NMDA y potasio.
- 4) Analizar las interacciones neurona-glia para conocer el papel de los astrocitos en la morfometría de las células granulares cultivadas en los diferentes sustratos empleado.

III. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el papel de la MEC, particularmente las producidas por las células granulares y gliales que se depositan extracelularmente durante los procesos de diferenciación y sobrevivencia de las neuronas granulares de cerebelo. Conocer la influencia de la activación de receptores tipo NMDA y la despolarización por potasio en este proceso.

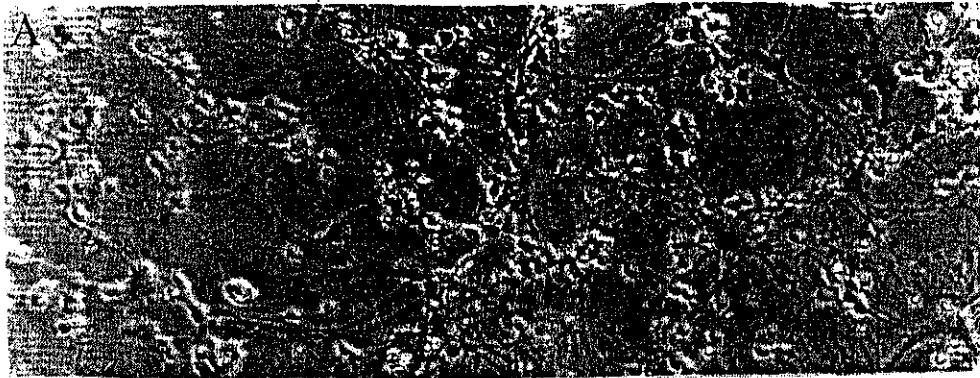
IV. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Caracterizar morfológicamente las neuronas granulares de cerebelo cultivadas por 5 DIV en diferentes sustratos como poli-lisina y proteínas provenientes de células gliales y neuronales.
- 2) Analizar morfométricamente y relacionar los patrones de crecimiento de las células granulares cultivadas en los diferentes sustratos empleados.
- 3) Estudiar la morfometría, viabilidad y diferenciación bioquímica de células granulares cultivadas en sustratos sintetizadas por neuronas tratadas con NMDA y potasio.
- 4) Analizar las interacciones neurona-glia para conocer el papel de los astrocitos en la morfometría de las células granulares cultivadas en los diferentes sustratos empleado.

V. METODOS

5.1. CULTIVO CELULAR

Se obtuvieron cultivos primarios de células granulares de cerebelo mediante la técnica descrita por Patel y Hunt (1985), y Morán y Patel (1989), la cuál consiste en disociar el cerebelo de ratas de 8 días postnatales de manera mecánica utilizando tripsina (0.024%). Las células se sembraron en un medio basal de Eagle suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (GIBCO), 2 mM de glutamina, 50 U/ml penicilina y 50 µg/ml estreptomina. Los animales fueron proporcionados por el bioterio del Instituto de Fisiología Celular. Las células se sembraron en cajas de Petri o tratadas previamente con poli-lisina (5 µg/ml) o en cajas con proteínas de cultivos previos (ver adelante). Las células se sembraron a una densidad a 1.5×10^6 células/ml. Después de 18 hrs se añadió citocina arabinosa (10 µM) para evitar la proliferación de células no neuronales, principalmente astrocitos (Balázs, et al 1988). Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ (4.5%) y aire saturado con vapor de agua (95%) (Morán y Patel, 1989). Los cultivos se trataron con los diferentes fármacos después de dos días de cultivo. En el caso de los cultivos de astrocitos, se procedió de manera similar, excepto que las células se sembraron sin sustratos y no se añadió citosina arabinosa.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 6. Cultivos (control) primarios de CGC a los 5 DIV de cultivo. Estas células son crecidas sobre poli-lisina a densidad normal (1.5 millones de células por ml) (DN).

Con la finalidad de conocer si las células granulares en cultivo son capaces de depositar moléculas proteicas como sustrato extracelular, se evaluó la síntesis de los componentes proteicos celulares y componentes extracelulares mediante la incorporación de leucina -H3. Los cultivos de CGC de diferentes edades (1-5 DIV) se incubaron en presencia de leucina -H3 (1 μ Ci/ml) y leucina fría (50 mM) durante 12 horas. Para evaluar la incorporación del radioactivo total se removió el medio de cultivo y se tomó una alícuota de aproximadamente 1 ml para realizar la cuantificación de radioactividad total en el medio. Se procedió a separar la fracción celular de la fracción extracelular utilizando la técnica de Rennels y Dunsmore (1995). La monocapa de células se extrae incubándose 30 min a 40 C en NH_4OH (0.25 M) + PMSF (1 mM) y EDTA (1 mM). Se lavan los cultivos celulares con PBS + EDTA y se incuban con un buffer dehidroximetil-aminometano por 15 minutos a 40 C. La fracción celular se precipita con 10% de ácido tricloroacético. La fracción extracelular se mantiene en la caja, se procede a solubilizar en NaOH 1N y se precipita con

ácido tricloroacético (TCA) al 100% + albúmina bovina (1 mg). Ambas fracciones se cuentan haciendo uso de un contador de centelleos de radioisótopos

5.2. EXTRACCION DE LA FRACCION EXTRACELULAR A PARTIR DE CULTIVOS CELULARES

Una vez cumplidos los 5 DIV (neuronas) ó 1-3 semanas (astrocitos), los cultivos de CGC en cajas de 2 ml se lavaron con PBS estéril y se procedió a la separación de la fracción celular de la fracción extracelular utilizando la técnica de Rennels y Dunsmore (1995).

Para la obtención de la fracción extracelular los cultivos de CGC se lavaron con PBS/EDTA seguida de una incubación con NH_4OH (0.25 M) conteniendo (PMSF) fluoruro de fenilmetilsulfonil (PMSF) incubándolas por 30 minutos a 4 o C. Se procedió a lavar con una solución estéril de PBS/EDTA a 4oC. Posteriormente, el cultivo se incubó por 15 minutos con una solución fría de tris(hydroximetil)aminomethano(TRIS) en 1M de NaCl. Esta solución con una alta concentración en sales se utilizó para la extracción de la fracción celular. Las neuronas se sembraron directamente sobre la fracción extracelular obtenida de cultivos de neuronas o astrocitos de diferentes edades (1,2 y3 semanas) que permaneció adherida a la caja de cultivo. Esta técnica de disociación tiene la ventaja de mantener todas las proteínas remanentes en la caja de cultivo pertenecientes a la fracción extracelular manteniendo sus características fisicoquímicas intrínsecas. Las neuronas sembradas en estos sustratos se cultivaron por 5 DIV y se procedió a medir viabilidad,

actividad de glutaminasa o los análisis morfométricos (cuantitativos) y patrones de crecimiento. Todo el procedimiento se realizó en condiciones estériles.

5.3. INCORPORACION DE LEUCINA RADIOACTIVA

Los cultivos de CGC se mantienen en su medio de cultivo en presencia de la L-(4,5-³H)leucina-H³ desde el día 1 DIV a una concentración de 0.08 μM (625 μCi/230 μmol). En este estudio el recambio o síntesis de los componentes extracelulares o celulares se cuantifica a partir de la radioactividad precipitada de la fracción extracelular y la precipitación de la celular. Posteriormente a la extracción de la fracción celular previamente descrita (Rennels y Dunsmore, 1995) se procede a solubilizar la fracción extracelular en 1N NaOH 30 minutos y se precipita a 4°C con TCA (Acido Tricloroacético) (100%) en presencia de BSA como acarreador se extraen la fracción y se transfieren a tubos de centrifuga; se añade BSA a los tubos colocando 1/10 del volumen que corresponde a 200 ul; se procede a agitar perfectamente con el vórtex y se precipita con TCA (100%) con 1/10 del volumen total. Se espera 15 minutos y se agita vigorosamente; se procede a centrifugar a 10,000 rpm por 10 minutos se descarta el sobrenadante y se procede a lavar el pellet resuspendiendo en 1.5 ml de TCA/leucina al 10%. El segundo lavado se realiza en una microfuga en tubos eppendorf; se procede a solubilizar el pellet en 250 ul de NaOH 1 N y se espera 15 minutos sin agitar. Se neutraliza con ácido acético 250 ul mezclando bien y se toman 400 μl de la solución colocándose directamente al vial con 5 ml de liquido de centelleo.

5.4. METODO DE HOECHST

Para evaluar el aumento en la síntesis de proteína a las 48 hrs, se cuantificó la cantidad de DNA. Para ello los cultivos de CGC fueron fijadas en 4% de paraformaldehído y teñidas con la marca de DNA Hoechst 33342 (Guo et al., 1997). Esto se realizó en cultivos de CGC crecidas sobre sustratos sintetizados por CGC tratadas al 2 DIV con NMDA (150 μ M) o KCl (40 mM). Los resultados se determinaron como unidades arbitrarias de fluorescencia (u.a. fluorescencia) y se transformaron a μ g/DNA.

5.5 EVALUACIÓN DE LA SOBREVIVENCIA NEURONAL

Para el estudio de la viabilidad celular se utilizó la técnica de transformación de la sal de tetrazolio 3-(3,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difenil) (MTT), Mossman (1983). Esta técnica refleja la actividad mitocondrial mediante la transformación de la sal de tetrazolo por acción de las deshidrogenasas, formando un producto insoluble, el azul de formazán. Para ello, las células se incubaron con MTT (50 μ l) por una hora, se lavaron con PBS y el azul de formazán se extrajo con isopropanol ácido. La concentración de azul de formazán se cuantificó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 570 nm. La cantidad de azul de formazán formado es directamente proporcional al número de células viables en el cultivo. Esta técnica ha sido validada por nuestro laboratorio y otros (Balázs et al., 1990), demostrando una estrecha correlación con otros parámetros de sobrevivencia como actividad de lactato deshidrogenasa, contenido de proteína y DNA e incorporación de compuestos fluorescentes como diacetato de fluoresceína y yoduro de propidio, por lo que esta técnica se considera confiable para medir viabilidad en esta preparación.

5.6. CUANTIFICACION DE LA ACTIVIDAD DE LA GLUTAMINASA ACTIVADA POR FOSFATO.

La actividad de la glutaminasa activada por fosfato (PAG) se utilizó como una medida de diferenciación neuronal. Se ha demostrado que la PAG participa directamente en la síntesis del neurotransmisor glutamato y puede ser usado como marcador de diferenciación neuronal (Kvamme y Olsen, 1980). La metodología consiste en la incubación del homogenado del tejido con el sustrato radioactivo de la PAG, glutamina-¹⁴C (0.5 mM U-¹⁴C-glutamina, 5.45 μ Ci/ μ mol, 2.5Ci/ml) en un buffer conteniendo: Na (PO₄), 20 mM; NaCl, 90 mM; KCl, 56 mM; manitol, 100 mM y sacarosa, 30 mM; MgCl₂, 5 mM; oligomicina, 10 μ g/ml; antimicina 0.6 μ g/ml; HEPES, 4 mM; pH 7.4. Los homogenados se incubaron 20 min a 37 °C, e inmediatamente se paro la reacción con 1 ml de agua fría. Las muestras se pasaron por una columna de intercambio iónico. La columna se lavó con 5 ml de agua y 6 ml de ácido acético 5 mM. El eluido del último lavado con 6 ml de ácido acético 0.5M, que contiene el glutamato-¹⁴C sintetizado, se colectó y se cuantificó la reactividad.

5.7. CUANTIFICACION DE PROTEINAS

La cuantificación de proteína se realizó mediante la técnica descrita por Bradford (1976). Se tomaron alícuotas de 10 μ l del tejido homogenado y se mezclaron con una solución que contiene 100 mg de azul de Coomassie, 50 ml de etanol al 95% y 100 ml de ácido fosfórico. Después de 10 minutos se midió la absorbancia a 595 nm. La concentración de proteína se calculó a partir de una curva estándar con concentraciones conocidas de albumina bovina.

5.8. INMUNOHISTOQUIMICA

Las células granulares crecidas sobre los diferentes sustratos experimentales antes descritos se sembraron en pozos de 0.5 mm. Después de 5 días en cultivo, las células granulares de cerebelo se lavaron con TBS dos veces por tres minutos y después se fijaron con alcohol al 100% por 20 minutos. Después de lavar con TBS nuevamente se procedió a bloquear por 1 hr con albúmina-TBS al 5% en hielo. Los anticuerpos diluidos: GFAP, (proteína acidica fribilar glial) un anticuerpo específico de glia y MAP, (proteína asociada a microtúbulos) un anticuerpo específico de neuronas, fueron añadidos a la reacción por 24 hrs. Los cubreobjetos se lavaron con TBS dos veces por tres minutos y se incubaron por 24 hrs con GFAP anticuerpo policlonal contra GFAP (1:500) o anticuerpo policlonal contra MAP2 (1:1000). Se lavaron los cubreobjetos con TBS y se colocó un segundo anticuerpo policlonal contra GFAP-biotinilado o anticuerpo policlonal MAP2-biotinilado. Todos los portaobjetos se trataron con el complejo ABC a temperatura ambiente, se lavaron y posteriormente se les agregó DAB y se lavaron con TBS por 5 minutos. Pasado este tiempo, los portaobjetos se sometieron a un proceso de rehidratación, colocándolos en alcoholes de diferentes concentraciones para montar las preparaciones en Permound y observarlas por microscopia de Nomarski. Se procedió a tomar fotografías de diferentes campos al azar.

5.9 EVALUACION MORFOLOGICA

Las neuronas fueron examinadas por microscopía de contraste de fase y microscopía Nomarski. Se tomaron fotografías y se obtuvieron imágenes por medio de un analizador de imágenes acoplado a un sistema óptico a través de un controlador de cámara. También se evaluó la morfología individual de las células granulares, reconstruyendo y digitalizando la imagen aumentada del cultivo de células.

La evaluación morfométrica de las CGC se cuantificó a densidad normal (DN) (1.5 millones de células/ml) y densidad baja (0.4 millones de células/ml) (DB). Se midieron entre 14-18 células individuales en los cultivos a los cultivos de CGC se trataron los 2 DIV con N-metil-D-aspartato 150 μ M o KCl 40 mM. Los cultivos de astrocitos se mantuvieron por 1,2 o 3 semanas. Como parámetros morfométricos se analizaron la longitud y diámetro total de procesos, somas, número de ramificaciones y distribución de neuritas que proyectan desde el soma celular. Para ello se tomaron imágenes digitales en el analizador de imágenes (2000 ima/b/i=1), el cual consiste en un microscopio acoplado a una computadora que digitaliza la imagen. En el programa contiene comandos para el almacenamiento y digitalización de las imágenes obtenidas en el microscopio. De esta manera, se almacenaron las imágenes tomando células individuales en cada una de las condiciones experimentales y posteriormente se almacenaron en discos para su procesamiento. El analizador de imágenes calibró en pantalla haciendo uso de una reglilla de 20x que corresponde a 370 μ m y otra de 40x que corresponde a 170 μ m antes de iniciar las cuantificaciones morfométricas, quedando de esta manera explícitos los puntos de

referencia por los cuáles la computadora evaluó la distancia en μm de estructuras que conforman el análisis cuantitativo de este trabajo.

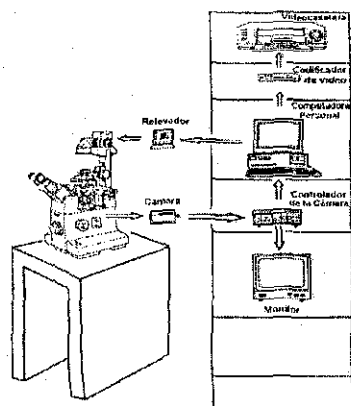


Figura 7. Sistema analizador de imágenes. Las imágenes obtenidas en el microscopio son captadas por la cámara CCD, digitalizadas y almacenadas en discos.

6.0. ESTADISTICA

Se emplearon métodos estadísticos donde se trató de analizar directamente las condiciones aleatorias y la obtención de réplicas de cada una de ellas. Se realizó una comparación múltiple de las medias contra el control utilizando la prueba de Dunnet asociada al análisis de varianza (ANOVA). Este análisis es una prueba exacta para la hipótesis de igualdad en las medias de los tratamientos y puede aplicarse si los supuestos para la prueba se cumplen ($<0.05\%$). En el análisis de los datos siempre se verificó que los valores de ANOVA se cumplieran. Los datos se tabularon y se realizó el análisis estadístico (\bar{X} , δ estándar). Los valores del promedio de viabilidad neuronal, actividad

enzimática y promedio de cada uno de los parámetros morfométricos se graficaron con sus valores de desviación (<0.05) con una $n > 10$ en todos los casos experimentales.

VI. RESULTADOS

6.1. Incorporación de leucina radioactiva a proteínas de fracciones celular y extracelular.

Con la finalidad de conocer si las células granulares en cultivo son capaces de depositar moléculas protéicas como sustrato extracelular, se evaluó la síntesis de los componentes proteicos celulares y componentes extracelulares mediante la incorporación de leucina -H³. Los cultivos de CGC de diferentes edades (1-5 DIV) se incubaron en presencia de leucina -H³ (1 µCi/ml) y leucina fría (50 mM) durante 12 horas. Se separó la fracción celular de la extracelular mediante la técnica de Rennels y Dunsmore (1995) y se cuantificó la radioactividad presente en ambas fracciones. De esta manera, observamos un aumento significativo en la marca radioactiva en la fracción extracelular entre los 2 y 3 DIV, que coincide también con un aumento de radioactividad en la fracción celular a los 2 DIV (Figura A). Esto sugiere que las CGC sufren un aumento en la síntesis general de proteínas a las 48 horas que podría reflejar un crecimiento celular general y/o un incremento en el número de células. Por otro lado, también ocurre un incremento en el depósito de proteínas extracelulares particularmente a los 2 y 3 DIV.

6.2. INTERACCIONES CELULARES EN CULTIVO

Las células granulares de cerebelo miden alrededor de 5-8 µm y ocupan aproximadamente 1/3 de la masa total del cerebelo. Durante el transcurso de la neurogénesis de estas células se observa una sobreproducción de varios tipos neuronales, seguida por la muerte de un gran porcentaje de la población. Esto se interpreta evolutivamente como una estrategia para establecer el número correcto de neuronas y

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Incorporación de 3H-Leucina

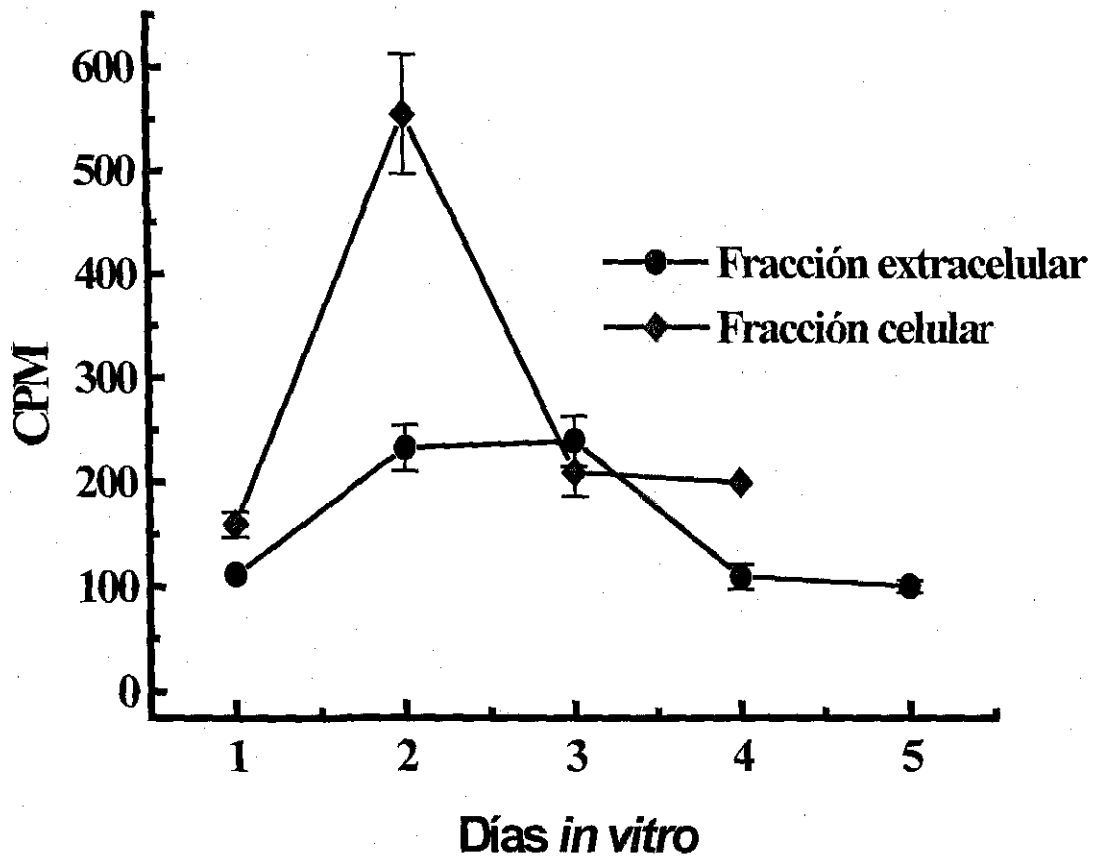


Figura A. Caracterización de la síntesis de moléculas extracelulares en cultivos primarios de células granulares durante 5 DIV. Los experimentos se realizaron incorporando Leucina-H3 diariamente por 5 DIV en proteínas correspondientes a la fracción celular y extracelular. Promedio+E.E.ANOVA $p < 0.05$.

conexiones apropiadas que finalmente constituirán el sistema nervioso maduro (Oppenheim, 1991). Las CGC son abundantes y fáciles de cultivar. La pureza va hasta un 95% de neuronas. Otra ventaja es que las neuronas se desarrollan postnatalmente y esto proporciona la posibilidad de medir o estudiar procesos de diferenciación, migración y sobrevivencia que ocurren *in vivo* y que se reflejan en el cultivo. Se sabe que los cultivos de CGC presentan sólo 1-2% de otros tipos neuronales como las células en canasta. Es por esto que este tipo de cultivos se han utilizado ampliamente como modelo de estudio. Los cultivos de las CGC presentan una morfología *in vitro* característico similar a lo observado en el cerebelo completo. Lo somas de estas células son refringentes, turgentes y sus procesos son gruesos. Estos últimos se empaquetan cuando las CGC se siembran a una densidad de 1.5 millones células/ml formando haces de procesos.

Los astrocitos se encuentran en bajas cantidades bajo las condiciones de nuestro cultivo. Estas células gliales presentan una forma estrellada y rugosa en su membrana y presentan procesos muy largos. Estos procesos probablemente tengan la función de atraer nutrientes a las neuronas aledañas a ellos. Al parecer estas estructuras ayudan a mantener las concentraciones de K en el espacio extracelular.

6.3. Morfometría y morfología de células granulares en cultivo sembradas en los diferentes sustratos experimentales.

Se procedió a cuantificar tanto la morfología como los patrones de crecimiento y la morfometría de las CGC crecidas sobre las distintas fracciones extracelulares. Todas las CGC se cultivaron durante 5 DIV. Un grupo de CGC se sembraron directamente sobre

polilisina (PLL). Un segundo grupo de CGC se sembraron sobre la fracción extracelular de CGC cultivadas previamente durante 5° DIV. Otro grupo de CGC se sembraron sobre CGC cultivadas también por 5° DIV, pero en presencia de N-metil-D-aspartato (NMDA; 150 μ M) o KCl (40 mM). Un último grupo de CGC se sembraron sobre fracción extracelular de astrocitos cultivados previamente durante 1,2 ó 3 semanas. Se emplearon dos densidades diferentes de CGC cultivadas sobre los distintos sustratos: una de ellas fue de 1.5 millones de células/ml (densidad normal) (Morán y Patel; 1989) y otra de 0.4 millones de células/ml (densidad baja).

6.3.1. Morfología

6.3.1.1. Células Granulares cultivadas sobre componentes de células granulares

6.3.1.1.1. Densidad normal

Las CGC crecidas durante 5 DIV sobre polilisina (PLL) muestran somas redondos y turgentes con una tendencia a formar pequeños cúmulos y procesos poco evidentes (Fig. 1a). Cuando las CGC se cultivaron sobre los componentes producidos por CGC cultivadas previamente por 5 DIV, se observa una tendencia a formar agregados de mayor tamaño unidos por procesos largos y gruesos sobre los cuáles se detectan CGC migrando (Fig. 1b). El tercer grupo de CGC fué cultivado sobre los componentes producidos por CGC cultivadas previamente por 5 DIV en presencia de NMDA (150 μ M) (Fig. 1c) o KCl (40 mM) (Fig. 1d). Bajo estas condiciones, se aprecian procesos más largos, somas más pequeños y con una mayor tendencia a agruparse que en las CGC control crecidas sobre PLL.

Morfología y Morfometría de CGC en diferentes sustratos experimentales.

TEJIDOS CON
FALLA DE ORIGEN

Morfología



FIG. 1a.

CGC crecidas sobre PLL a los 5 DIV. Se observan somas turgentes y redondos. Cúmulos pequeños y procesos poco evidentes.

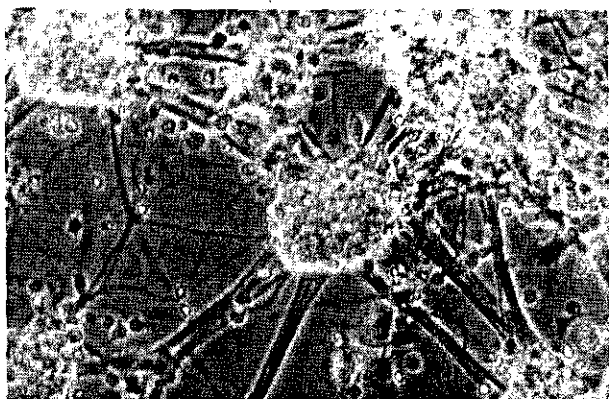


FIG. 1b

CGC crecidas sobre matriz sintetizada por CGC. Existe un mayor número de agregados. Los procesos son mas gruesos y largos. Se observan muy pocas células individuales.



FIG. 1c

CGC crecidas sobre matriz sintetizada por CGC condicionada con NMDA. Se observan los procesos mas largos y delgados. Los somas son pequeños y con una tendencia a agregarse (vs. Ctról, PLL).

6.3.1.1.2. Densidad baja

Las características morfológicas de las células granulares observadas a densidad normal cambiaron cuando sembramos a las células granulares bajo las mismas condiciones experimentales pero a una baja densidad (0.4-0.6 millones células/ml).

En estos cultivos bajo las mismas condiciones experimentales a baja densidad se observan células granulares con somas turgentes, procesos cortos y delgados, con una clara tendencia a agregarse con otras células. Bajo estas mismas condiciones se presenta la formación de algunos cúmulos celulares en el plato de cultivo (Fig. 2b). En presencia de cultivos de MEC tratadas con NMDA (150 μ M), los somas celulares son más grandes, turgentes, y los procesos son largos y delgados. Se aprecian contactos entre células que recorren largas distancias. Existe una tendencia en todo el cultivo a agruparse entre ellas y se llegan a formar pocos cúmulos presentes en el cultivo (Fig.2c). Con KCl (40 mM), la morfología es muy parecida a lo que se observa en NMDA (150 μ M), los procesos son largos y conectan varias células a distancia (Fig. 2d). Los somas son turgentes y más pequeños en comparación con células crecidas sobre PLL y células crecidas sobre sustratos generados por ellas mismas (control) (Fig. 2a.). La tendencia a agruparse es clara.

6.3.1.2. Granulares sobre componentes extracelulares de astrocitos.

6.3.1.2.1. Densidad normal

La morfología de las células granulares a densidad normal (1.5 millones de células/ml) expuestas a macromoléculas generadas por astrocitos es completamente atípica a lo que normalmente se observa en el cultivo. En todos los casos probados se observan cúmulos muy evidentes con formaciones muy grandes, anchas y largas. No se observan

Morfología de las células granulares crecidas a densidad baja en diferentes sustratos experimentales en cultivo.

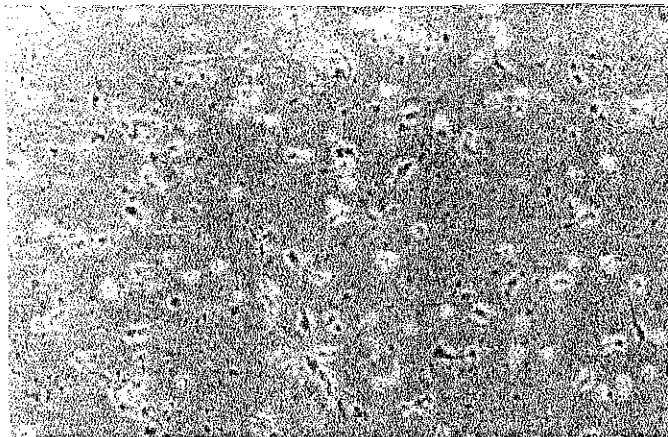


Figura 2a. Células granulares crecidas en cultivo por 5 DIV a baja densidad en PLL.

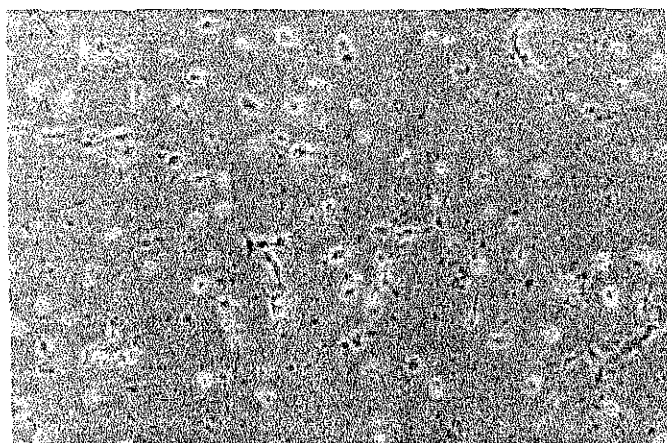
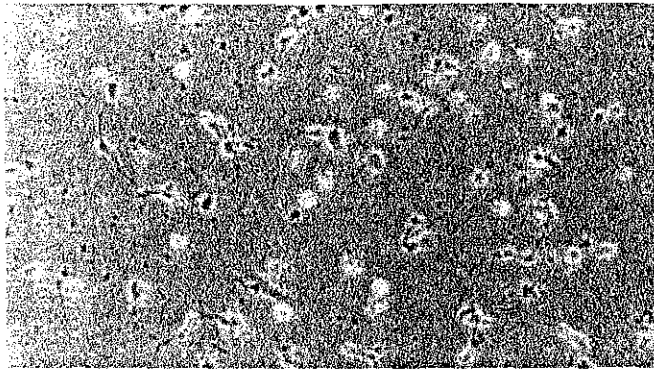


Figura 2a. Células granulares crecidas en cultivo por 5 DIV a baja densidad en PLL.

Morfología de células granulares crecidas a
densidad baja en diferentes sustratos
experimentales en cultivo.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 2b. Células granulares crecidas
en cultivo por 5 DIV a baja densidad en
proteínas extracelulares sintetizadas por
CGC.

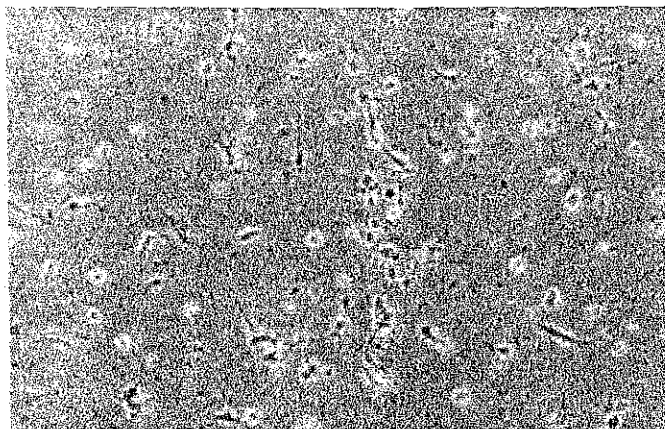
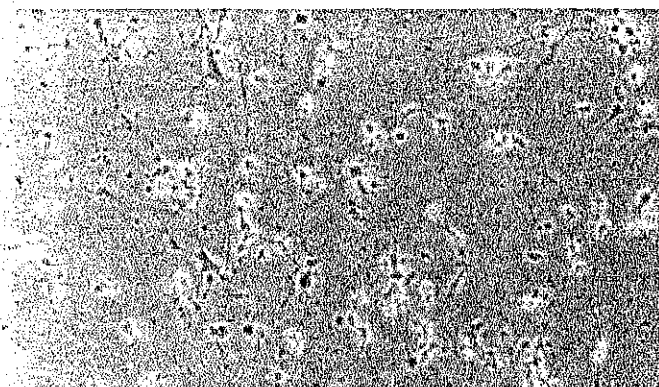


Figura 2b. Células granulares crecidas
en cultivo por 5 DIV a baja densidad en
proteínas extracelulares sintetizadas por
CGC.

Morfología de células granulares crecidas a densidad baja en diferentes sustratos experimentales en cultivo.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 2c. Células granulares crecidas en cultivo por 5 DIV a baja densidad en sustratos de proteínas extracelulares mas NMDA.

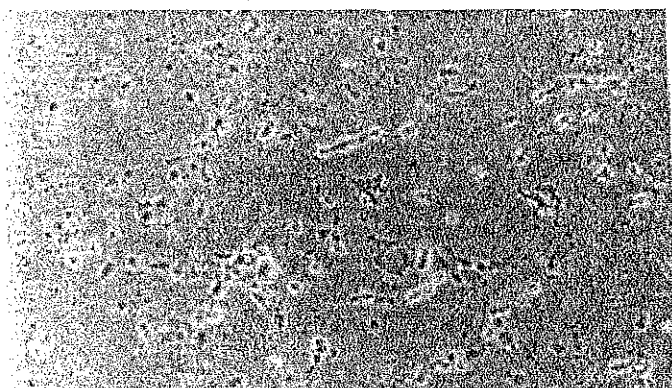
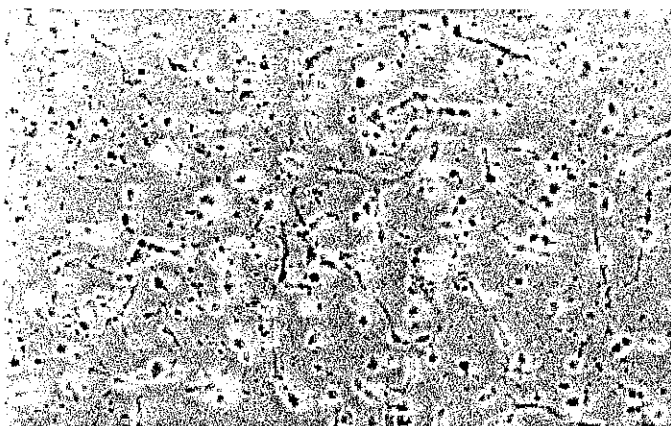


Figura 2c. Células granulares crecidas en cultivo por 5 DIV a baja densidad en sustratos de proteínas extracelulares mas NMDA.

Morfología de células granulares crecidas a densidad baja en diferentes sustratos experimentales en cultivo



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 2d. Células granulares crecidas en cultivos por 5 DIV a baja densidad en sustratos de proteínas extracelulares más KCL.

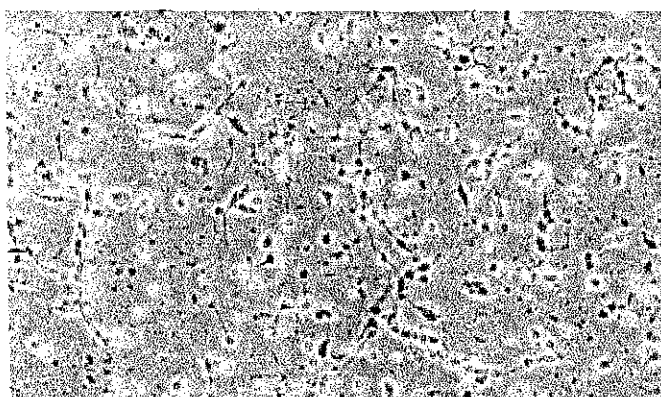


Figura 2d. Células granulares crecidas en cultivos por 5 DIV a baja densidad en sustratos de proteínas extracelulares más KCL.

muchas células individuales. Se observan procesos muy gruesos que al parecer son el producto de la agrupación de un gran número de procesos de células individuales. Se aprecian con menor frecuencia.

6.3.1.2.2. Densidad baja

Las células granulares crecidas sobre macromoléculas sintetizadas por astrocitos de diferentes edades a baja densidad (0.4-0.6 millones de células/ml) no ejercen un efecto tan claro como el que se observa en cultivos a densidad normal (1.5 millones de células/ml). Las células parecen crecer en agregados, en algunos casos sobre astrocitos (aunque esto no es muy común). Los somas son de tamaño pequeño, aunque los procesos son un poco más largos y delgados. La presencia de astrocitos es evidente y su presencia varía de un cultivo a otro.

6.3.3. MORFOMETRIA

Para la evaluación morfométrica se tomaron los cultivos de las CGC a DN y DB. Para los experimentos a DB se recopilaron los datos morfométricos de 12-14 células individuales por condición experimental y por cultivo de diferentes DIV y para los experimentos a DN se cuantificaron los cúmulos y procesos que son el resultado de la fusión de varias células agrupadas. Se consideraron como parámetros morfométricos para este trabajo: los diámetros de somas, procesos, la longitud total de los procesos, el número de neuronas en el cultivo, y número de ramificaciones por célula. Las imágenes se almacenaron y analizaron en un procesador de imágenes.

6.3.3.1 Células granulares crecidas sobre componentes de células granulares.

6.3.31.1 Densidad normal

La cuantificación morfométrica de las células granulares en los cultivos que fueron crecidos sobre sustratos sintetizados por células granulares a densidad normal (1.5 millones de células/ml) al 5 DIV en presencia de NMDA (150 μ M) (Tabla I). Estos cultivos forman cúmulos ($x=43.62\pm 12$ μ m de diámetro) y se alcanzan a contar sólo $x=151$ células /caja, por la formación de los cúmulos en la caja de cultivo. Los procesos neuronales son mucho más largos ($x=5192\pm 36$ μ m) y más gruesos ($x=21\pm 77$ μ m) en comparación con el control (granulares sobre PLL) (Tabla I). En las células crecidas sobre PLL al 5 DIV no hay formación de cúmulos, las células están dispersas a lo largo y ancho de la caja de cultivo, los somas son pequeños ($x=32\pm 5$ μ m) y los procesos son más delgados ($x=0.576\pm 0.2$ μ m), cortos ($x=6660\pm 68$ μ m) y en ocasiones fragmentados (Tabla I). En presencia de sustratos condicionados con KCl (40 mM), las células se extienden a lo largo y ancho del cultivo, formando un mayor número de cúmulos ($x= 39.46\pm 4.65$ μ m) y los procesos son largos ($x=5249 \pm 50$ μ m) y anchos (41.07 ± 6 μ m). Se realizaron experimentos a tiempos más largos (6 DIV) y se observaron células granulares que comienzan a degenerar, particularmente en aquellos cultivos de granulares crecidas en sustratos con NMDA (150 μ M); los procesos se fragmentan y los cúmulos se disgregan en la caja de cultivo. A diferencia de lo que ocurre en cultivos de células granulares expuestas a sustratos condicionados con KCl (40mM) que se mantienen hasta el 12 DIV, que se preservan en buenas condiciones, lo cual sugiere un posible efecto trófico por el KCl a tiempos más largos en cultivo. Esta cuantificación morfométrica es el resultado de la suma de estructuras que se unen unas con otras para formar estos agregados celulares. Es por esto que se procedió a la cuantificación de la

morfología bajo estas condiciones, pero en cultivos a baja densidad para de esta manera identificar células aisladas y evidenciar si lo que se observa en cultivos a DN se reproduce en neuronas aisladas en cultivos DB.

6.3.31.2. Densidad baja

Los datos morfométricos de las células granulares en cultivo DB (0.4-0.6 millones de células/ml) fueron tomados al 5 DIV bajo las mismas condiciones experimentales dispuestas a DN. Las células granulares en DB expuestas a MEC (proteínas extracelulares) sintetizadas por granulares, parecen no tener diferencias en el diámetro de los somas ($x=7.087 \mu\text{m}$) ni en el diámetro de los procesos ($x=1.20 \mu\text{m}$) con respecto a la poli-lisina (somas $x=6.56 \mu\text{m}$; procesos $x=1.13 \mu\text{m}$)(Fig.3). La longitud de los procesos de las células expuestas a sustratos de proteínas extracelulares puras disminuye ($x=387.87 \mu\text{m}$)(Tabla II) con respecto a la longitud de los procesos de las células expuestas a PLL ($x=586 \mu\text{m}$). Las granulares expuestas a proteínas extracelulares condicionadas con NMDA ($150 \mu\text{M}$) y KCl (40mM) si presentan cambios (Fig.4). Los cambios más importantes fueron el diámetro de somas y procesos con respecto al control (PLL) (Tabla II), así como la longitud de los procesos (NMDA $x=665 \mu\text{m}$; KCl $x=586 \mu\text{m}$) con respecto al control (PLL; $x=500 \mu\text{m}$) (Tabla II). La longitud de los procesos bajo estas últimas dos condiciones se incrementa hasta un 25 % con respecto al control (PLL) (Tabla II).

El número de células parece no verse modificado con respecto al control (PLL) (Tabla II). El número de ramificaciones por célula es de 2 a 4 en todos los casos (Fig 6). La formación de cúmulos es una característica intrínseca de los sustratos experimentales ya que los cultivos control (PLL) no presentan esta característica de distribución celular en

TESIS CON
FALLA DE CÉLGEN

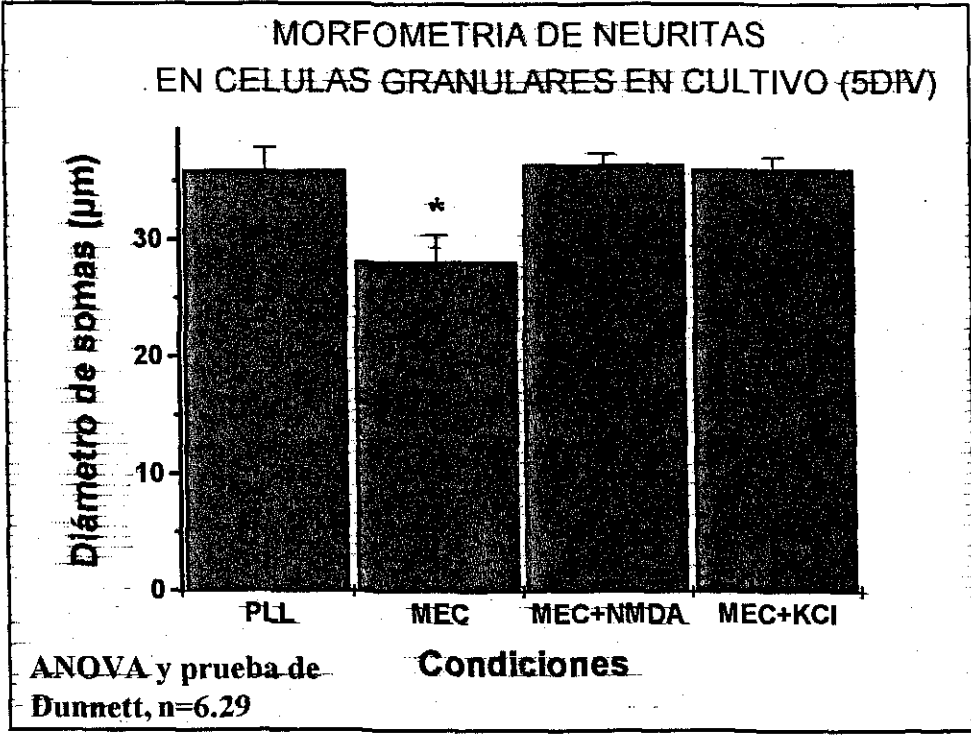


Fig.3.- Diámetro de los somas de las células granulares en cultivo sembradas en diferentes sustratos sintetizados por estas células y en presencia de NMDA y KCl. Promedio + E.E. n= 10-15 células individuales en experimentos independientes. ANOVA de una vía. $P < 0.05$ entre grupos.

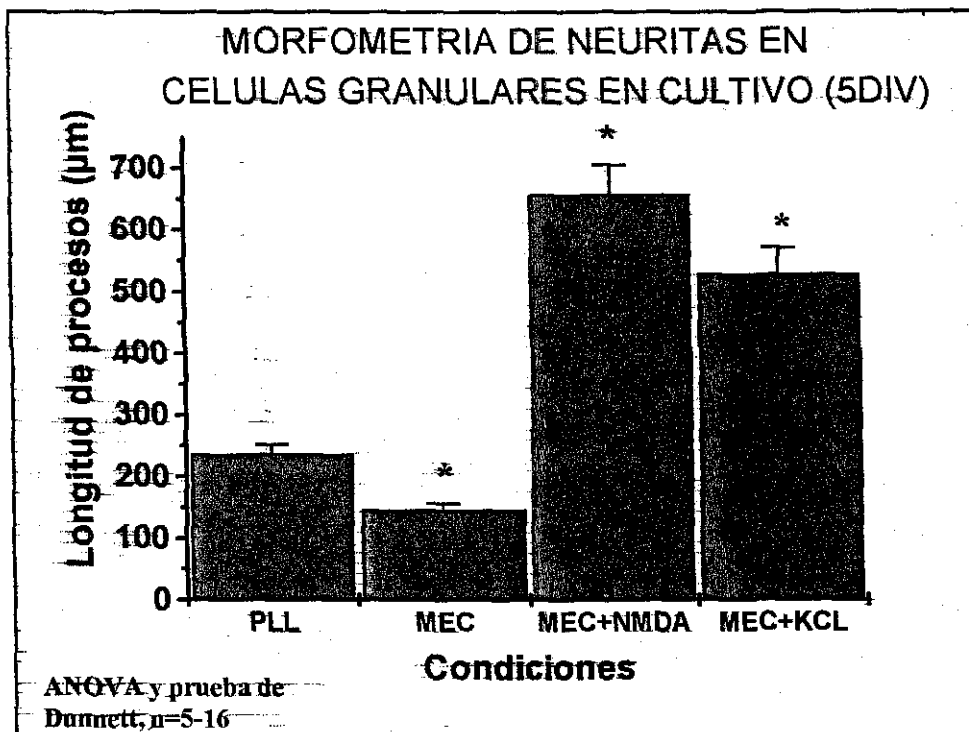


Fig.4.- Longitud de los procesos de las células granulares en cultivos sembrados en diferentes sustratos sintetizados por estas células y en presencia de NMDA y KCl. Promedio + E.E. n= 10-15 células individuales en experimentos independientes. ANOVA de 1 vía $p < 0.05$ entre grupos.

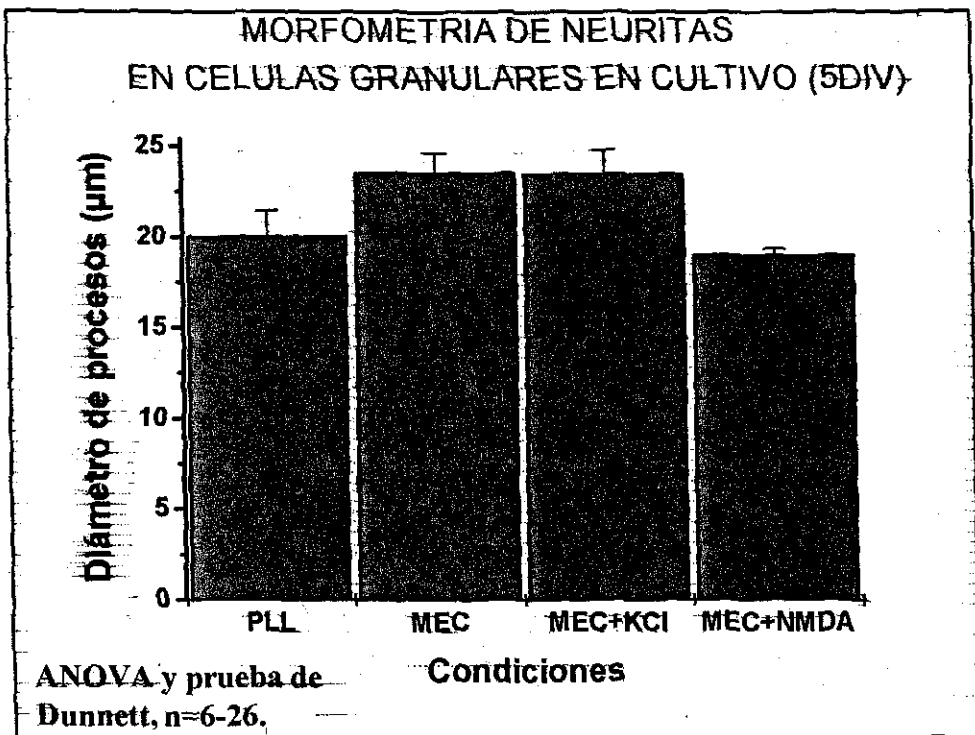


Fig. 5.- Diámetro de los procesos de las células granulares en cultivos sembrados en diferentes sustratos sintetizados por estas células y en presencia de NMDA y KCl. Promedio + E.E. n= 10-15 células individuales en experimentos independientes. ANOVA de 1 vía $p < 0.05$ entre grupos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

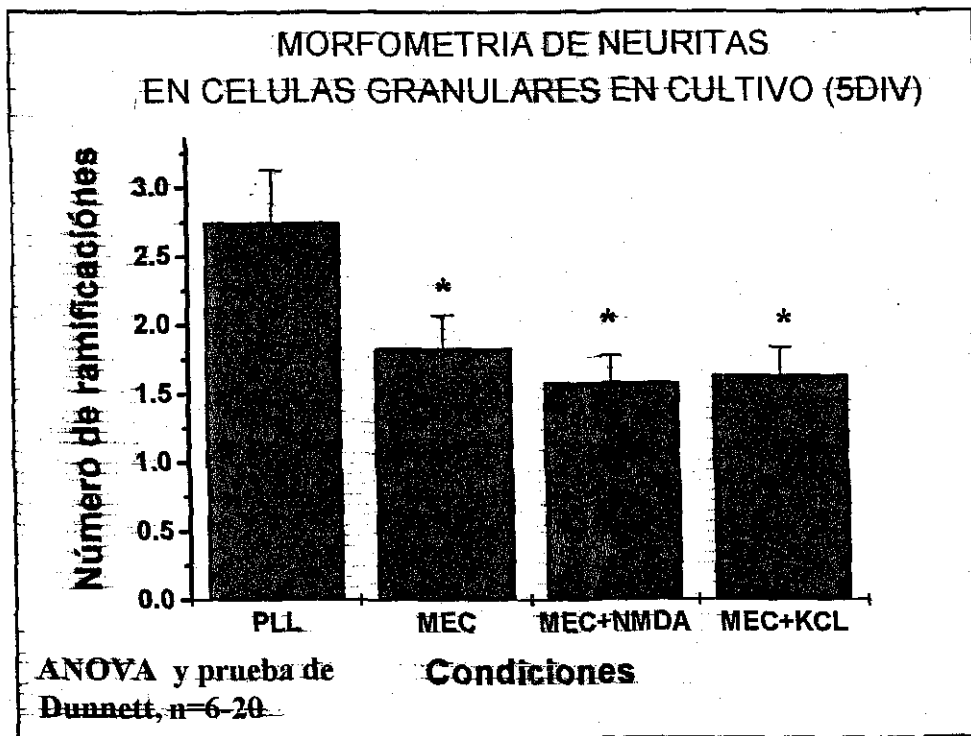


Fig. 6.- Número de ramificaciones de las células granulares en cultivos sembrados en diferentes sustratos sintetizados por estas células y en presencia de NMDA y KCl. Promedio + E.E. n= 10-15 células individuales en experimentos independientes. ANOVA de 1 vía $p < 0.05$ entre grupos.

Cuantificación morfométrica de células granulares de 5 DIV a densidad normal.

Condición	Area (μm)	No. de células	Diámetro somas (μm)	Diámetro procesos (μm)
Gran/PLL	113107.8	212	32.36 \pm 145	0.576 \pm 0.297
Gran/Ctrol	119084.1	180	39.46 \pm 4.6	22.21 \pm 5.3
Gran/NMDA	119676.5	151	42.76 \pm 13.31	21.97 \pm 7.7
Gran/KCl	117876.1	132	41.076 \pm 6.05	41.07 \pm 6
Gran/NMDA	97252.55	387	43.30 \pm 5.586	24.063 \pm 19.92
Gran/KCl	114387	451	40.720 \pm 7.69	26.461 \pm 14.23

Longitud de procesos (μm).	Ramificaciones por célula	Presencia de cúmulos	Diámetro de cúmulos (μm)
6660.685	2 a 4	No	-----
5363.37 \pm 38.2	2 a 4	Si	26.548 \pm 6.7
5192.86 \pm 36	2 a 4	Si	43.625 \pm 12.425
5249.56 \pm 50.9	2 a 4	Si	39.461 \pm 4.65
9740.9 \pm 19.92	2 a 4	Si	37.300 \pm 5.56
9135.02 \pm 32	2 a 4	Si	40.720 \pm 7.699

Tabla I. Valor cuantitativo de las CGC en cultivos primarios a 1.5 millones de células/ml se crecieron sobre diferentes sustratos sintetizados y depositados por CGC y se trataron al 2° DIV con NMDA (150 μM) y KCl (40 mM).

Cuantificación morfométrica de células granulares de 5° DIV . Densidad baja (DB).

Condición	Diámetro procesos (μm)	Diámetro soma (μm)	No. neuritas principales	Longitud de procesos (μm)
PLL	x= 1.1314 d= 0.144	x= 6.566 d= 1.05	2.28	500
MEC	x= 1.2046 d= 0.14	x= 7.087 d= 1.57	3.5	387.87
NMDA	x= 0.545 d= 0.054	x= 3.807 d= 0.37	3.3	665.85
KCl	x= 0.541 d= 0.147	x= 3.803 d= 0.256	varias	586.17

Tabla II. Valores cuantitativos de las CGC en cultivos primarios a 0.3-0.4 millones d células/ml crecidas sobre diferentes sustratos sintetizados y depositados por CGC tratadas con NMDA (150 μM) y KCl (40 mM) en cultivos a DB.

Cuantificación morfométrica de células granulares de 5° DIV . Densidad baja (DB).

(Continuación)

Condiciones Experimentales	No. de células totales en el cultivo.	Area Total en el cultivo. (μm)	Presencia de cúmulos en el cultivo.
PLL	x=212	x=113107.761 μm	NO
MEC	x=180	x=119084.085 μm	SI
NMDA	x=151	x=119676.5 μm	SI
KCl	x=132	x=117876.07 μm	SI

Tabla II. Valores cuantitativos de las CGC en cultivos primarios a 0.3-0.4 millones d células/ml crecidas sobre diferentes sustratos sintetizados y depositados por CGC tratadas con NMDA (150 μM) y KCl (40 mM) en cultivos a DB.

cultivo. Las células control se distribuyen a largo y ancho de la caja (35mm). Los cúmulos parecen aumentar en tamaño en sustratos puros (Proteínas extracelulares (MEC) $x=22.21\mu\text{M}$) y en aquellos sustratos condicionados con NMDA ($x=43.62\mu\text{M}$) y KCl (40 mM) ($x=39.46\mu\text{M}$).

6.3.3.3. Células cracidas sobre componentes extracelulares de astrocitos.

6.3.3.3.1. Densidad normal

En el caso de la evaluación morfométrica de las células granulares crecidas sobre sustratos sintetizados por astrocitos de 1,2 y 3 semanas a DN (1.5 millones de células/ml), se observó una organización muy diferentes a los observado hasta ahora en este tipo de cultivos. Se observan cúmulos muy grandes de diámetro promedio de los 3 grupos experimentales (1,2 y 3 semanas) ($x=109\pm 52\mu\text{m}$) y son muy evidentes a la 3ª semana (Tabla III). Los procesos son muy largos ($x=470\pm 48\mu\text{m}$ a la 1º semana; $x=2460\pm 51\mu\text{m}$ a la 2º semana y $x=700.77\pm 29\mu\text{m}$ a la 3º semana;). La distribución en estos cultivos fué completamente atípica, comparándola con otros cultivos. Las estructuras entonces tienden a agruparse entre ellas por lo que se observan estructuras tan grandes y diferentes a lo observado en cultivo. Con el fin de tener datos mas precisos sobre las presentes mediciones se procedió a estudiar en células individuales en cultivos a DB.

6.3.3.3.2 Densidad baja

Las células granulares expuestas a proteínas extracelulares sintetizadas por astrocitos (1,2 y 3 semanas) presentan cambios significativos en el diámetro de los somas (Fig 7), particularmente en sustratos depositados por astrocitos de 1 ($4.125\pm 1.95\mu\text{m}$) y 3

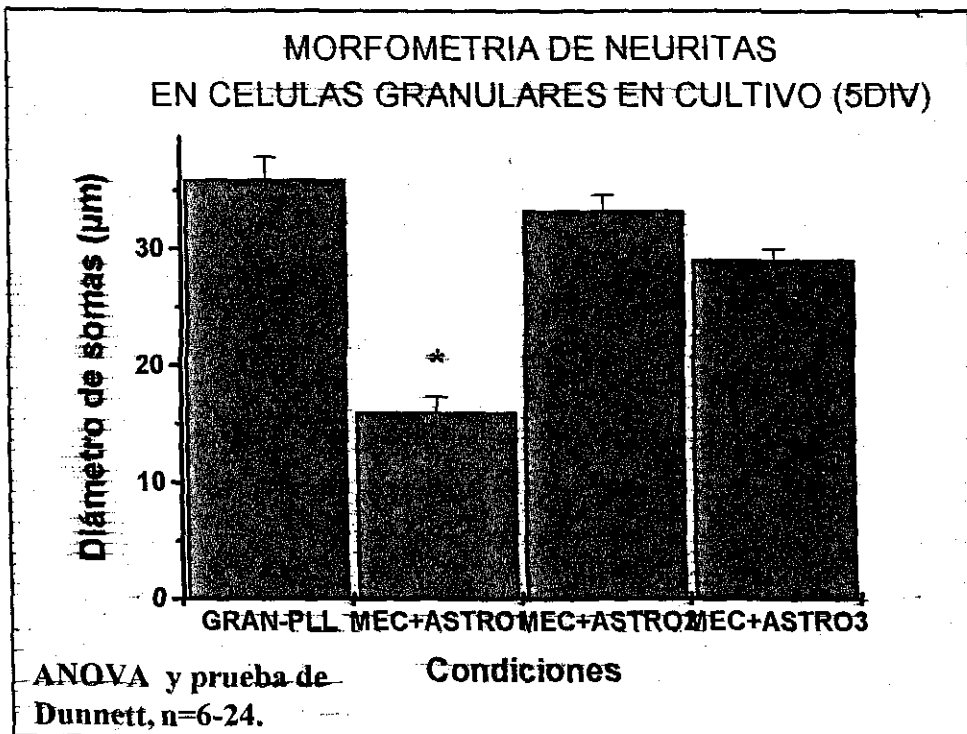


Fig.7.- Diámetro de los somas de las células granulares en cultivo sembradas en diferentes sustratos sintetizados por astrocitos de 1,2 y 3 semanas de edad. Promedio + E:E: n=10-15 células independientes en experimentos independientes. ANOVA de 1 vía $p < 0.05$ entre grupos.

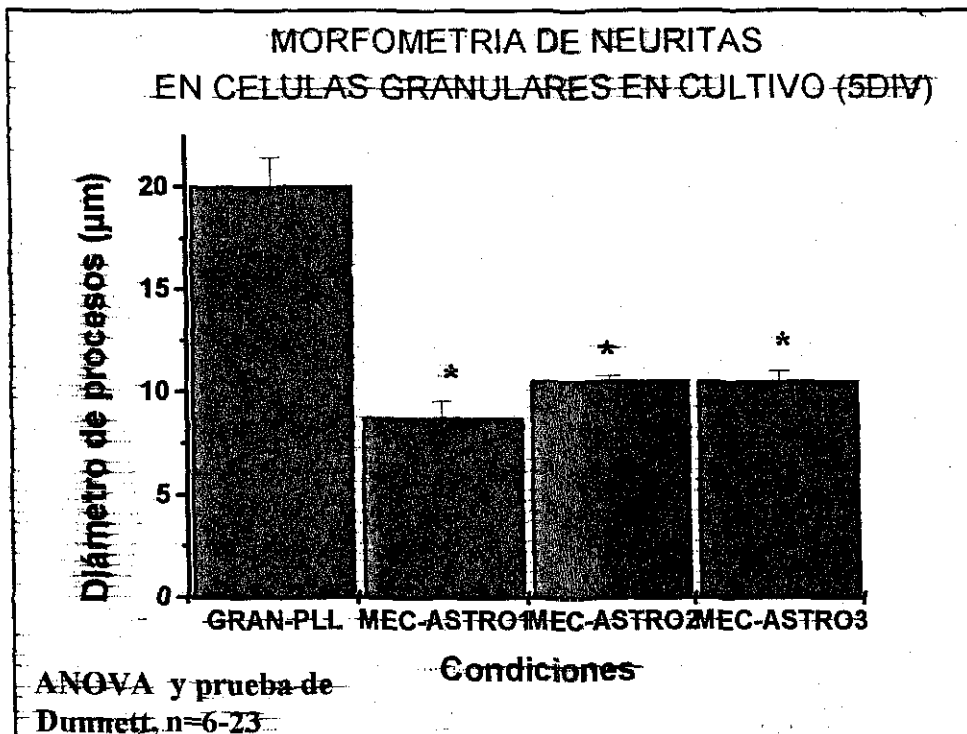


Fig. 8.- Diámetro de los procesos de las células granulares en cultivo sembradas en diferentes sustratos sintetizados por astrocitos de 1,2 y 3 semanas de edad. Promedio + E.E: n=10-15 células independientes en experimentos independientes. ANOVA de 1 vía $p < 0.05$ entre grupos.

18

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

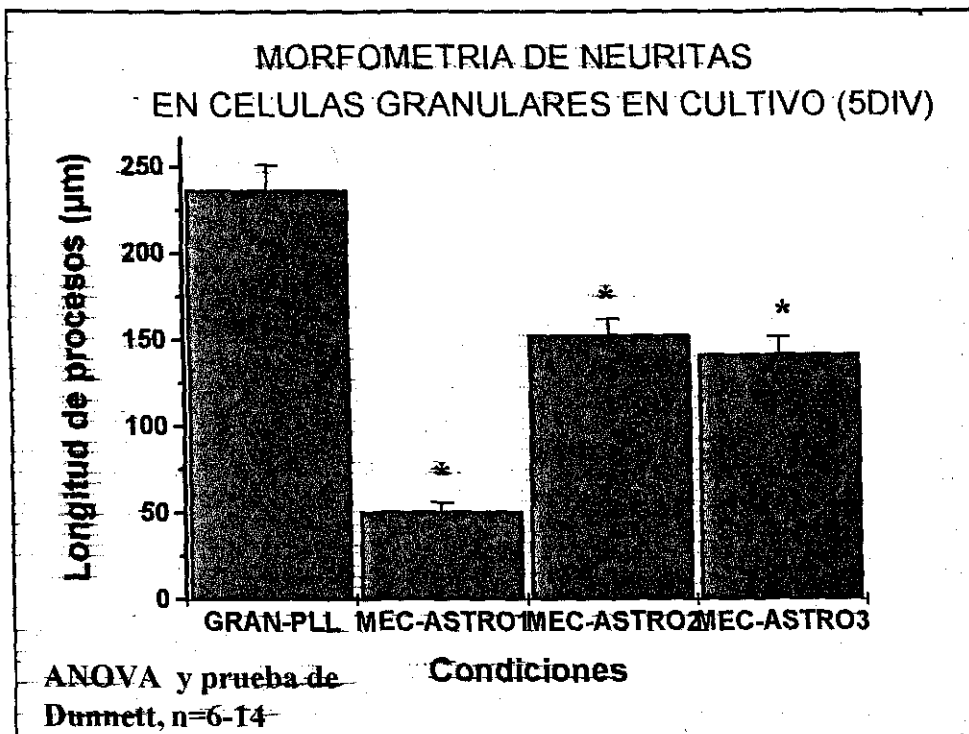


Fig. 9.- Longitud de los procesos de las células granulares en cultivo sembradas en diferentes sustratos sintetizados por astrocitos de 1,2 y 3 semanas de edad. Promedio + E:E: n=10-15 células independientes en experimentos independientes. ANOVA de 1 vía $p < 0.05$ entre grupos.

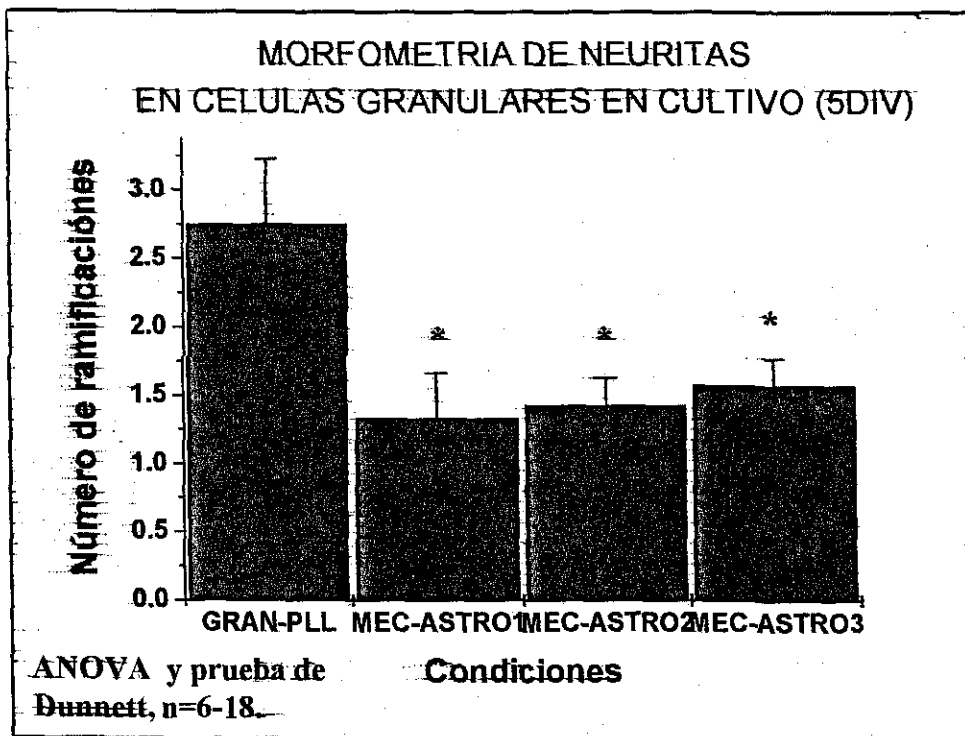


Fig.10.- Número de ramificaciones de las células granulares en cultivo sembradas en diferentes sustratos sintetizados por astrocitos de 1,2 y 3 semanas de edad. Promedio + E.E: n=10-15 células independientes en experimentos independientes. ANOVA de 1 vía $p < 0.05$ entre grupos.

Cuantificación morfométrica de células granulares de 5° DIV. Densidad normal (DN).

Condición	Area (μm)	No. de células	Diámetro de somas(μm)	Diámetro de procesos(μm)
Gran/Astro (1 semanas)	117849.9	-----	-----	26.710 \pm 10.9
Gran/Astro (2 semanas)	118136	62	39.622 \pm 5.014	29.33 \pm 15.212
Gran/Astro (3 semanas)	118777.2	-----	-----	33.50 \pm 6.633

Long. de procesos (μm)	Ramificaciones por célula	Presencia de cúmulos	Diámetro de cúmulos (μm)
470.3 \pm 48.6	3 en adelante	Si	100.477 \pm 73.77
460.315 \pm 15.212	3 en adelante	Si	84.16 \pm 46.96
700.775 \pm 29.5	3 en adelante	Si	145.26 \pm 37.56

Tabla III. Valores cuantitativos de las CGC en cultivos primarios a 1.5 millones de células/ml crecidas sobre diferentes sustratos sintetizados y depositados por astrocitos de 1, 2 y 3 semanas de edad *in vitro*.

Cuantificación morfométrica de células granulares de 5° DIV. Densidad baja (DB).

Condición	Diam. procesos(μm)	Diam. somas (μm)	No.neuritas principales	Long. Procesos (μm)
PLL	x= 1.25	x= 6.76	x= 2.36	x=463.23
AST1	X=1.5014	X=4.215	varias	x=384.04
AST2	x=1.894	X=5.86	varias	x=466.71
AST3	X=0.918	X=4.353	varias	x=401.02

Tabla IV. Valor cuantitativo de las CGC en cultivos primarios a 0.3-0.4 millones de células /ml crecidas sobre diferentes sustratos sintetizados y depositados por células astrocitos de 1,2 y 3 semanas de edad.

semanas de edad ($4.35 \pm 2.19 \mu\text{m}$) con respecto al control (PLL) ($x=6.76$) (Tabla IV). Las neuronas expuestas a proteínas extracelulares de astrocitos de 1,2 y 3 semanas de edad también presentan cambios significativos en el diámetro de los procesos (Fig.8) (1sem $x=1.50$; 2sem $x=1.89$; 3 sem $x=0.918$) con respecto al control en PLL ($x=1.25$) (Tabla V). Cuando se siembran las CGC sobre los mismos sustratos existe una disminución en la longitud de los procesos en todas las condiciones experimentales (1sem $x=50\mu\text{m}$; 2 sem $x=150\mu\text{m}$; 3 sem $x=148\mu\text{m}$) con respecto al control en PLL ($x=230\mu\text{m}$) (Fig.9). El número de ramificaciones parece ser diferente (1 sem $x=1.25$ ramificaciones; 2 sem $x=1.30$; 3 sem $x=1.40$ ramificaciones) a lo que ocurre con el control sobre PLL ($x=2.75$ ramificaciones) (Fig.10).

6.4. Viabilidad Celular

Todos los experimentos de viabilidad se realizaron en cultivos a alta densidad debido a la sensibilidad de la técnica que no define suficientemente en los cultivos a baja densidad (0.4-0.6 millones de células/ml). En los cultivos a densidad normal a diferencia de lo observado en la morfología y a los datos morfométricos, un incremento en la viabilidad celular de un 25% en aquellos cultivos de células granulares crecidas sobre el sustrato generado por ellas mismas (Fig. 11). Este aumento en la viabilidad celular no se observa en células granulares a densidad normal crecidas sobre sustratos generados por astrocitos. Los cultivos de células granulares expuestas a un sustrato generado por ellas mismas parece tener por sí mismo buenas propiedades adhesivas, lo cual permite mantener a las células en buenas condiciones.

Transformación de MIT como medida
de viabilidad celular

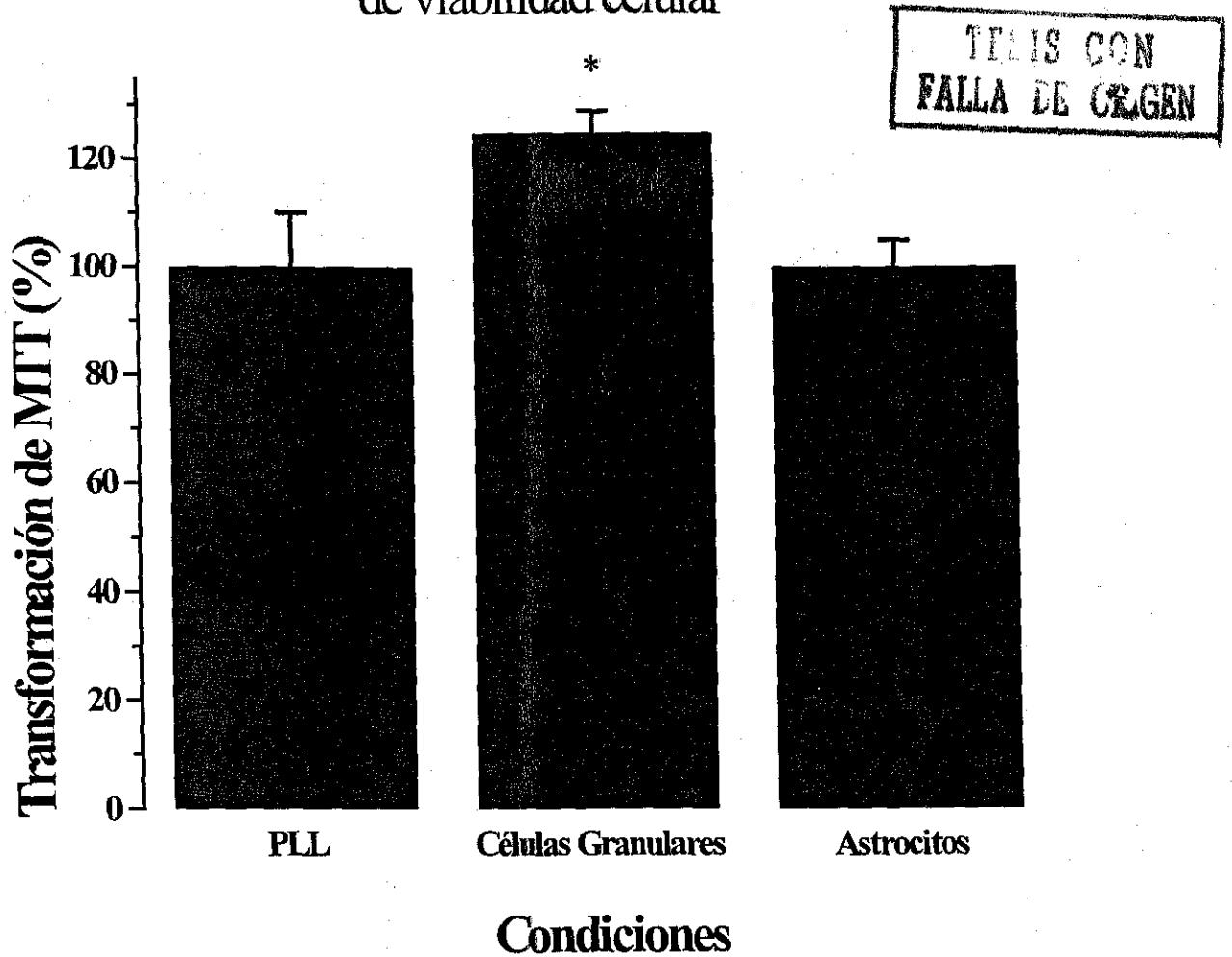


Figura 11. Evaluación de la viabilidad de células granulares crecidas sobre sustratos sintetizados y depositados en el cultivo durante 5 DIV sintetizados por granulares o por astrocitos. Posteriormente se siembran las células granulares sobre estos sustratos y se mantienen por 5DIV. La viabilidad se evaluó al 5 DIV. Promedio + E.E. n=15-20 experimentos independientes.

Los resultados de los experimentos con MAP-2 se muestran en la Fig. 16 y se muestran el crecimiento de las CGC cuando éstas células se crecen sobre sustratos en diferentes condiciones experimentales (PLL, proteínas extracelulares, proteínas extracelulares+NMDA, proteínas extracelulares+KCl). La presencia y distribución de las CGC en todas las condiciones experimentales resultó ser independiente al crecimiento de los astrocitos que se llegan a observar en pequeñas cantidades en el cultivo.

VII. DISCUSIÓN

Una de las preguntas más importantes en la neurobiología del desarrollo es conocer como las células crecen y encuentran sus blancos para durante el proceso de conformación del cerebro. Durante el desarrollo de las células granulares "*in vivo*" participan diversas moléculas que interactúan con ellas en los diversos procesos de neurogénesis, aportando el sustrato para las interacciones célula-sustrato ó célula-célula. De esta manera, se ha propuesto que la conectividad entre neuronas estaran reguladas por una acción conjunta entre moléculas que promueven la adhesión celular (Hynes, 1992), la proliferación, la migración (Shiga et al, 1991). Existen muchos factores involucrados en los eventos del desarrollo en el cerebelo. Las moléculas de la matriz extracelular son la primera señal con la que las células se enfrentan al inicio de su desarrollo. Por otro lado, la adhesión celular característica de este grupo de proteínas (Reichardt .et al, 1991) y la actividad eléctrica (Van del Valk et al., 1991) son dos de los multiples elementos que participan de manera activa en la formación de patrones de crecimiento; es decir, en la organización celular que conforma la estructura trilaminar característica del cerebelo y del sistema nervioso maduro (Sheppard et al., 1991).

Los resultados de los experimentos con MAP-2 se muestran en la Fig. 16 y se muestran el crecimiento de las CGC cuando éstas células se crecen sobre sustratos en diferentes condiciones experimentales (PLL, proteínas extracelulares, proteínas extracelulares+NMDA, proteínas extracelulares+KCl). La presencia y distribución de las CGC en todas las condiciones experimentales resultó ser independiente al crecimiento de los astrocitos que se llegan a observar en pequeñas cantidades en el cultivo.

VII. DISCUSIÓN

Una de las preguntas más importantes en la neurobiología del desarrollo es conocer como las células crecen y encuentran sus blancos para durante el proceso de conformación del cerebro. Durante el desarrollo de las células granulares "*in vivo*" participan diversas moléculas que interactúan con ellas en los diversos procesos de neurogénesis, aportando el sustrato para las interacciones célula-sustrato ó célula-célula. De esta manera, se ha propuesto que la conectividad entre neuronas estaran reguladas por una acción conjunta entre moléculas que promueven la adhesión celular (Hynes, 1992), la proliferación, la migración (Shiga et al, 1991). Existen muchos factores involucrados en los eventos del desarrollo en el cerebelo. Las moléculas de la matriz extracelular son la primera señal con la que las células se enfrentan al inicio de su desarrollo. Por otro lado, la adhesión celular característica de este grupo de proteínas (Reichardt .et al, 1991) y la actividad eléctrica (Van del Valk et al., 1991) son dos de los multiples elementos que participan de manera activa en la formación de patrones de crecimiento; es decir, en la organización celular que conforma la estructura trilaminar característica del cerebelo y del sistema nervioso maduro (Sheppard et al., 1991).

La matriz extracelular no es tan sólo una red proteica que ejerce soporte y sostén a los tejidos y células, sino también comunica de manera directa o indirecta a través de vías de señalización intracelular (Hynes, 1992), cuyo efecto ejercería una función biológica. La regulación de la expresión de componentes de matriz extracelular se sabe que modula finamente los procesos del desarrollo y regeneración del sistema nervioso central y periférico (Lefcort et al, 1992).

En este trabajo evaluamos la participación de estos componentes extracelulares en la morfología, sobrevivencia y diferenciación de las células granulares en cultivos primarios en presencia de diferentes sustratos mantenidas en condiciones tróficas como el N-metil-D-aspartato, o la despolarización con KCl que promueve la sobrevivencia y diferenciación postnatal de las CGC y que se ha propuesto que mimetiza el efecto de las fibras musgosas provenientes de áreas fuera del cerebro que inervan a las CGC durante su desarrollo. Las influencias presinápticas tienen un papel trófico en los procesos de diferenciación neuronal (Morán y Patel, 1989). El glutamato, a través del receptor de tipo NMDA, parece estar implicado en estos procesos. Los cultivos de CGC requieren de condiciones despolarizantes para su sobrevivencia y desarrollo (Gallo et al, 1987). En trabajos previos, se demostró que el NMDA produce un efecto trófico utilizando como marcador de diferenciación a la Glutaminasa activada por fosfato (GAF), una enzima implicada en la síntesis del glutamato. De igual manera, la despolarización con potasio (otro estímulo trófico) permite a las CGC mantenerse en el cultivo por largos períodos de tiempo.

Para este tipo de estudios, las células granulares del Sistema Nervioso Central ofrecen ventajas que van desde el poder aislar neuronas individuales (cultivos a baja

densidad) e identificarlas en el plato de cultivo y evaluar las interacciones de las CGC con otros tipos celulares. Estos cultivos representan una preparación aislada y homogénea en la que se puede seguir con exactitud el grado de maduración celular y permite el control farmacológico para evidenciar características morfológicas de cada entidad bajo diferentes estímulos experimentales. La primera señal con la que se encuentran las células granulares son las proteínas extracelulares que ejercen diferentes funciones fisiológicas además de promover la estructura y forma celular.

Dentro de los aspectos morfológicos el sustrato generado por las CGC de neuronas y astrocitos permite una buena adhesión al sustrato, permitiéndole a las células tener diferentes características morfológicas asociadas a su función. Las CGC crecidas a DN en sustratos de CGC tratadas con NMDA o Potasio, al igual que las CGC crecidas en sustratos de astrocitos, presentan una organización celular atípica con formación de cúmulos muy grandes y procesos gruesos. Al parecer esta nueva organización que adoptan las CGC *in vitro* no es más que la suma de las interacciones entre células. Sin embargo, aquellas CGC tratadas con NMDA y Potasio presentan cúmulos mucho más grandes y procesos más gruesos y largos. Para evaluar si estos cambios se reproducían en células individuales, se procedió a cuantificar estructuras individuales y comprobar si estos efectos atípicos eran en realidad efectos tróficos que ejercían las moléculas de matrix extracelular sobre neuronas y procesos o existía una acción conjunta con NMDA y Potasio que podría incrementar el efecto trófico. Para ello, sabemos que el sustrato puede influir en el patrón de crecimiento de las células granulares y otros tipos celulares, esto, aunado al efecto trófico del NMDA y Potasio en el cultivo de las CGC. Los patrones de crecimiento de los cultivos de CGC a DB no se ven alterados. La cuantificación morfométrica de las CGC crecidas en presencia

de N-metil-D-aspartato (NMDA) y Potasio (KCl) son más largos cuantificados al 5° día de cultivo (DIV) comparándola con el control. Sin embargo, los diámetros de somas y procesos parecen ser menores a los controles. Esto se puede atribuir a la expresión diferencial de los componentes de matriz extracelular que se presentan a estos tiempos en cultivo (Sheppard et al., 1991). Los componentes implicados en los procesos de migración celular característicos en estos tiempos durante el desarrollo podrían estar en mayor concentración a diferencia de otros (Mecham, 1992; Sheppard et al., 1991).

Si estos cultivos crecen en condiciones despolarizantes (KCl 25 mM ó NMDA 150µM), ó en sustratos sintetizados previamente por CGC o astrocitos, la viabilidad celular aumenta (25-30%) con respecto al control de PLL, lo sugeriría que la adhesión, ya sea directamente a las proteínas depositadas por las células (CGC o astrocitos) o las interacciones célula-célula, juegan un papel importante en la viabilidad neuronal. En experimentos *in vitro* se ha observado una alta concentración de proteínas justo en los sitios de adhesión, por lo que la unión entre el interior celular y el exterior está dada por la organización molecular de los sitios de adhesión. Muchas otras proteínas están involucradas en este complejo adhesivo (talina, tenascina) que funcionan como proteínas de anclaje. Aquí se muestra que el NMDA y el KCl en presencia del sustrato, inducen cambios en la longitud de los procesos en cultivos a baja densidad y una disminución en el diámetro de somas y procesos. Sin embargo, el efecto del sustrato y la despolarización por NMDA y KCl parecen ser dos vías diferentes. Pareciera que el estímulo trófico dado por NMDA y Potasio ejercen un efecto adicional en la longitud de los procesos comparándolo con la longitud de los procesos, de CGC control, y aún en CGC crecidas sobre proteínas extracelulares (MEC). Los patrones de crecimiento de las células granulares expuestos a

las diferentes condiciones sugieren que el NMDA y el KCl participan en el crecimiento de estas células por la formación de cúmulos a densidad alta (DN) y densidad baja (DB). Al parecer, las proteínas extracelulares (MEC) sintetizadas tanto por neuronas como por astrocitos, actúan de manera similar propiciando cambios positivos en las CGC. Para documentar estos cambios con mayor exactitud, realizamos un análisis de la distribución de las neuritas en la periferia de la neurona. A los 5° DIV de crecimiento de las células granulares sobre los diferentes sustratos se observó una distribución de entre 2 a 4 ramificaciones por célula (Tabla IV), al parecer sin ningún patrón establecido. En las CGC crecidas en proteínas de astrocitos de diferentes edades se encontraron varias ramificaciones por células. El sustrato sintetizado por células granulares en cultivo a baja densidad sólo modifica algunos de los parámetros morfológicos cuantificados morfométricamente de las células granulares. Particularmente, esta diferencia morfométrica se encontró en la longitud de los procesos de las células granulares expuestas a macromoléculas sintetizadas por células granulares en presencia de NMDA (150 μ M) y KCl (40mM).

Los receptores de adhesión involucrados en la interacción célula-célula o célula-sustrato están reguladas a través de una cascada de señales en respuesta a los procesos de diferenciación y crecimiento neuronal. Las señales de calcio que se generan a través del receptor de tipo NMDA o la despolarización por Potasio también están involucradas en las vías de señalización intracelular que promueven diferenciación. Esto se realiza a través de proteínas sensibles a calcio activando enzimas involucradas en el metabolismo y diferenciación de las CGC, como son la aspartato amino-transferasa (AAT) y glutaminasa activada por fosfato (GAF), sin alterar otras enzimas involucradas en el metabolismo general de la célula, así como en la sobrevivencia de este tipo neuronal. Al parecer ambas

VIII. CONCLUSIONES

- 1.- Las proteínas extracelulares producidas por neuronas y astrocitos parecen ser un buen sustrato para la adhesión y maduración morfológica de las CGC en cultivo.
- 2.- Las proteínas extracelulares producidas por neuronas y astrocitos promueven la viabilidad de las CGC. Este efecto parece ser potenciado por NMDA y KCl.
- 3.- Bajo ninguna condición experimental se afecta la actividad de la glutaminasa activada por fosfato (GAF).
- 4.- Existe un patrón de crecimiento coincidente de neuronas expuestas a los diferentes tratamientos tanto a DN y DB. Sin embargo, esto únicamente se aplica a cultivos en presencia de sustratos sintetizados por células y no en cultivos crecidos sobre PLL.
- 5.- Los efectos encontrados en cultivos de células granulares a baja densidad, al parecer no igualan las características morfológicas encontradas en los cultivos a alta densidad bajo ninguna condición utilizada hasta ahora. Esto nos indica que las células granulares tienen dependencia por otras células y probablemente este tipo de interacciones célula-célula, célula-glia, promueve un mayor crecimiento y un aumento en la sobrevivencia celular en este tipo de preparaciones.

6.-Las proteínas extracelulares de neuronas granulares de cerebelo promueven una disminución en el diámetro de somas y procesos. Este efecto negativo al parecer también se observa en las CGC crecidas sobre sustratos sintetizados por astrocitos de 1 semana de edad *in vitro*.

7.-Las proteínas extracelulares si parecen afectar el número y viabilidad de estas células en sustratos sintetizados por ellas mismas. Este efecto se observa en el número de células presentes en el cultivo desde el día 2 de cultivo en aquellas neuronas crecidas sobre sustratos condicionados con NMDA y Potasio, lo cual también se ve reflejado en la viabilidad neuronal que fue mayor en las neuronas expuestas a NMDA y Potasio en comparación con la PLL. Sin embargo, las proteínas extracelulares no dejan de ser un buen sustrato para estas células, permitiéndoles una buena adhesión al sustrato y desarrollo durante este tiempo de cultivo.

8.- El tratamiento con NMDA y Potasio promueve la presencia de elementos extracelulares que se depositan durante la fase de condicionamiento, que favorecen una mayor sobrevivencia celular y la expresión de diferentes patrones de crecimiento, aunque esto parece ser dependiente de la edad y tipo celular.

IX. BIBLIOGRAFIA

- Adams, J.C. and Watt, F.M. Regulation of development and differentiation by extracellular matrix proteins. *Development* 117:1183-1198.
- Anders, N and Nygard O. Phosphorylation of eucaryotic elongation factor 2 in differentiating and proliferating HL-60 cells. *Biochemics et Biophysica acta.* 1268:263-268, 1995.
- Balász, R.N. and Jorgensen, S.O. Selective stimulation of excitatory amino acids receptor subtypes and survival of cerebellar granule cells in culture. *Neuroscience* 37:251-258, 1990.
- Beck, K.I. et al. Structure and function of laminin: Anatomy of multidomain protein. *FASEB J.* 4 148-160
- Bilozur, M and Hay, E.D. Neuronal crest cells migration in 3D extracellular matrix utilizes laminin, fibronectin or collagen. *Dev. Biol.* 125:19-33, 1988.
- Bixby JL., Lilen J., Reichart LF. (1985). *J. Cell Biol.* 107:353-361.
- Bronner-Fraser and Perris, R. recent advances in defining the role of the Extracellular Matrix in neuronal crest development. *Commun. Dev. Neurobiol* 1:61-83, 1989.
- Charlotte, M.M. et al. Temporal and Spatial Patterns of Tenascin and Laminin Immunoreactivity Suggest Roles for Extracellular matrix in development of Gustatory Papillae and Taste Buds. *The Journal of Comparative neurology* 364:535-555, 1995.
- Chen., Kinch SM., Lin TH., Burrige K., Juliano, R.L. *Journal of Biological Chemistry.* 269 (43): 26602-26605. 1994.
- Chiquet-Ehrismann, R. What distinguished tenascin from fibronectin. *FASEB J.* 4:2598-2604.

Chiquet-Ehrismann. Et al. Tenascin variantes: Differential bindings to fibronectin and distinct distribution in cell cultures and tissues. *Cell Regul.* 2:927-938.

Clark, P.S. et al. Growth cone guidance and neuron morphology on micropatterned laminin surfaces. *J. Ce..Sci* 105:203-212. 1993.

Denis Monard. *TINS*.11 (12):541-544.1998.

Duband, J.L. et al. Thiery cell adhesion and migration on the early vertebrate embryo:Location and Possible role of the putative fibronectin receptor complex. *J. Cell Biol.*102:160-178, 1986.

Dunsmore, S.E. and E.D. Rennels. Turnover of Extracelular Matrix by type pulmonary epithelial cells. *AM. J. Physiol.*268:1336-1346, 1995.

End, P and Engel, J. Multidomain proteins of the Extracelular matrix and cellular growth. Receptors for Extracelular Matrix.79-129, 1991.

Erickson, H.P. Tenascin-C, restrictin and tenascin-X: A family of talent proteins in search of functions. *Curr Opinion. Cell Biol.* 5:869-876.

Evercooreen AB., Adalid A., Chennouti YB., Gansmuller A., Gumesmur N., and Vignais L. (1996) *Glia.* (16):147-164.

Farmer, L. et al. Glia-derived nexin potentiates neuron extension in hippocampal pyramids cells in vitro. *Dev. Neurosci.*12:73-80.

Fenton, J.W. Regulation of Thrombin generation and function..*Sem..Throm.Hemost.* 14:234-240.

Gallo, V. And Kingsbury, A. et al. The role of despolarization in the survuval and differentiation of cerebellar granule cells. *J. neurosci* 7:2203-2213, 1987.

Gospodarowicz, D.et al. Permissive effect of the extracellular matrix on cell proliferation in vitro.*Proc. Natl Acad. Sci. USA.*77(7) 4094-4098, 1980.

Guo, Q. et al. Alzheimer presenilin mutation sensitizes neural cells to apoptosis induced by trophic factor withdrawal and amyloid-beta peptide: Involvement of calcium and oxyradicals. *J. Neurosci* 17:4212-4222.

Hana, S. Suidan and Stuart, R.S. et al. Thrombin Causes Neurite retraction in neuronal Cells through Activation of Cells Surface receptors.

Hasntaz-Ambroise, D. Et al. Heparan sulfate proteoglycans and laminin mediate two different types of neurite outgrowth. *J. Neuroscience* 7, 2293-2304.1987.

Hertz, L. and Yager Y. Et al. Astrocytes survival in the absence of exogenous substrate comparison of immature and mature cells. *Int. J. Dev. Neuroscience* 13 (6) 523-527, 1995.

Humpries, M.J. et al. Neurite extension of chicken peripheral nervous system neurons on fibronectin: relative importance of specific adhesion molecules sites in the central cell-binding and heparan binding domain of fibronectin: relative importance of specific adhesion sites in the central cell-binding domain and the alternative splice type III connecting segment. *J. Cell. Biol.* 106, 1289-1297.1988.

Hynes, R.O. *Fibronectins*. Springer-Verlag, New York.1990.

Hynes, R.O. Integrins: versality, modulation and signalling in cell adhesion. *Cell* 69: 11-25.1992.

Kalnay-Brady MS., and Tonks KN. (1995). *Current Opinion in Cell Biology*. 7:650-657.

Kjellen, L and Lindhal, V. Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J.* 6, 443-475.1991.

Laugwitz LK., Allgeier A., Offermanns S., Spicher K., Sande V J., Dumont EJ., and Shultz G. (1996). *Proc Natl Acad Sci.* (93):116-120.

Lefcort, F. Venstrom, K. et al. Regulation of expression of fibronectin and its receptor during development and regeneration of peripheral nerve. *Development* 116, 767-782.1992.

Lillien, L.E. et al. Extracellular matrix-associated molecules collaborate with ciliary neurotrophic factor to induce type-2 astrocyte development. *J. Cell Biol.* 111, 635-644.1990.