

03021
1



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

**EFEECTO DEL BDNF Y EL NMDA SOBRE LA
MUERTE APOPTOTICA DE LAS CELULAS
GRANULARES DE CEREBELO EN CULTIVO**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
LICENCIADA EN INVESTIGACION BIOMEDICA
BASICA**

**PRESENTA :
MIRIAM BAZAN PEREGRINO**

**DIRECTOR DE TESIS:
DR. JULIO MORAN ANDRADE**

MEXICO, D. F.

MARZO DE 2003

1



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.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA**

**EFEECTO DEL BDNF Y EL NMDA SOBRE LA
MUERTE APOPTÓTICA DE LAS CÉLULAS
GRANULARES DE CEREBELO EN CULTIVO**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
LICENCIADA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA**

**P R E S E N T A
MIRIAM BAZÁN PEREGRINO**

**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. JULIO MORÁN ANDRADE**

MEXICO, D.F.

MARZO DE 2003



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

LICENCIATURA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Coordinación de Enseñanza
Facultad de Medicina

Dr. José Narro Robles
Director de la
Facultad de Medicina
Presente

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Por medio del presente le informamos que la tesis: " Efecto del BDNF y el NMDA sobre la muerte apoptótica de las células granulares de cerebelo en cultivo " que presenta la alumna: Miriam Bazán Peregrino, reúne ampliamente los requisitos de una tesis de la Licenciatura en Investigación Biomédica Básica. Por lo tanto, los suscritos miembros del Jurado damos nuestro voto aprobatorio para que la tesis sea presentada en examen oral.

Atentamente.

Dra. Clorinda Arias Alvarez

Dr. Julio Estrohan Andrade

Dr. Oscar Prospero Garcia

Dra. Lourdes Massieu Trigo

Dra. Rocio Salceda Sacanelles

*A mis padres y hermanos por su apoyo,
entusiasmo, consejos y amor.*

A mi familia por creer en mi.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A Julio por ser un gran tutor de la vida.

*A mis amigos del laboratorio, por hacer del labo un lugar donde
poder desarrollarme tanto personal como académicamente.*

*A Julio M., Julieta R., Clémen C., Toño V., Silver A., y Laila
G. porque realmente han contribuido en mi formación
profesional.*

*A mis amigos Lydia, Jeannette, Javier, Jessica, Citlali, Jorge,
Diana y Rodrigo porque sin su presencia y amistad mi vida
sería diferente.*

*A todos aquellos que de alguna manera han contribuido en la
realización de mis estudios.*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

Agradezco especialmente a los miembros del jurado: Dra. Clorinda Arias, Dra. Lourdes Massieu, Dr. Julio Morán, Dr. Oscar Prospero y Dra. Rocío Salceda, por su tiempo, dedicación y valiosos comentarios acerca del trabajo.

A Guadalupe Domínguez por su asesoría técnica en la realización del proyecto.

Al personal de la biblioteca del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Rebeca Ramírez y Marta Cariño, por el apoyo bibliográfico durante mi formación académica.

Este trabajo se realizó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, proyecto 36235N) y de la Dirección General de Asuntos del Personal (DGAPA, IN-203400). Con el apoyo de una beca de PROBETEL y DGAPA.

Este trabajo se llevó a cabo bajo la dirección del Dr. Julio Morán Andrade en el Departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
Muerte celular en el desarrollo del sistema nervioso	1
Características de la muerte apoptótica	3
Caspasas	3
Mecanismos moleculares de la diferenciación y la muerte en el sistema nervioso	8
Las neurotrofinas y la supervivencia neuronal	9
Neurotransmisores como factores neurotróficos	11
Desarrollo del cerebelo de la rata	13
Participación del NMDA en el desarrollo del cerebelo	15
Participación del BDNF en el desarrollo del cerebelo	16
Cultivo de neuronas granulares de cerebelo	17
JUSTIFICACIÓN	19
OBJETIVOS	19
MATERIALES Y MÉTODOS	20
Cultivos de neuronas granulares de cerebelo	20
Viabilidad celular	20
Medición de Ca ²⁺ intracelular	21
Inmunoblots	21
Actividad de la Caspasa-3	22
Northern blot	22
Análisis estadístico	23
RESULTADOS	24
Papel del BDNF y NMDA en el modelo de bajo potasio crónico	24
Participación del BDNF y NMDA en NGC crecidas en alto potasio	25
Efecto de los inhibidores de NMDAR y TrkB sobre la supervivencia neuronal inducida por NMDA y BDNF	31
Papel del BDNF y el NMDA en la caspasa-3 inducida por privación de potasio	33
Efecto del BDNF y el NMDA sobre la fragmentación de la caspasa-9 inducida por privación de potasio	37
Participación del BDNF y el NMDA en los niveles intracelulares de calcio en NGC privadas de potasio	39
DISCUSIÓN	40
CONCLUSIONES	45
SEÑALIZACIÓN INDUCIDA POR BDNF Y NMDA	46
ABREVIATURAS	47
BIBLIOGRAFÍA	48

INTRODUCCIÓN

MUERTE CELULAR EN EL DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO

Durante el desarrollo del sistema nervioso ocurre una muerte neuronal masiva en un periodo crítico de tiempo. Su significado para la función y el desarrollo del sistema nervioso ha sido de gran interés para la investigación científica desde hace más de un siglo (Oppenheim, 1990; Roth y D'Sa, 2001). Se cree que la muerte neuronal masiva es un mecanismo que asegura que un número adecuado de neuronas establezca inervaciones apropiadas con órganos efectores o con otras poblaciones neuronales.

A lo largo de la embriogénesis del sistema nervioso, una serie de eventos finamente regulados en tiempo y espacio llevan a la formación del sistema nervioso adulto. Entre estos eventos destacan: divisiones simétricas y asimétricas de las neuronas, migración, establecimiento de contactos y formación sináptica, así como la muerte neuronal.

La muerte celular durante la ontogenia no es exclusiva de las neuronas. En los animales que tienen cambios fenotípicos, la muerte celular regularmente sirve para remover células, tejidos y órganos que posiblemente tienen una función transitoria en una etapa, pero que ya no son necesarios una vez que una etapa más madura se ha alcanzado. Un ejemplo es la remoción de la cola de los renacuajos.

En el sistema nervioso existe un tipo de muerte que ha sido referida como muerte celular histogenética, fisiológica, programada o natural. Este tipo de muerte celular involucra la pérdida de un número significativo de neuronas en una población dada y por lo regular ocurre en un estadio tardío en la maduración, en el cual muchas de las características de un tipo celular dado están expresadas fenotípicamente. La sobreproducción de varios tipos neuronales durante la neurogénesis, seguido por la muerte de un gran porcentaje de la población, se ha interpretado como una estrategia evolutiva determinante para establecer el número correcto de neuronas y las conexiones apropiadas para constituir parte del sistema nervioso maduro. Por ejemplo, durante el desarrollo de la médula espinal se estima una muerte de entre el 50-60% de las motoneuronas, así mismo se ha observado una pérdida de entre el 20-30% de las neuronas granulares de cerebelo en

etapas postnatales, como parte del modelaje de la red neuronal (Oppenheim, 1991; Word et al, 1993).

Parte de la regulación de la muerte neuronal que se da en el desarrollo es a través del establecimiento de contactos sinápticos con sus blancos. Así mismo las entradas aferentes y factores derivados de la glia ayudan a regular la sobrevivencia de las neuronas en desarrollo. Los posibles mecanismos por los cuales las interacciones celulares regulan la sobrevivencia neuronal son la sinaptogénesis, la actividad eléctrica neuronal y los factores neurotróficos, entre otros.

Dado que en muchas poblaciones neuronales la invasión de los blancos ocurre coincidentemente con el periodo natural en el que ocurre la pérdida neuronal, se sugiere que las neuronas compiten por un número limitado de contactos o sitios sinápticos en las células blanco (o por un número óptimo de contactos con los aferentes) (Okada et al, 1989, Cunningham, 1982). Los blancos de la invasión neuronal producen una fuente limitada de factores neurotróficos, y la competencia entre neuronas responsivas a estos factores determina cual de las neuronas sobrevive (Jones y Reichardt, 1990; Purves, 1988). Uno de estos factores es el Factor de Crecimiento Neural (NGF) que se encontró inicialmente en los blancos de neuronas simpáticas y sensoriales (Barde 1988). Las señales tróficas no sólo pueden provenir de los factores neurotróficos clásicos como el NGF, sino también de otros factores de crecimiento y de la liberación de neurotransmisores.

La perturbación de la muerte celular programada (PCD, por sus siglas en inglés) neuronal puede resultar en el desarrollo aberrante de la estructura y función del sistema nervioso. Muchas células eucariotas, incluyendo las neuronas, que mueren en el desarrollo son removidas de una manera programada a través de una serie de cambios bioquímicos y morfológicos estereotípicos. Este proceso se lleva a cabo generalmente por medio de un tipo de muerte llamado apoptosis. Una de las características más notorias que definen a este tipo de muerte incluyen una serie de cambios morfológicos como encogimiento celular, condensación de cromatina y la presencia de marcadores de fagocitosis en la superficie celular (Hengartner, 2000), así como la activación de un grupo de proteasas de cisteína conocidas como caspasas.

Existen otros tipos de muerte programada diferentes a la apoptosis, ejemplos de ellos son la "parapoptosis" y la "autofagia". La primera está caracterizada por tener una

condensación de la cromatina menos compacta a la observada en la apoptosis, por ser generalmente independiente de la activación de caspasas y por tener vacuolización citoplásmica. En la autofagia no hay condensación de la cromatina, involucra una señalización en su mayoría independiente de caspasas, presenta vacuolas citosólicas derivadas de lisosomas y lisis celular (Leist y Jäättelä, 2001).

CARACTERÍSTICAS DE LA MUERTE APOPTÓTICA.

La apoptosis (del griego apoptosis, la caída de las hojas) es un proceso activo que se ejecuta a través de un programa endógeno de muerte, el cual no produce inflamación (Kerr et al, 1972). La caracterización de una gran cantidad de genes cuyos productos proteicos pueden activar o inhibir la apoptosis ha ayudado a definir a este proceso de muerte como programado, siendo éste contrastante con la muerte necrótica, que se caracteriza por ser pasiva y sin control genético (Fig.1). La apoptosis se caracteriza por un encogimiento celular, condensación de la cromatina, formación de cuerpos apoptóticos y por la formación de protusiones de superficie membranal que no involucran la pérdida de la integridad membranal. Algunas de estas características son consecuencia de eventos como la fragmentación tamaño-nucleosomal del ADN, la translocación de la fosfatidilserina (señal de fagocitosis), la pérdida de la función mitocondrial, cambios activos en la expresión génica y la síntesis de proteínas, y una cascada de activación de enzimas y proteasas específicas (Ankarcrona et al, 1995; Nijhawan et al, 2000, Hengartner, 2000).

Se han identificado una serie de moléculas reguladoras de la muerte programada en mamíferos (Tabla 1). Algunas de estas moléculas incluyen a miembros de las familias de bcl-2, la proteína adaptadora Apaf-1 (por factor-1 activador de proteasas apoptóticas) y de la familia de caspasas, las cuales han demostrado un papel significativo, particularmente en el desarrollo del cerebro de los mamíferos (Yuan y Yankner, 2000).

• Caspasas.

Las caspasas fueron implicadas en la apoptosis con el descubrimiento de ced-3, ced-4 y ced-9 en el nematodo *Caenorhabditis elegans*, cuyos productos génicos están relacionados con la enzima 1 β -interconvertidora de interleucinas (ICE, por sus siglas en

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

inglés) o caspasa-1, Apaf-1 y Bcl-2, respectivamente. Hasta ahora se han identificado 14 caspasas en mamíferos, de las cuales las caspasas 2, 3, 6, 8, 9, 10 se han relacionado a la apoptosis.

APOPTOSIS

NECROSIS

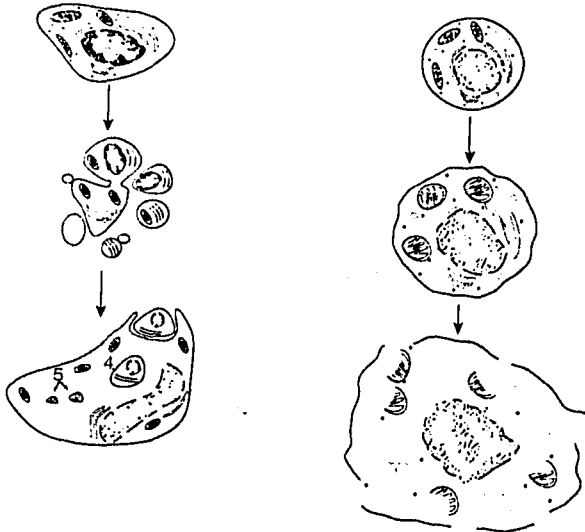


Figura 1. Apoptosis vs. Necrosis. Zigmond et al, 1999.

Las caspasas comparten similitudes en la secuencia de aminoácidos, estructura y especificidad de sustratos. Son expresadas como proenzimas (30-50 KDa) que contienen tres dominios: un dominio amino terminal, una subunidad grande (~20 KDa) y una pequeña (~10KDa) (Fig. 2). La activación involucra el procesamiento proteolítico entre los dominios, seguido de la asociación de las subunidades pequeña y grande para formar un heterodímero. Dos heterodímeros se asocian para formar un tetrámero funcional que tiene dos sitios catalíticos que parecen funcionar independientemente (Thornberry et al, 1992; Walter, 1994).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Las características de la proenzima que son centrales en los mecanismos de activación de estas enzimas son: el dominio NH₂ terminal, el cual es altamente variable en secuencia y longitud, está involucrado en la regulación de la activación. Todos los dominios se derivan de la proenzima por la ruptura en los sitios consenso de las caspasas, implicando que estas enzimas pueden ser activadas autocatalíticamente o por medio de otras caspasas (Thornberry y Lazebmmik, 1998).

GEN	FUNCIÓN
<i>ced-3</i> /ICE/familia de caspasas	Induce muerte celular
<i>ced-4</i>	Induce muerte celular
<i>ced-9</i>	Previene muerte celular
<i>ced-1, 2, 5, 6, 7, 8, 10</i>	Involucrados en la fagocitosis de las células muertas
<i>ces-1, 2</i>	Determinación del destino de la muerte celular
<i>muc-1</i>	Degradación de ADN
Receptor de esteroides (ecysone)	La unión del ligando induce muerte celular
<i>reaper</i>	Induce muerte celular en <i>Drosophila</i>
<i>hid</i>	Induce muerte celular en <i>Drosophila</i>
<i>grim</i>	Induce muerte celular en <i>Drosophila</i>
Baculovirus p35	Previene muerte celular al inhibir ICE
CrmA	Previene muerte celular al inhibir ICE
<i>nur77</i>	Requerido para la apoptosis de las células T
Fas / Receptor Apo-1	La unión del ligando induce muerte celular
p75	La unión del ligando induce muerte celular
TNF α	Induce muerte celular
Perforina / granzima β	Induce muerte celular el células infectadas con bacterias o virus
p53	Requerido para la muerte de timocitos
<i>c-myc</i>	Requerido para la muerte de células del sistema inmune
<i>c-fos</i>	Expresado en muchos tipos celulares durante la muerte celular
<i>c-jun</i>	Expresado durante la muerte celular
p21 ^{ras}	Involucrado en el control de la muerte celular por factores tróficos
TGF β 1	Induce muerte celular
Ciclina A	Involucrada en la muerte celular inducida por <i>c-myc</i>
Ciclina D1	Expresada durante la muerte de las neuronas
p34 ^{cdc2}	Expresado en algunas células que están muriendo
Nuc-18	Endonucleasa involucrada en la fragmentación del ADN
<i>bcl-2</i>	Previene la muerte celular
<i>bcl-x</i>	Previene la muerte celular
Bax	Bloquea la función de <i>bcl-2</i> e induce muerte celular
Bak	Promueve muerte celular
<i>bad</i>	Promueve muerte celular
Bl-1	Previene la muerte celular al interactuar con <i>bcl-2</i> o Bax

Tabla 1. Moléculas clave en la muerte apoptótica neuronal. Zigmond et al, 1999

La familia de las caspasas se ha clasificado de acuerdo al tamaño de su predominio y a los motivos de su secuencia. Aquellas con el dominio efector de muerte (caspasas -8 y -10) son activadas al interactuar con los dominios intracelulares de los receptores de muerte como el CD95 (Apo-1/Fas) y el Receptor del Factor de Necrosis Tumoral (TNF). Las caspasas con dominios de reclutamiento para activar caspasas (CARDs) (caspasas -1, -2, -4, -5, -9, -11 y -12) son probablemente activados a través de complejos intracelulares. Por ejemplo, la caspasa-9 para poder ser activada requiere de la formación del apoptosoma, el cual está conformado por el citocromo c, Apaf-1, caspasa 9 y ATP. Las caspasas con predominios grandes funcionan como transductoras de señales que se encuentran al inicio de la cascada de activación, mientras las que tienen un pro-dominio pequeño funcionan como amplificadoras o efectoras rompiendo sustratos celulares (Fraser, 1996). Las caspasas con pro-dominios pequeños, como la caspasa-3 pueden ser activadas por la mayoría o todas las vías de caspasa. La única que funciona como iniciadora y tiene un predominio pequeño es la caspasa-14 (Hu et al, 1998).

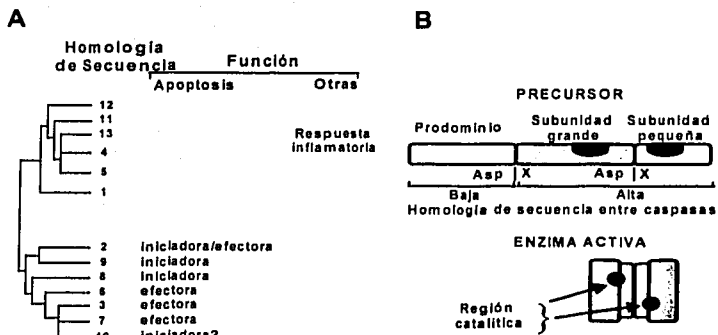


Figura 2. Estructura y función de las caspasas. A) Familia de las caspasas de los mamíferos y su función. B) Las caspasas son sintetizadas como precursores los cuales llevan a cabo una maduración proteolítica. Thornberry y Lazebnik, 1998.

Las caspasas juegan varios papeles importantes en los cambios que ocurren durante la apoptosis. Uno de ellos es la inactivación de proteínas que protegen a las células de la

apoptosis. Un ejemplo claro es la proteólisis de la proteína Bcl-2, donde no sólo se inactiva, sino también se produce un fragmento que promueve la apoptosis (Xue y Horvitz, 1997). Las caspasas contribuyen a la morfología apoptótica al desensamblar directamente estructuras tales como la envoltura nuclear, las caspasas actúan sobre la laminina, la cual se colapsa y contribuye a la condensación de la cromatina. La reorganización indirecta de estructuras celulares por medio de las caspasas es a través de la ruptura de proteínas involucradas en la regulación del citoesqueleto, como la gelsolina (Kothakota et al, 1997). Al fragmentar a las proteínas, las caspasas no sólo pueden desintegrarlas, sino también modificar la función de proteínas involucradas en reparación de ADN, procesamiento de ARN y replicación de ADN (Thornberry y Lazebmmik, 1998).

El papel crucial de las caspasas en la muerte neuronal ha sido demostrado gracias a la habilidad que tienen los inhibidores de caspasa para bloquear la muerte neuronal inducida por la privación de factores tróficos y por otras condiciones citotóxicas (Fig. 3) (Cryns y Yuan, 1998).

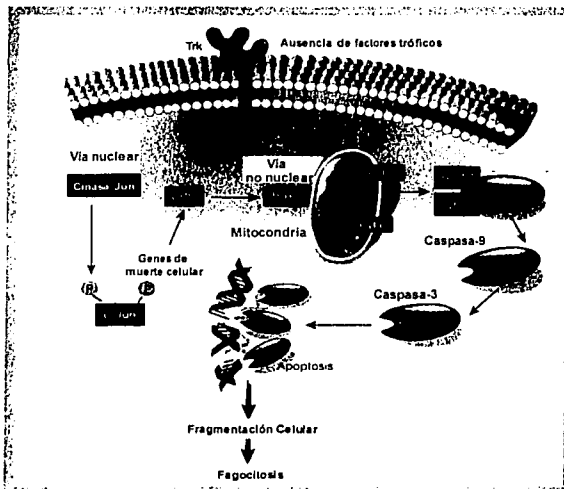


Figura 3. Activación de la apoptosis en neuronas simpáticas por ausencia de factores tróficos. Yuan y Yankner, 2000.

Dos de las caspasas que se han estudiado con más detenimiento en asociación a la muerte neuronal son las caspasas -3 y -9. Se sabe que la caspasa-9 es responsable de la activación de la caspasa-3. En estudios donde se han generado ratones nulos para las caspasas -3 ó -9 se observan efectos similares en la inhibición de la muerte neuronal durante el desarrollo, generando cerebros gigantes e inviabilidad del ratón.

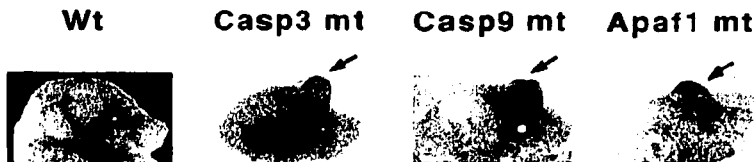


Figura 4. Morfología de ratones normales (Wt) y mutados (mt) en caspasa-3, -9 y Apaf-1. Los ratones mutados en caspasa-3 mueren perinatalmente y los mutados en caspasa-9 mueren embríonicamente. Nijhawan et al, 2000.

MECANISMOS MOLECULARES DE LA DIFERENCIACIÓN Y LA MUERTE EN EL SISTEMA NERVIOSO.

En la mayoría de las regiones del sistema nervioso los precursores neurales se desarrollan en neuronas y células gliales. Los mecanismos que dirigen la diferenciación de las células de la cresta neural en neuronas y en glia son los factores secretados. En la migración y supervivencia neuronal participa el aporte autócrino de factores de crecimiento, el tiempo (reloj genéticamente programado) y el órgano blanco (Fig. 5). El órgano blanco provee Factores de Crecimiento; si éste muere generalmente también lo hace la neurona que iba a hacer conexión con él.

La supervivencia y la diferenciación de una neurona están reguladas por señales que incluyen los factores neurotróficos como los miembros de las familias de las neurotrofinas, las interleucinas y del Factor de Crecimiento Transformante β , y moléculas de adhesión como la laminina. Además un número creciente de neurotransmisores y neuropéptidos están siendo considerados como factores neurotróficos. Los neurotransmisores no sólo median comunicación intercelular, sino también tienen efectos tróficos sobre la división y

sobrevivencia celular, así como sobre el crecimiento de las neuritas y la diferenciación neuronal en el desarrollo (Shwartz, 1992). La sobrevivencia celular también está regulada por las aferencias presinápticas. Aunque inicialmente la diferenciación y crecimiento neuronal ocurre sin contactos sinápticos, la maduración y sobrevivencia se vuelven dependientes de la transmisión sináptica y la actividad eléctrica. Las sinapsis emplean más de un mecanismo para mantener a las neuronas vivas y esto incluye la despolarización presináptica (y homeostasis de calcio), la activación de receptores de neurotransmisores y la estimulación de los receptores de factores neurotróficos (Fig. 5) (Sanes et al, 2000; Kandel et al, 2000).

- **Las neurotrofinas y la sobrevivencia neuronal.**

Los descubrimientos de Viktor Hamburger y Levi-Montalcini (20s-40s), llevaron a la elaboración de la teoría neurotrófica de la sobrevivencia celular. La teoría neurotrófica propone que los blancos de inervación producen una fuente limitada de factores neurotróficos, siendo las neuronas responsivas las que compiten por ellos y que esto determina cual de las neuronas sobrevive (Fig.5) (Hamburger y Levi-Montalcini, 1949; Purves, 1986; Jones y Reichardt, 1990).

La muerte neuronal apoptótica se cree que está regulada negativamente, al menos en parte, por la competencia de unión a factores neurotróficos como el Factor de Crecimiento Neuronal (NGF) y el Factor Neurotrófico Derivado de Cerebro (BDNF). Por otro lado, hay que considerar que estos mismos factores, dependiendo del tipo neuronal y receptores que éstas expresen, pueden causar la muerte. Esto significa que los mecanismos de regulación de la muerte neuronal apoptótica por las neurotrofinas no sólo pueden ser negativos y dependen de la activación e interacción entre los receptores Trk y p75 que unen a la familia de las neurotrofinas.

El primer factor neurotrófico identificado fue el NGF y su secuencia de aminoácidos se obtuvo en 1971. Actualmente varios miembros de la familia de las neurotrofinas han sido aislados y encontrados en todo el sistema nervioso. Los miembros de la familia son NGF, BDNF, Neurotrofina-3 (NT-3), NT-4/5 y NT-6. Todas las neurotrofinas tienen inicialmente alrededor de 250 aminoácidos y posteriormente se procesan postraduccionalmente para dar lugar a un péptido activo que forma un dímero.

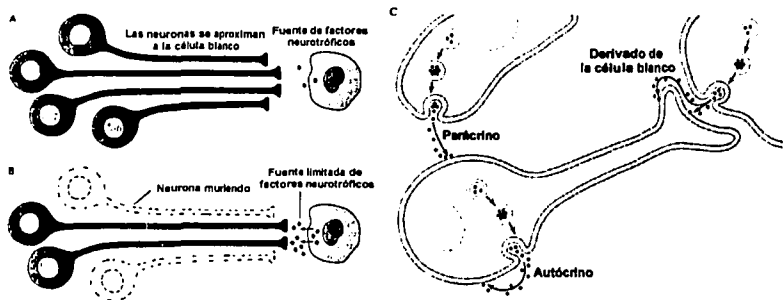


Figura 5. La teoría Neurotrófica A) y B). A) Las neuronas extienden sus axones hacia la célula blanco. B) Las células blanco secretan una cantidad limitada de factores neurotróficos. Las neuronas que no reciben cantidades suficientes del factor neurotrófico mueren por apoptosis (Kandel et al, 2000). C) Las señales tróficas pueden provenir de la célula blanco, autocrina o paracrinamente (Siegel et al, 1999).

Se han aislado tres receptores de alta afinidad a las neurotrofinas: TrkA, TrkB y TrkC. Dichos receptores pesan alrededor de 145 KDa y comparten cerca de un 50% de homología en su dominio extracelular, donde tienen dos dominios tipo inmunoglobulina; en su parte intracelular tienen una cinasa de tirosinas con sitios de autofosforilación (Barbacid, 1994). Cada Trk muestra una afinidad específica por una o dos neurotrofinas como se muestra en la figura 6. Existe un número de receptores truncados de los Trks, a los cuales les falta el dominio de tirosina; estos receptores son generalmente expresados por células gliales en el desarrollo y podrían modular las respuestas a las neurotrofinas.

El receptor de las neurotrofinas de baja afinidad (p75) es una glicoproteína transmembranal de 75 KDa que comparte homología con los miembros de la familia de receptores al Factor de Necrosis Tumoral. A diferencia de los Trks, p75 no tiene un dominio intracelular catalítico. Este receptor juega un papel dual en la sobrevivencia celular. Por ejemplo, en la retina en desarrollo, la eliminación del NGF endógeno resulta en una mejor sobrevivencia en las neuronas de retina. La habilidad de NGF para matar las neuronas de retina está mediada por el p75, ya que los anticuerpos dirigidos contra este receptor previenen la muerte celular (Frade et al, 1996). Por otro lado, en ausencia de p75,

TrkA no es capaz de transducir señales de supervivencia eficientemente en neuronas trigeminales sensoriales cutáneas en cultivo (Davies et al, 1993).

Los miembros individuales de la familia de las neurotrofinas juegan un papel en la supervivencia de poblaciones específicas neuronales, sin embargo gracias a la promiscuidad de unión de los receptores a las diferentes neurotrofinas, la ausencia de alguna puede ser suplida por otra. Cuando se analizan los efectos en la supervivencia celular de los ratones sin TrkB o sin TrkC, generalmente reflejan lo observado en ratones BDNF^{-/-} y NT-3^{-/-}, respectivamente (Klein et al, 1993, 1994). Sin embargo, los efectos de TrkB^{-/-} son cuantitativamente mayores que los efectos de BDNF^{-/-}, porque TrkB también es receptor de NT-4. Los animales que no expresan BDNF muestran una deficiencia en la diferenciación morfológica durante el desarrollo del sistema nervioso central, así como una pérdida de neuronas cerebelares (Ernfors et al. 1994; Scharz, 1997; Linnarsson, 2000).

- **Neurotransmisores como factores neurotróficos.**

Los neurotransmisores y los neuropéptidos son expresados tempranamente en el desarrollo, a edades en que las conexiones sinápticas aún no se han establecido. En sistemas en cultivo los neurotransmisores y neuropéptidos afectan la diferenciación y supervivencia neuronal y glial (Schwartz, 1992).

Los neurotransmisores derivados de las monoaminas regulan la mitosis; por ejemplo, la serotonina pueden regular la división neural temprana en células neuroepiteliales, glioblastos en la capa granular interna del cerebelo y en neuroblastos del "hilus" dentado del hipocampo. Los antagonistas de NMDA producen muerte neuronal en cultivos de la médula espinal de embriones de rata (12-14 días). El glutamato además de promover la supervivencia de las neuronas de la médula espinal, también induce la extensión de neuritas en periodos tardíos del desarrollo. Por el contrario, la dopamina y la serotonina inhiben la elongación de las neuritas en el "ganglio bucal" de la rata.

Los receptores a glutamato se dividen en dos grandes categorías: los metabotrópicos y los ionotrópicos (Fig. 7). Los ionotrópicos se pueden distinguir farmacológicamente por tres agonistas selectivos, dividiéndose a su vez en dos tipos: los N-metil-D-aspartato (NMDA) y los no-NMDA que incluyen a los receptores Ácido D-Amino-3-Hidroxi-5-Metil-4-Isoxazol (AMPA) y Kainato (KA). Se han observado diferentes conductancias a

calcio (Ca^{++}) o a sodio (Na^+) en todos los receptores ionotrópicos y esto depende de las distintas subunidades que los conformen (Kandel et al, 2000).

El receptor a NMDA (NMDAR) tiene diferentes sitios que regulan su función, entre ellos destacan los de unión a glicina, Zn^{++} , fenciclidina (PCP), MK-801, Mg^{++} y poliaminas (Fig. 7 A). Para la activación del receptor se requiere de la unión del coagonista glicina a su sitio de unión en la subunidad NMDAR1. El NMDAR está bloqueado por Mg^{++} cuando la membrana está en reposo. Dado que la inhibición por Mg^{++} del canal acoplado al NMDAR es dependiente de voltaje, la activación rápida de los receptores AMPA y KA y la subsecuente despolarización de la membrana producen la liberación del Mg^{++} y la activación del receptor a NMDA. El receptor a NMDA permite el paso de los iones Ca^{++} , Na^+ y K^+ , siendo la proporción de permeabilidad $\text{Ca}^{++}:\text{Na}^+$ de 10:1 (Nicholls D, 1995).

El glutamato promueve la sobrevivencia y maduración bioquímica de las neuronas granulares de cerebelo (Levi et al, 1989; Morán y Patel, 1989), modula el crecimiento axonal y participa en la iniciación de la migración, durante el desarrollo de la corteza cerebelar (Komuro y Rakic, 1993; Verderio et al, 1999).

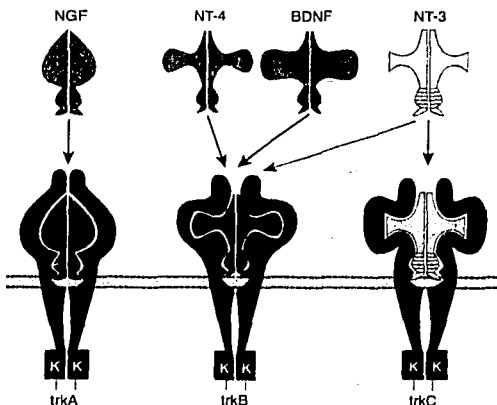


Figura 6. Familia de las neurotrofinas y sus receptores. Cada neurotrofina se une preferentemente a un receptor particular de la familia de los Trks como se indica por las flechas (Zigmond et al, 1999).

Se ha demostrado que el efecto trófico del glutamato está mediado por el receptor de glutamato tipo N-metil-D-aspartato (NMDA). El bloqueo de los receptores de glutamato tipo NMDA durante unas cuantas horas en la vida tardía fetal o neonatal induce muerte neuronal en el cerebro de la rata en desarrollo, lo que sugiere que el glutamato controla la sobrevivencia neuronal (Ikonomidou et al, 1999; Monti y Contestabile, 2000). El NMDA ha sido implicado en la sobrevivencia, apoptosis y necrosis en diferentes modelos neuronales dependiendo de su concentración, tiempo de exposición y maduración neuronal (Ward et al, 2000; Baláz et al, 1988; Morán y Patel, 1989; Du et al, 1997).

DESARROLLO DEL CEREBELO DE LA RATA.

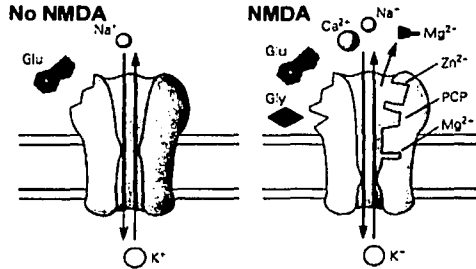
El cerebelo es una estructura que participa en varias funciones motoras incluido el control del equilibrio corporal. Aunque el cerebelo constituye sólo el 10% del volumen total del cerebro, las neuronas granulares de cerebelo constituyen casi el 80% del total de las células neuronales del cerebro. El cerebelo se forma a partir de neuronas inmaduras de los labios rómbicos de una región metencefálica del tubo neural llamada placa alar. Está constituido por una corteza cerebelar de materia gris, una capa interna de materia blanca y tres pares de núcleos internos. Las neuronas cerebelares se distribuyen en regiones discretas, cada una de las cuales recibe proyecciones de varias porciones del cerebro y médula espinal y a su vez proyectan a diferentes sistemas motores.

La corteza cerebelar se divide en tres capas, la más externa es la molecular, por debajo está la monocapa de células de Purkinje seguida por la capa granular. Dichas capas están constituidas sólo por cinco tipos celulares. La capa molecular contiene principalmente axones de las células granulares conocidas como fibras paralelas; contiene células que funcionan como interneuronas que son las estrelladas y en canasta; contiene dendritas de las células de Purkinje y finalmente fibras trepadoras excitadoras que se originan en la médula espinal. En la monocapa de células de Purkinje, éstas se distinguen por sus somas de gran tamaño y por sus axones que se proyectan principalmente a la sustancia blanca. En la capa granular se encuentran las células granulares de cerebelo y las de Golgi. Los axones de las células granulares se proyectan dicotomizándose dando origen a las fibras paralelas, que se conectan con las dendritas de las células de Purkinje. En esta capa se localizan los

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

llamados glomérulos cerebelosos, donde se establecen circuitos entre las células de la capa granular y de las fibras musgosas provenientes de los núcleos pontinos y de la médula espinal. Cada célula granular de cerebello es blanco de diversas fibras musgosas, las cuales son excitadoras, siendo el glutamato y la acetilcolina sus neurotransmisores.

A Receptores ionotrópicos de glutamato



B Receptor metabotrópico de glutamato

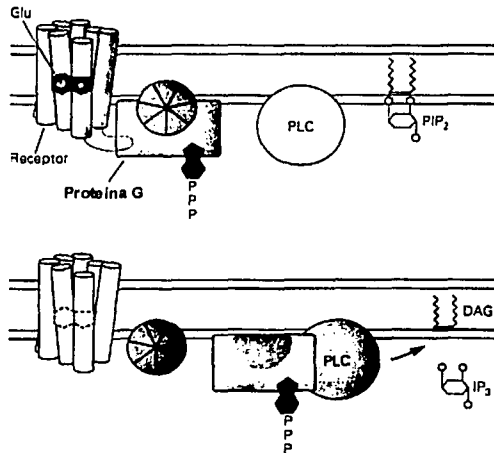


Figura 7. Las tres clases de receptores de glutamato. A) Receptores ionotrópicos tipo No-NMDA y NMDA. B) Receptor metabotrópico de glutamato (Kandel et al. 2000).

Cuando las células nucleares y de Purkinje han dejado de dividirse ocurre la formación de la capa granular externa (CGE) o capa germinal externa. Una vez formada, una segunda ola de divisiones dentro de la CGE produce a las NGC. La migración de las células granulares postmitóticas e inmaduras de la CGE a la capa granular interna (CGI) comienza cerca del día postnatal 2-3 (DPN 2-3) y dura cerca de 3 semanas en la rata. Una vez que las células granulares han alcanzado su posición final en la CGI, comienzan a recibir sus primeros contactos sinápticos excitadores de las fibras musgosas desde el 5^o DPN, siendo funcionales la mayoría de estos contactos desde los 10-12 DPN (Arsenio-Núñez y Sotelo, 1985; Burgoyne y Cambray-Deakin, 1988).

- **Participación del NMDA en el desarrollo del cerebelo.**

Se ha sugerido que las influencias presinápticas de las fibras musgosas, particularmente de las neuronas glutamatérgicas son críticas para promover la diferenciación y sobrevivencia de las neuronas granulares de cerebelo durante periodos críticos del desarrollo del cerebelo (Balazs et al, 1988; Moran y Patel, 1989).

Estudios realizados por Morán y colaboradores (1999a), indican que el tiempo crítico para la mayoría de las células granulares en recibir las entradas glutamatérgicas es entre el DPN 10 y el 19 y que esto puede ser una señal para la diferenciación de las neuronas granulares. Durante este periodo los antagonistas del receptor de NMDA reducen las actividades de las enzimas que sintetizan al glutamato como la glutaminasa y la aspartato aminotransferasa (AAT). En el tiempo que la mayoría de las fibras musgosas han establecido ya los contactos con las células granulares, los antagonistas de NMDA no tienen efecto sobre la actividad de estas enzimas. La reducción de la CGI e incremento en la CGE con el tratamiento de MK-801 sugiere que el bloqueo de NMDAR afecta la migración y sobrevivencia de las neuronas granulares a los 12 DPN. Estas observaciones están de acuerdo con el trabajo de Komuro y Rakic (1993), donde el bloqueo del receptor NMDA induce una reducción en la migración de las células granulares de la CGE a la CGI en rebanadas del cerebelo inmaduro.

Se ha demostrado en dos estudios recientes (Monti y Contestabile, 2000; Alavez et al, datos no publicados) que el bloqueo de los NMDAR induce muerte apoptótica en la corteza cerebelar. Aunque existen ciertas diferencias particulares en los cursos temporales

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

de la muerte neuronal, ambos estudios encuentran que al bloquear NMDAR incrementa el número de células apoptóticas y la actividad de la caspasa-3, dicho periodo corresponde al tiempo en las que las fibras musgosas han establecido la mayoría de los contactos funcionales en la CGI.

- **Participación del BDNF en el desarrollo del cerebelo.**

A diferencia de otras neurotrofinas, el BDNF promueve la sobrevivencia, mantenimiento y crecimiento de muchos tipos neuronales del sistema nervioso central y periférico. La distribución de BDNF en el cerebro se ha estudiado a través del análisis de su mensajero y su producto proteico.

La región cerebral con mayor contenido proteico de BDNF es el hipocampo (5.41ng/g), seguido por el hipotálamo (4.23ng/g) y la de menor concentración es el bulbo olfatorio (0.95ng/g). El cerebelo tiene aproximadamente 1.25ng/g de peso en la rata de un mes de edad. Existen cambios de expresión dependientes de la edad; en el cerebelo no se puede detectar BDNF hasta los 20 días postnatales (DPN), manteniéndose los niveles relativamente constantes hasta los 180 DPN (Kato-Semba et al, 1997). Sin embargo, el ARN mensajero del BDNF se detecta desde el primer día postnatal, alcanzando su mayor expresión a los 20 DPN en la corteza cerebelar. Dado un incremento en el ARNm de BDNF en las células granulares concomitantemente con su migración y maduración, se sugiere una estimulación progresiva de este gen durante el proceso de desarrollo. La hibridación *in situ* del ARNm de BDNF es solamente detectada en las células granulares (Timmusk et al, 1993; Rocamora et al, 1993).

Las anomalías observadas en el SNC de ratones sin BDNF son menos dramáticas que aquellas presentes en SNP. Sin embargo, el BDNF es requerido para un desarrollo y funcionamiento normal de la corteza cerebelar. Hay un incremento de 2 a 3 veces en la muerte neuronal de las células granulares en ratones sin BDNF, lo que da como resultado menos células granulares maduras y una CGI más delgada. Ésta muerte sólo se observa a los 8 DPN y no así a los 3 y 14 DPN, lo que demuestra que el incremento en la muerte ocurre en una etapa que coincide con la muerte neuronal programada. En los ratones BDNF^{-/-}, las capas de la corteza cerebelar son normales en tamaño a los 8 DPN, sin embargo hay una densidad poblacional menor de las neuronas granulares en la CGI y

exhiben diferencias significativas en las profundidades de cada una de las fisuras que dan forma a las folias del cerebelo. En estos mutantes para el 14^o DPN hay un mayor grosor de la CGE y un decremento en la capa molecular y la CGI. El BDNF es requerido para la foliación cerebelar normal, tal vez debido a su regulación sobre la sobrevivencia de las NGC o la arborización dendrítica de las células Purkinje (Schwartz et al, 1997).

Dado que el BDNF no es sintetizado por los blancos de las NGC, las células de Purkinje, pero sí por las aferentes de las granulares y por ellas mismas, se puede inferir que las células granulares sintetizan BDNF para su uso autócrino o parácrino para promover su sobrevivencia. Esto puede reflejar una habilidad general de las neurotrofinas en el SNC de funcionar de una manera autócrina o parácrina, en lugar de ser factores de sobrevivencia derivados de las células blanco.

CULTIVO DE NEURONAS GRANULARES DE CEREBELO.

Los cultivos primarios de células granulares de cerebelo han demostrado ser un modelo adecuado para el estudio de la apoptosis en neuronas del SNC debido a su fácil manejo y a la homogeneidad de los tipos celulares presentes (90% de células granulares y el resto de interneuronas inhibitoras y astrocitos). Las neuronas granulares de cerebelo (NGC) son las más abundantes en el cerebelo y una gran proporción de ellas es eliminada durante la maduración del mismo. Si estas células se cultivan en un medio con 25mM de K⁺, el cual despolariza a las neuronas, o NMDA las neuronas sobreviven y maduran. La maduración es similar a la del organismo *in vivo*, como se observa por el favorecimiento del incremento de la liberación de glutamato, de la actividad de la glutaminasa y del recambio de las diferentes subunidades del receptor NMDA (Gallo et al, 1987; Morán y Patel, 1999a; Levi et al, 1989; Resink et al, 1995; Alavez et al, 1996). Estos tratamientos también promueven la expresión funcional de los receptores NMDA, como se demuestra por el incremento en la conductancia iónica y del flujo de calcio inducido por NMDA y por una vulnerabilidad elevada a la toxicidad del NMDA (Balazs et al, 1992; Resink et al, 1994).

La promoción de sobrevivencia sólo se observa durante periodos críticos del desarrollo, lo que corresponde al tiempo cuando las NGC reciben entradas presinápticas

glutamatergicas de las fibras musgosas durante el desarrollo *in vivo*. Cuando las NGC son privadas de NMDA (agonista del receptor tipo NMDA de glutamato) o transferidas de un medio con K25 a uno con 5mM KCl (K5), las células mueren después de 24-48h mostrando características apoptóticas (Gallo et al, 1987; Schulz et al, 1996; Morán et al, 1999b). La muerte celular apoptótica inducida por la privación de despolarización en las NGC ha sido ampliamente caracterizada. Las concentraciones elevadas de K^+ aumentan el flujo de Ca^{++} y esto incrementa la sobrevivencia. Se ha observado que una reducción en los niveles intracelulares de Ca^{++} ($[Ca^{++}]_i$) dispara el proceso de muerte, esta muerte puede ser prevenida al incrementar los niveles intracelulares de Ca^{++} por medio de la adición de ionóforos de Ca^{++} o por la activación de receptores ionotrópicos permeables a Ca^{++} . Por otro lado, se puede inducir la muerte de las NGC que están crónicamente cultivadas en K25 si se les inhibe sus canales de Ca^{++} dependientes de voltaje (Kingsbury y Balazs, 1987; Balazs et al, 1988; Pearson et al, 1992; Morán et al, 1999b).

Otro evento temprano relacionado con este proceso es la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) a nivel citosólico y mitocondrial. Estos dos eventos críticos están comprometiendo la muerte celular. Otros eventos característicos después de la producción de ROS son la translocación de la fosfatidilserina y la activación de proteasas de cisteína específicas, particularmente las caspasas 2, 3, 8 y 9 (Morán et al, 1999b; Valencia y Morán, 2001; Caballero-Benítez y Morán, 2003).

El BDNF induce crecimiento de las neuritas de las NGC y suprime su apoptosis cuando es administrado crónicamente, a través de un mecanismo post-traduccional (Suzuki y Koike, 1996; Lindholm et al, 1993). EL BDNF induce, a través de su receptor de alta afinidad Trk B, una señalización intracelular que involucra la activación de la vías PI-3K y MAPK, las cuales promueven sobrevivencia neuronal (Nonomura, 1996; Bonni, 1999). Existe una cierta interrelación funcional entre la activación del receptor NMDA y la acción del BDNF sobre la sobrevivencia neuronal. Ambos pueden inducir la liberación del otro. Se ha sugerido que el efecto protector del NMDA en contra de la muerte es mediado a través de la síntesis y liberación de BDNF (Numakawa et al, 1999; Favaron et al, 1993). El BDNF protege a las NGC de la neurotoxicidad inducida por glutamato (Bhave et al, 1999). También se ha demostrado que el BDNF puede regular la actividad y la expresión de las subunidades del receptor NMDA (Levine et al, 2000; Brabdoli et al, 1999).

JUSTIFICACIÓN

El entendimiento de los mecanismos de muerte apoptótica en el sistema nervioso es muy importante para explicar su desarrollo. Los factores neurotróficos juegan un papel relevante en los procesos de sobrevivencia y diferenciación. Así mismo, los neurotransmisores como el glutamato se han implicado en estos mismos procesos. Este estudio pretende entender parte de los mecanismos moleculares implicados en la muerte de las neuronas granulares de cerebelo y cómo éstos pueden ser afectados por diferentes señales tróficas como el Factor Neurotrófico Derivado de Cerebro (BDNF) y la activación del receptor tipo N-metil-D-aspartato (NMDAR). Debido a que el calcio intracelular parece ser una señal inicial del proceso de muerte se evaluó su participación en la acción del BDNF y el NMDA sobre la muerte apoptótica. Por otro lado, en respuesta a esta señal inicial ocurre una activación de las caspasas, que juegan un papel importante en la ejecución de la muerte apoptótica. El proceso de muerte resulta por lo tanto muy complejo e involucra distintos elementos que participan a diferentes niveles, por lo que es importante conocer sus interacciones. Esto podría contribuir también a la elaboración de posibles terapias conducentes a prevenir la muerte neuronal en condiciones patológicas.

OBJETIVOS GENERALES

Evaluar el papel del BDNF y el NMDA sobre la muerte apoptótica inducida por la privación de señales tróficas como la despolarización por potasio.

OBJETIVOS PARTICULARES

Entender como afecta el BDNF y el NMDA los siguientes procesos:

- Viabilidad celular
- Los niveles de $[Ca^{++}]_i$ asociados al estímulo de muerte.
- Activación, fragmentación y niveles de ARNm de las caspasas 3 y 9 en distintos tiempos de iniciado el estímulo apoptótico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos de Neuronas granulares de cerebelo (NGC)

Las NGC fueron obtenidas de ratas de 8 días postnatales, disociadas y cultivadas a una densidad de 265×10^3 células/cm² sobre cajas de plástico o sobre cubreobjetos de 25x25 mm previamente cubiertos con poli-L-lisina (5 µg/ml). El medio de cultivo contenía medio basal Eagle suplementado con 10% v/v de suero fetal bovino (inactivado previamente por calor), 2 mM de glutamina, 25 mM KCl, 50U/ml penicilina y 50 µg/ml de estreptomycin. Los cultivos se incubaron a 37° C en una atmósfera húmeda al 95% de aire y 5% de CO₂. Después de 20 h se añadió citosina arabinósida (10µM) para obtener aproximadamente 95% de neuronas y 5% de células gliales. Las células se mantuvieron durante 5-6 días *in vitro* (DIV).

Viabilidad Celular

La viabilidad celular fue estimada por el ensayo de MTT (sal de tetrazolio, 3-(4,5 dimetiltiliazol-2-yl)-2, 5-bromuro de difenil tetrazolio) después de haber transferido las células a un medio de bajo potasio con o sin los tratamientos de BDNF y NMDA. El MTT es transformado en la sal azul de formazán por las deshidrogenasas de mitocondrias activas, siendo la absorbancia directamente proporcional al número de células viables. El MTT (0.1 mg/ml) se añadió a las NGC por 15 min. a 37°C. Después de remover el medio que contiene el MTT restante, se añadió dimetil sulfoxido (DMSO) al 100% a las cajas. Después de una incubación de 20 min. a 37° en la oscuridad, el azul de formazán formado a partir del MTT se cuantificó espectroscópicamente a una longitud de onda de 570nm.

En algunos experimentos se utilizó diacetato de fluoresceína (FDA) e yoduro de propidio (PI) para evaluar la sobrevivencia. El FDA entra a las células normales y emite fluorescencia verde cuando es procesada por esterasas, es decir tiñe a las células vivas. El PI tiñe a las células muertas al penetrar a aquellas células que no tienen íntegra la membrana plasmática y uniéndose al ADN emitiendo fluorescencia roja. Las neuronas

fueron incubadas con 5 $\mu\text{g/ml}$ de FDA y 2.5 $\mu\text{g/ml}$ de PI durante 15 min a 37°C, después fueron lavadas con un amortiguador salino de fosfatos (PBS), observadas y fotografiadas en un microscopio de epifluorescencia usando filtros de excitación de 485 nm para FDA y 520 nm para PI.

Medición de Ca^{++} intracelular

La concentración de Ca^{++} intracelular ($[\text{Ca}^{++}]_i$) fue cuantificada usando el indicador fluorescente fura-2/AM del calcio, según lo descrito previamente (Itoh et al., 1998). Brevemente, las células fueron crecidas en cubreobjetos durante 5-6 DIV e incubadas con 5 mM Fura-2/AM y 0,02% Plurónico F-127 durante 1 hora en el medio con KCl 25mM (K25) y lavadas dos veces. Los cubreobjetos fueron colocados en un compartimiento de perfusión (RC-25, Warner Instrument Corp, CT) y perfundidos con un medio con KCl 25mM (K25) o con KCl 5mM (K5) o con KCl 10mM (K10) que contenía o no BDNF (100ng/ml) o NMDA (150 μM). Las células fueron iluminadas alternativamente con una lámpara de arco de Xe a través de la excitación a 340 y 380nm de longitud de onda. Las imágenes de la fluorescencia de la emisión (510 nm) fueron obtenidas con un microscopio invertido de epifluorescencia (Nikon Diaphot TMD, Nikon Corporation, Japón) y convertidas en datos digitales por un sistema de procesamiento de imágenes (BioLase Imaging System, Newton, MA). El sistema permitió la adquisición simultánea en tiempo real de las medidas de la fluorescencia de los múltiples campos de interés.

Inmunoblots

Las NGC fueron lavadas dos veces con PBS a 37°C y homogeneizadas en la solución de lisis [50 mM HEPES; 0.5 mM EDTA; 1% (v/v) NP-40; 0.25% (peso/v) SDS; 0.5 mM EGTA; 150 mM NaCl; 10 mM DTT; 1mM PMSF, 1 mM NaF; 2 g/ml aprotinina; 1 g/ml pepstatina; y 5 g/ml leupeptina]. Las proteínas presentes en los homogenados (50-100 μg de proteína por carril) fueron separadas por electroforesis en un gel de acrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Las proteínas resueltas fueron transferidas a las membranas de fluoruro de polivinildieno (PVDF) a 200 mA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

durante la noche. Las membranas fueron bloqueadas durante 1-3 hora con 5% de leche seca libre de grasas en TPBS (0,1% (v/v) Tween 20, PBS) y tratadas con un anticuerpo primario contra caspasa-3 o caspasa-9, después fueron tratadas con un anticuerpo secundario ligado a una fosfatasa alcalina. Las bandas fueron visualizadas usando quimioluminiscencia, siguiendo el protocolo del fabricante y expuestas a la placa Kodak XAR-5. Los análisis densitométricos se realizaron en el programa Image-J, NIH Image versión 0.93e.

Actividad de la Caspasa-3

Las NGC fueron lavadas con PBS y homogeneizadas en un amortiguador de lisis, después las muestras se diluyeron 1:1 (v/v) con glicerol y fueron almacenadas a -20°C . La actividad de las caspasas fue probada por un método fluorométrico (Thornberry, 1994) con un espectrómetro de luminiscencia (Spectronic Instruments, SLM Aminco-Bowman, Rochester, NY), con diversos sustratos para cada caspasa. El Ac-DEVD-AMC fue utilizado como sustrato para detectar la actividad de la caspasa-3. Las actividades se siguieron durante 15 minutos después de la adición del sustrato ($25\ \mu\text{M}$) y el homogenizado de células ($60-90\ \mu\text{g/ml}$) en una solución de estándar [$100\ \text{mM}$ HEPES; 10% (w/v) sacarosa; 0.1% (w/v) CHAPS; $10\ \text{mM}$ DTT; $1\ \text{mM}$ EDTA; $1\ \text{mM}$ PMSF; $1\ \text{mM}$ NaF; $2\ \mu\text{g/ml}$ aprotinina; $1\ \mu\text{g/ml}$ pepstatina; y $5\ \mu\text{g/ml}$ leupeptina]. Los resultados se expresan como DEVD proteolizado y evaluado como cambio en la intensidad de la fluorescencia/h/mg de proteína.

Northern blot

El ARN total se extrajo de las NGC (Chomczynski y Sacchi, 1987), se resolvió por electroforesis y se transfirió a membranas de nylon. El ARN se aisló a las 6h después del cambio de medio, cuando hay una máxima expresión de ARNm de caspasa-3 (Morán et al. 1999). Las membranas se prehibridizaron a $42\ ^{\circ}\text{C}$ por 2 h en una solución con 50% (vol/vol) de formamida, 1% (peso/vol) SDS y $100\ \mu\text{g/ml}$ de ADN de esperma de salmón. Las membranas se hibridizaron toda la noche con cADN de caspasa-3 humana o β -actina marcadas con ^{32}P (Fernandes-Alnemri et al, 1994). Las membranas se lavaron a $55\ ^{\circ}\text{C}$ con

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

una solución salina 2X de citrato de sodio (SSC; 0.3M NaCl y 30mM de citrato de sodio) y 0.1% (peso/vol) SDS y se expusieron a una placa Kodak X-OMAT a -70°C . Los análisis densitométricos se realizaron en el programa Image-J, NIH Image versión 0.93e. Los niveles de ARNm de caspasa-3 se expresan como la relación ARNm de caspasa-3/ARNm de β -actina.

Análisis Estadístico

Los datos fueron expresados como los promedios \pm error estándar, y la significancia estadística de los resultados se determinó por el análisis unidireccional de varianza (ANOVA), con $P < 0.05$, seguido por una prueba de Fisher.

RESULTADOS

Para evaluar el efecto del BDNF y NMDA sobre la sobrevivencia neuronal se empleó el modelo de las neuronas granulares de cerebelo (NGC) en cultivo. Estas neuronas requieren para su sobrevivencia y diferenciación de estímulos tróficos que pueden ser sustituidos por una despolarización con KCl. Si estas células se crecen en un medio con bajas concentraciones de potasio (K5) mueren de manera apoptótica a los 5-6 DIV, contrario a lo que ocurre si se cultivan despolarizadas con KCl 25 mM (K25). Bajo estas últimas condiciones el paso de alto potasio a bajo potasio a esta edad hace que las NGC mueran apoptóticamente (Fig 1) después de 24-48h (Gallo et al, 1987; Morán et al, 1999a). Una de las diferencias entre los dos modelos de muerte apoptótica es el grado de maduración en la población neuronal. En el caso de las neuronas crecidas con bajo potasio, las células son menos maduras que las crecidas en K25 y sus equivalentes *in vivo* (Gallo et al, 1987; Morán y Patel, 1999b; Alavez et al, 1996).

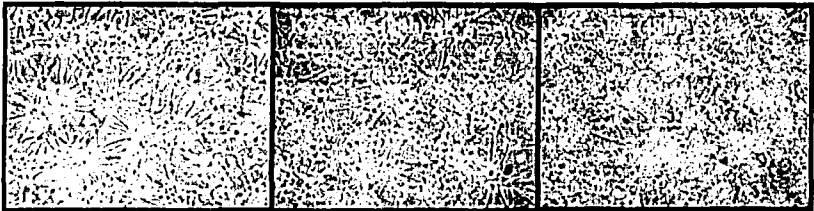


Figura 1. Las NGC fueron cultivadas durante 5-6 DIV en un medio con 25mM KCl (K25) y luego transferidas a un medio con bajo potasio (5mM KCl, K5) mostrando características morfológicas de muerte.

Papel del BDNF y NMDA en el modelo de bajo potasio crónico.

Cuando las NGC crecidas en bajo potasio se trataron con BDNF (100ng/ml) o NMDA (150 μ M) a los 4 DIV no se modificó la sobrevivencia de las neuronas (Fig 2). Sin embargo, si las NGC se cultivan inicialmente en bajo potasio KCl 5mM o 10mM (K5 o K10) con BDNF (K5+B) o con NMDA (K10+N), la sobrevivencia se incrementa en comparación con las NGC crecidas en bajo potasio por 5 DIV. El tratamiento adicional con BDNF y NMDA a los 4 DIV a NGC crecidas con BDNF o NMDA desde el principio del

cultivo no modificó la sobrevivencia celular (Fig 2). Estos estudios se basaron en la cuantificación de la transformación por la mitocondria de la sal de tetrazolio (MTT) a un producto insoluble colorido. Existen evidencias en este modelo que el empleo de esta técnica para medir viabilidad tiene una estrecha correlación con el número de células y el contenido de proteínas y ADN (Balazs et al., 1990; Morán et al., 1999; Valencia y Morán, 2001)

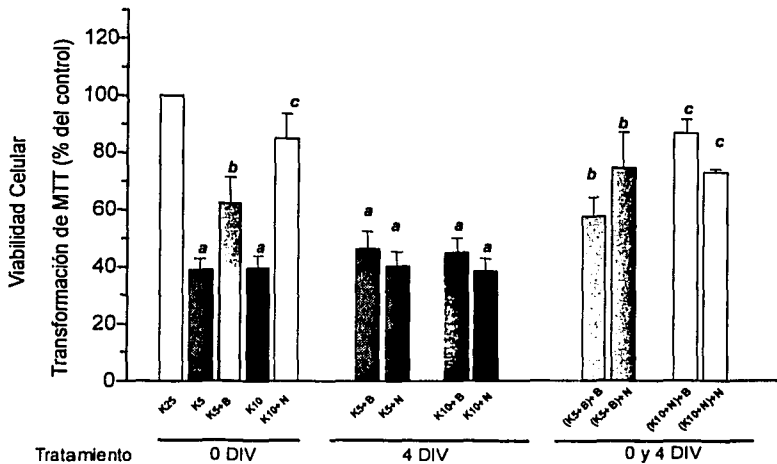


Figura 2. El BDNF (B) y NMDA (N) promueven sobrevivencia en las NGC en bajo potasio solo si están presentes desde el día 0 *in vitro* (DIV). Las NGC fueron crecidas en K25, K5, K5+B, K10 o K10+N desde los 0 DIV y después se les adicionó BDNF (100ng/ml) o NMDA (150μM) a los 4 DIV. La viabilidad celular fue cuantificada por la transformación de MTT a los 6 DIV. Estadísticamente diferente a K25 (a), K5 (b), K10 (c).

Participación del BDNF y NMDA en NGC crecidas en alto potasio.

Cuando las NGC se cambiaron de un medio con alto potasio (K25) a otro con bajo potasio (K5), también se privan de suero lo cual induce una muerte no significativa (datos no mostrados). Por esta razón se les añadió medio sin suero al cambiarlas de K25 a K5.

Utilizando el modelo de las neuronas crecidas crónicamente durante 5-6 DIV en K25 y tratadas con bajo potasio durante 24-48 h se probó el efecto del BDNF en concentraciones de 10 ng/ml a 500 ng/ml (Tabla 1). El BDNF redujo la muerte de manera

significativa desde los 100ng/ml, siendo el efecto mayor cuando el BDNF se preincubó 3 horas antes (-3h) del estímulo apoptótico. Por ello en los siguientes experimentos se empleó la condición de preincubación de BDNF antes del cambio de medio de K25 a K5. Una concentración de 10 ng/ml de BDNF no previno la muerte inducida por la privación de potasio (Tabla 1).

Viabilidad Celular
Transformación de MTT (% del control)

K25	100
K5	39 ± 1.73
K5+10B	45.55 ± 3.43
K5+100B	*52.25 ± 2.48
K5+500B	*47.54 ± 1.71
K5+100B(-3h)	*57.38 ± 1.43

Tabla 1. Dosis respuesta del BDNF sobre la viabilidad de las NGC privadas de potasio después de 5-6 DIV en K25. La sobrevivencia se evaluó a las 48h del estímulo por la técnica de MTT. Estadísticamente diferente de K5 (*).

Con el fin de conocer el tiempo necesario para que el BDNF tenga un efecto protector una vez iniciado el estímulo, se adicionó BDNF 2 y 4 horas después del estímulo apoptótico. Se encontró que es necesario que el BDNF sea añadido junto con el estímulo para que su efecto protector de muerte no se reduzca (Fig. 3).

Para saber si el BDNF actúa sobre otros estímulos apoptóticos, se evaluó el efecto del BDNF en NGC tratadas con estaurosporina, un inductor apoptótico. La figura 4 muestra que la estaurosporina (0.1 μ M) induce muerte apoptótica, pero el BDNF no inhibió dicha muerte.

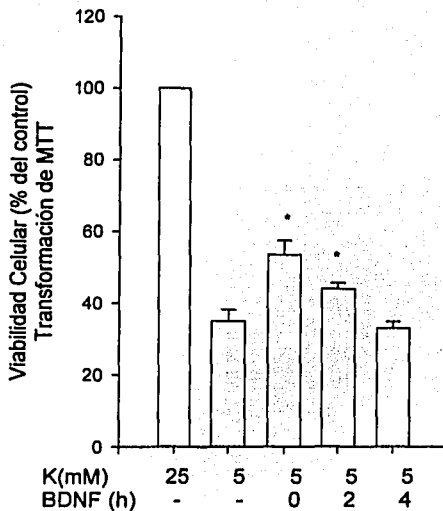


Figura 3. El BDNF no inhibe la muerte de las NGC cuando el estímulo apoptótico ya inició. Sobrevivencia de las NGC inducida por BDNF cuando éste es añadido al momento del estímulo apoptótico, 2h y 4h después. La sobrevivencia fue cuantificada 48 después del cambio de medio por la técnica de transformación de MTT. Estadísticamente diferente de K5 (*).

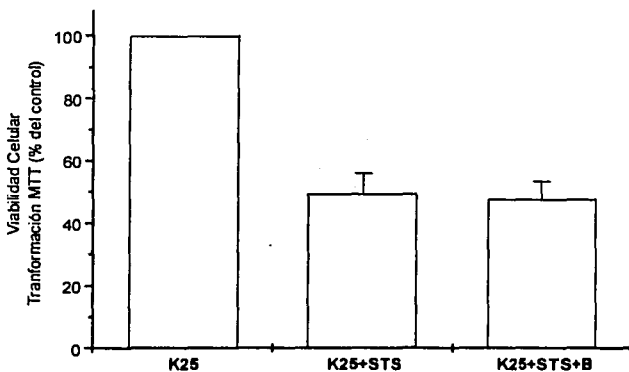


Figura 4. El BDNF no inhibe la muerte apoptótica inducida por la estaurosporina. Las NGC fueron crecidas en K25 por 7 DIV y se les añadió 0.1 μ M de estaurosporina (STS) con o sin 100ng/ml de BDNF (B). La sobrevivencia se evaluó a las 24h del estímulo de muerte.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Se evaluó si el NMDA puede rescatar de la muerte a las neuronas crecidas previamente en un medio K25 durante 5-6 DIV y transferidas a un medio con bajo potasio. En este caso se utilizó un medio con 10mM de KCl (K10) para despolarizar parcialmente la célula y liberar al Mg^{++} del receptor NMDA que impide su activación. Las condiciones K5 y K10 no son significativamente diferentes en la inducción de muerte. Bajo esta condición el NMDA inhibió 80% de la muerte inducida por privación de potasio a las 24h del estímulo. Dicha sobrevivencia está mediada por la activación del receptor NMDA, ya que al añadir MK-801, antagonista de NMDA, la neuroprotección se revierte (Tabla 2). Efectos similares en la sobrevivencia de las NGC generada por BDNF y NMDA se observaron cuando ésta se evaluó a las 48h del estímulo apoptótico (Fig 5).

Viabilidad Celular
Transformación de MTT (% del control)

K25	100
K10	55.80 ^a ± 3.64
K10+N	91.44 ^b ± 3.73
K10+N+MK	55.15 ^a ± 4.37

Tabla 2. El NMDA rescata de la muerte a las NGC cuando es añadido al momento del estímulo apoptótico. La sobrevivencia fue cuantificada 24h después del cambio de medio por la técnica de transformación de MTT. Estadísticamente diferente de K25 (a) y K10 (b).

Existe la posibilidad de una interrelación funcional entre el BDNF y el NMDA en la cual uno de éstos pueda inducir la liberación del otro y generar una señalización intracelular muy similar. Para ello, se evaluó el efecto separado y simultáneo de BDNF y NMDA sobre la sobrevivencia en la condición de privación de potasio. Cuando el BDNF y el NMDA se añaden por separado éstos incrementan 20 y 30% la sobrevivencia, respectivamente. El tratamiento simultáneo con estos dos compuestos incrementan la sobrevivencia aproximadamente 55% (Fig 5).

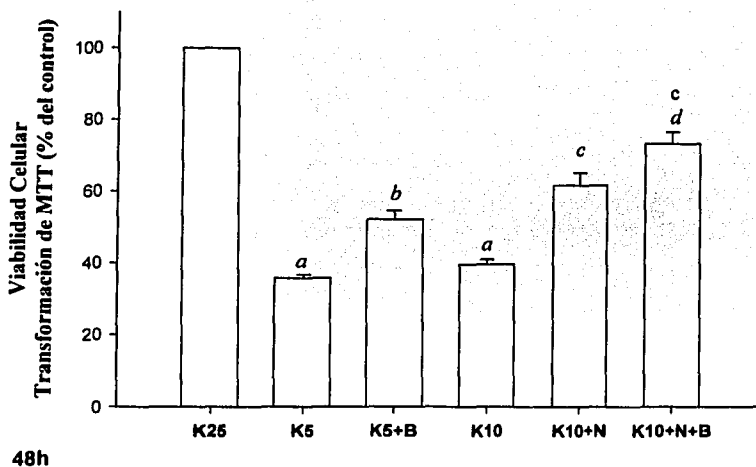
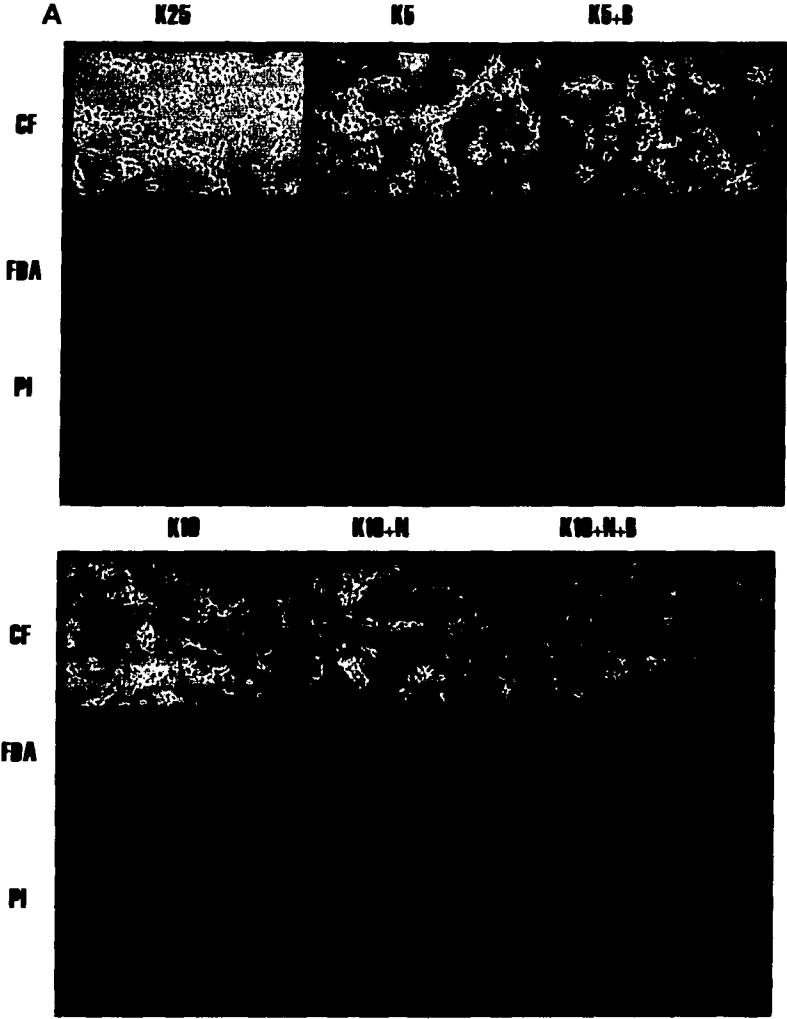


Figura 5. El BDNF y el NMDA actúan de manera sinérgica para inhibir la apoptosis. Las células fueron crecidas por 5-6DIV en un medio K25 y luego cambiadas a un medio sin suero K5 o K10 con o sin BDNF (B), NMDA (N). La sobrevivencia fue medida a las 48 h. La protección inducida por el BDNF es del 25%. La protección inducida por la activación del NMDAR es de 35% a las 48h después del cambio de medio. Cuando el BDNF y el NMDA están presentes, la muerte a las 48h disminuye aún más. Estadísticamente diferente de K25 (a), K5 (b), K10 (c) y K10+N (d).

Para confirmar la información obtenida por la técnica de MTT, se evaluó la sobrevivencia de NGC mediante otro método. Para ello se utilizó diacetato de fluoresceína (FDA) para teñir las células vivas y yoduro de propidio (PI) para teñir las células muertas que han perdido la integridad membranal (Fig 6). Mediante el uso de ambas técnicas se observan efectos similares sobre la sobrevivencia bajo todas las condiciones evaluadas. Sin embargo, la muerte por privación de potasio (K5) observada con FDA es menor (35%) que la observada por MTT (50%) a las 24h y en consecuencia, esto refleja una menor muerte para el resto de las condiciones. La diferencia observada se debe probablemente a que el FDA está teñiendo a células que están vivas, pero que están en un punto del proceso de muerte en el que hay una baja actividad mitocondrial. Por otro lado, cabe mencionar que en los cultivos privados de potasio se detectó aproximadamente 10% de neuronas que no se teñieron con FDA ni con PI. Esto podría deberse probablemente a que estas neuronas están

mueras pero todavía no pierden su integridad membranal, una característica de la apoptosis.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

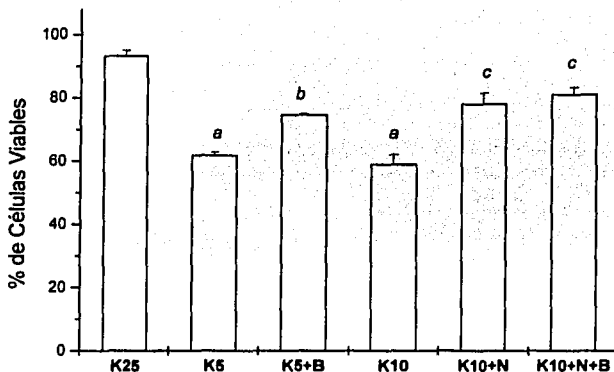
B

Figura 6. Efecto del BDNF y el NMDA sobre la muerte inducida por bajo potasio en NGC. Las células fueron crecidas por 5-6DIV en un medio K25 y luego cambiadas a un medio sin suero K5 o K10 con o sin BDNF (B), NMDA (N). La sobrevivencia fue medida a las 24 h. **A)** Efecto del BDNF y el NMDA en la morfología (CF) y sobrevivencia de las NGC que fueron sometidas a bajo potasio. Las células fueron observadas por contraste de fases (CF) y por microscopia de epifluorescencia. El diacetato de fluoresceína (FDA) tiñe a las células vivas (verde). El ioduro de propidio (PI) tiñe a las células muertas (rojo) con daño membranar. **B)** Los resultados se muestran como porcentaje de células positivas a FDA respecto al número total de neuronas por campo. Estadísticamente diferente de K25 (a), K5 (b), K10 (c).

Efecto de los inhibidores de NMDAR y TrkB sobre la sobrevivencia neuronal inducida por BDNF y NMDA

El receptor de glutamato tipo NMDA, NMDAR, es un canal activado por ligando el cual tiene diferentes sitios de regulación. El NMDAR puede ser bloqueado por el antagonista MK-801 que se une al interior del canal. El receptor de BDNF, TrkB, es un receptor membranar que presenta actividad de cinasa de tirosinas. Dicha actividad puede ser bloqueada con el uso de K252a (ICT), un inhibidor de cinasas de tirosina que bloquea preferentemente la activación del receptor TrkB.

Cuando el inhibidor de TrkB, ICT (200nM), se añade a células control se induce un 20% de muerte neuronal (datos no mostrados). Esto sugiere que el papel trófico de la despolarización por 25mM de KCl es parcialmente mediada por la activación de TrkB.

Se evaluó si el efecto sobre la sobrevivencia inducido por BDNF y NMDA es directo o mediado por sus respectivos receptores. Para ello se utilizaron inhibidores de

BDNF y NMDA, ICT (200nM) y MK-801 (1 μ M) respectivamente. El NMDA inhibió la muerte apoptótica en un 80% a las 24h del estímulo; dicha sobrevivencia fue bloqueada por el antagonista MK-801, sugiriendo una acción directa del NMDA sobre su receptor (Fig 7). La sobrevivencia inducida por NMDA fue mayoritariamente inhibida por el ICT, lo cual nos sugiere que la sobrevivencia inducida por el NMDA es parcialmente mediada por la activación del receptor TrkB o por otras cinasas de tirosina. Por otro lado, el ICT inhibió por completo la sobrevivencia inducida por BDNF, sugiriendo que la acción de este factor es de manera directa. Además, el MK-801 no modificó la acción del BDNF, lo que sugiere que los receptores NMDAR no participan en la sobrevivencia de las NGC inducida por BDNF (Fig 7).

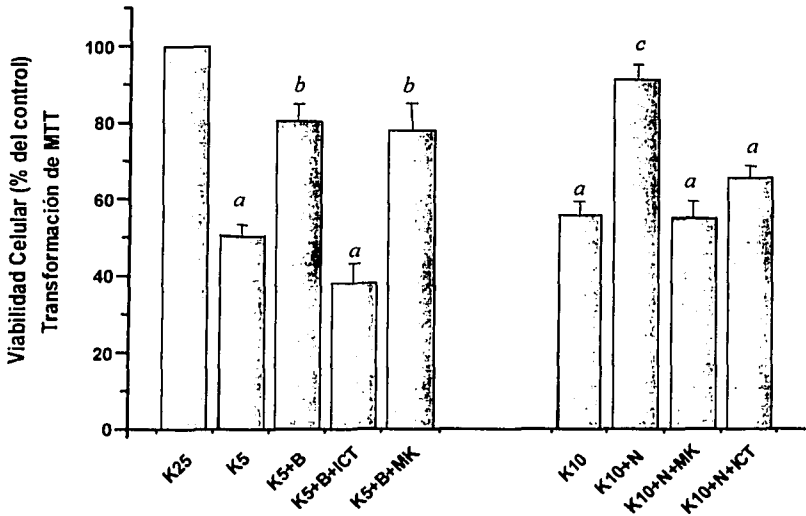


Figura 7. La sobrevivencia inducida por BDNF es a través del TrkB y no de NMDAR. El NMDA induce sobrevivencia a través del NMDAR y posiblemente a través de TrkB. Las células fueron crecidas por 5-6DIV en un medio K25 y luego cambiadas a un medio sin suero K5 o K10 con o sin BDNF (B), NMDA (N) y sus inhibidores ICT y MK-801 (MK) respectivamente. La sobrevivencia fue medida a las 24 h. Estadísticamente diferente de K25 (a), K5 (b) y K10 (c).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Papel del BDNF y el NMDA en la caspasa-3 inducida por privación de potasio.

La cascada de activación de las caspasas por privación de potasio ha sido recientemente caracterizada por nuestro grupo (Valencia y Morán, 2001; Caballero-Benítez y Morán, 2003). Se sabe que hay una activación de la caspasa-3 a partir de las 4 h del estímulo de muerte y que desaparece por completo después de las 24h. Basados en estos resultados medimos el papel de las caspasas 3 y 9 en el presente trabajo por un método fluorogénico y su procesamiento proteolítico por la técnica de Western blot. Se observó que en NGC crecidas en K25 en presencia de ICT, una condición que induce 20% de muerte, se indujo activación de caspasa-3. Esta condición indujo 5 veces la actividad de la caspasa-3 comparada con los niveles basales en K25, 7h después de la incubación con ICT (dato no mostrado).

La figura 8 muestra la actividad de caspasa-3 a tres diferentes tiempos, 1, 7 y 16 h después del cambio a K5. La actividad de la caspasa-3 no se modificó 1 h después del estímulo y tampoco por la presencia de BDNF y NMDA (Fig 8 A). Después de 7h y 16h, la actividad de esta caspasa se incrementó 25 veces y 35 veces, respectivamente, con respecto al control. Bajo estas condiciones el BDNF disminuyó aproximadamente 50% la actividad de esta caspasa después de 7 y 16h. El tratamiento con NMDA disminuyó alrededor de 60 y 70% la activación de caspasa-3 a las 7 y 16 h, respectivamente (Fig. 8A.).

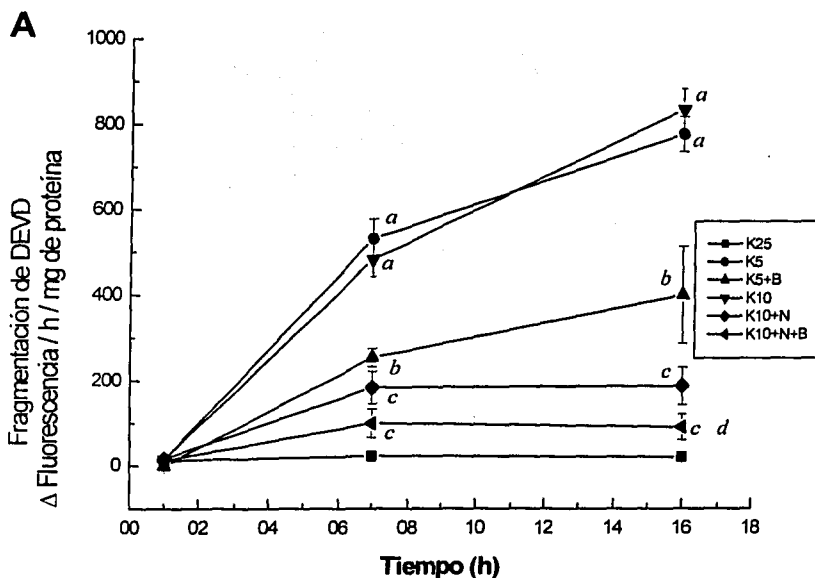
Cuando el NMDA y el BDNF se administraron de forma simultánea, se disminuyó la actividad de la caspasa-3 en un 80 y 90% a las 7 y 16 h, respectivamente. En relación a la condición de NMDA solo, la inhibición por ambas condiciones fue estadísticamente significativa sólo a las 16 h. Este efecto nos sugiere una acción sinérgica del BDNF y el NMDA sobre la inhibición de la actividad de la caspasa-3. Estos resultados correlacionan con los resultados obtenidos por Western blot, donde el patrón de detección del fragmento activo p 17 KDa fue muy similar (Fig 8 B y C). La única diferencia es que la magnitud observada del fragmento activo de la caspasa-3 (16 h) cuando las NGC han sido tratadas con BDNF es mucho mayor que lo observado por actividad fluorogénica.

Para determinar si los efectos inhibidores de BDNF y NMDA en la actividad de caspasa-3 involucran la activación de sus respectivos receptores, se emplearon los inhibidores ICT y MK-801 descritos anteriormente. La evaluación se realizó a las 7h

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

después del estímulo apoptótico y se encontró que la inhibición de caspasa-3 inducida por BDNF no se afecta con MK-801, pero se reduce aproximadamente 50% con ICT (Fig 9A).

De igual forma, el efecto inhibitor del NMDA sobre la actividad de caspasa-3 se ve revertido completamente en presencia de MK-801 (Fig 9B). El inhibidor de TrkB, el ICT, no revierte la acción del NMDA sobre la actividad de esta caspasa. Estos datos junto con los obtenidos sobre la viabilidad celular sugieren que el NMDA actúa parcialmente a través de la acción del BDNF, sin excluir una participación marginal de otro mecanismo protector. Sin embargo, la falta de efecto del ICT sobre el efecto protector de NMDA en la actividad de caspasa-3 sugiere que la muerte podría no estar mediada mayoritariamente por caspasa-3 o que existen vías alternas que se activan en la ausencia de dicha activación de esta caspasa en la condición de NMDA + ICT.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

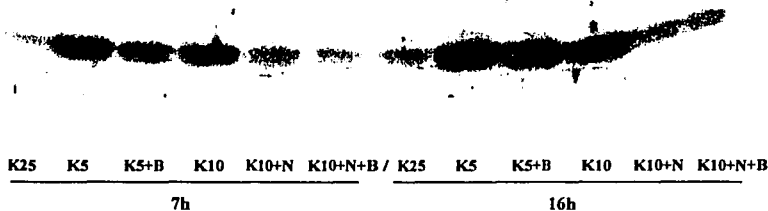
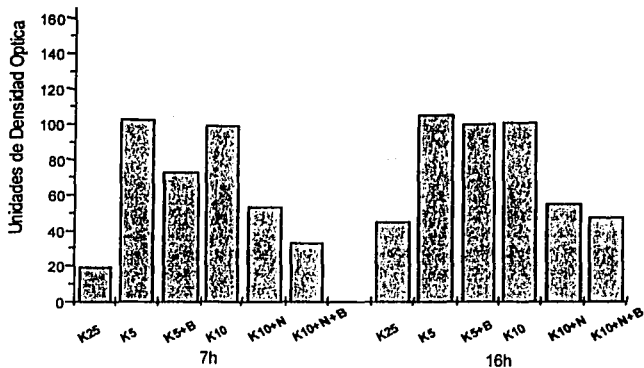
B**C**

Figura 8. El BDNF y el NMDA disminuyen la actividad y la fragmentación de la Caspasa-3 inducida por bajo potasio. **A)** El BDNF y el NMDA disminuyen la actividad de la Caspasa-3 inducida por bajo potasio. Perfil de la actividad de la caspasa-3 por la acción del BDNF (B) y el NMDA (N) a las 1h, 7h y 16h después del estímulo apoptótico. **B)** El BDNF y el NMDA disminuyen la fragmentación de caspasa-3 inducida por bajo potasio. La fragmentación de la caspasa-3, medida por Western Blot utilizando un anticuerpo primario contra el fragmento p17, coincide con la actividad de la caspasa-3 observada en A. Western blot representativo de 3 experimentos independientes. **C)** Densitometría de las bandas observadas en B. Estadísticamente diferente de K25 (a), K5(b), K10(c) y K10+N (d).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En estudios previos hemos reportado un incremento en el ARNm de la caspasa-3 inducido por la privación de potasio en las NGC, el cual es en gran parte consecuencia de un incremento en la transcripción del gen más que de un incremento en la estabilidad de éste (Morán et al, 1999). El tiempo de máxima inducción es a las 6h. En el presente trabajo encontramos que a las 6h de haber aplicado el estímulo apoptótico, el BDNF inhibió los niveles de ARNm de la caspasa-3 aproximadamente 40% (Fig 10).

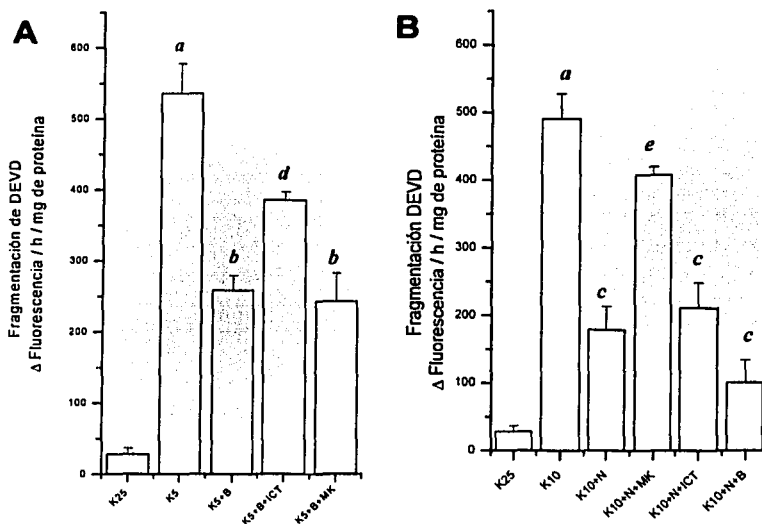


Figura 9. A) El BDNF disminuye la actividad de la Caspasa-3 inducida por bajo potasio a través de los receptores TrkB. **B)** El NMDA disminuye la actividad de la Caspasa-3 inducida por privación de potasio a través de su receptor NMDA. Actividad de la caspasa-3 a las 7h con o sin inhibidor del BDNF, ICT y del NMDA, MK-801. Estadísticamente diferente de K25 (a), K5(b), K10(c), K5+B (d) y K10+N (e).

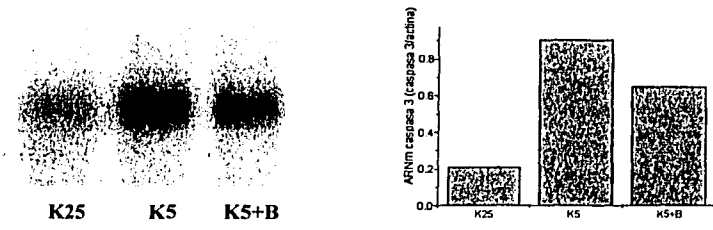
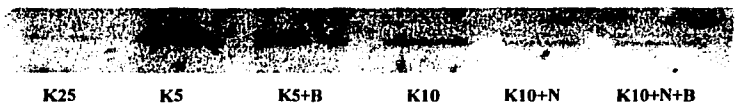


Figura 10. El BDNF disminuye el ARN mensajero de caspasa-3 inducida por bajo potasio. Las células fueron crecidas por 5-6DIV en un medio K25 y luego cambiadas a un medio sin suero K5 con o sin BDNF (B). El ARNm fue medido a las 6 h. Se muestra un Northern blot representativo de los ARNm de caspasa-3. La densitometría del ARNm de la caspasa-3 se muestra como la relación caspasa-3/actina.

Efecto del BDNF y el NMDA sobre la fragmentación de la caspasa-9 inducida por privación de potasio.

Se estudió el papel de la caspasa-9 en la acción protectora de BDNF y NMDA en las NGC. Para esto se investigó la fragmentación de caspasa-9 en cultivos tratados con K5 (Fig 11). Bajo estas condiciones, se encontró una fragmentación limitada de la procaspasa-9 que generó un fragmento de 10 KDa 1h después del estímulo apoptótico. El BDNF inhibió de manera parcial la activación de la caspasa-9 (40%), sin embargo el NMDA inhibió alrededor del 75% de la fragmentación de esta caspasa. La presencia de NMDA+BDNF no resultó en una mayor inhibición de la fragmentación de la procaspasa-9 que lo observado por NMDA.

A



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

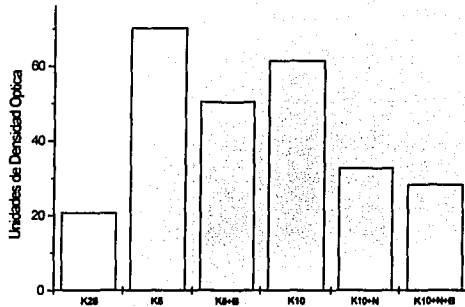
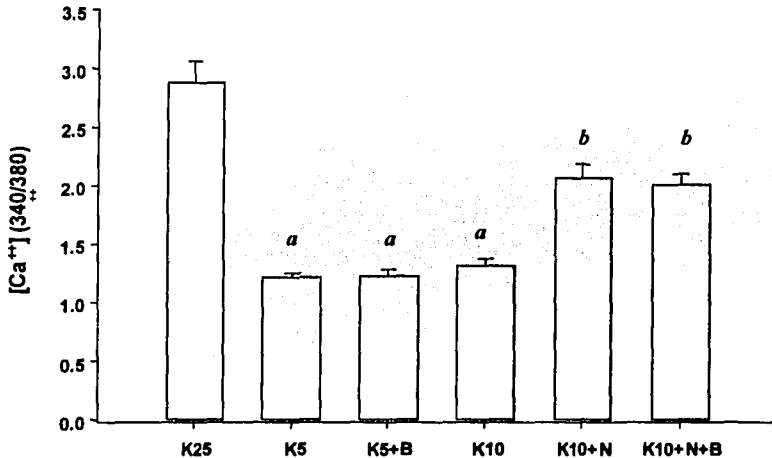
B

Figura 11. Tanto el BDNF como el NMDA disminuyen parcialmente la fragmentación de la caspasa-9 1h después del estímulo de muerte. **A)** La fragmentación de la Caspasa-9 inducida por bajo potasio fue medida por la técnica de Western blot, empleando un anticuerpo primario que reconoce el fragmento p10. Western blot representativo de tres experimentos independientes. **B)** Densitometría de las bandas observadas en **A**.

A

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

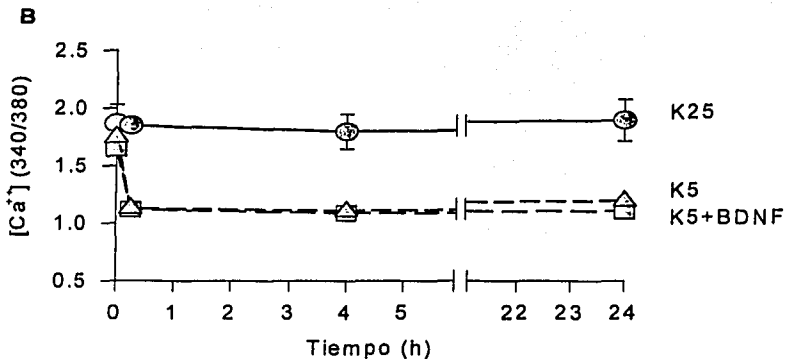


Figura 12. A) El NMDA incrementa los niveles de Ca^{++} intracelular a diferencia del BDNF. $[Ca^{++}]_i$ en las NGC transferidas (5 min) a un medio con bajo potasio con o sin BDNF o NMDA. B) Las NGC transferidas a un medio con bajo potasio con o sin BDNF, las lecturas se realizaron a los 15 min, 4h y 24h después del cambio de medio (K25 a K5). Estadísticamente diferente a K25 (a) y K10 (b).

Efecto del BDNF y el NMDA en los niveles intracelulares de calcio en NGC privadas de potasio.

El papel del calcio intracelular ($[Ca^{++}]_i$) en este proceso se estudió por un método fluorométrico utilizando Fura-2 AM. Se evaluó la $[Ca^{++}]_i$ justo después del cambio de medio de alto potasio a bajo potasio (Fig 12). Una condición de K5 reduce sustancialmente los niveles de $[Ca^{++}]_i$, similares a una condición de 10 mM KCl (K10). Estos niveles no se modificaron en presencia de BDNF tanto a tiempo cortos (1-5 min) como a tiempos largos (4-24 h) (Fig. 12). En contraste, el NMDA incrementó los niveles de $[Ca^{++}]_i$. La adición de BDNF+NMDA no alteró la respuesta inducida por NMDA sobre la $[Ca^{++}]_i$.

DISCUSIÓN

El desarrollo y la diferenciación del sistema nervioso están finamente regulados en tiempo y espacio por diversos eventos. Uno de ellos es la muerte neuronal masiva, cuyos mecanismos moleculares involucran como primeros mensajeros a los factores neurotróficos y los neurotransmisores. En este trabajo se investigó no sólo la participación del BDNF y el NMDA en la muerte apoptótica de las NGC en el desarrollo, sino también parte de los mecanismos moleculares involucrados en la muerte como la participación de caspasas y los niveles intracelulares de calcio.

En este trabajo encontramos que tanto el BDNF como el NMDA previenen la apoptosis inducida por la privación de potasio desde tiempos muy tempranos en la maduración de las NGC, complementando la información de otros trabajos (Kubo et al, 1995; Lindholm et al. 1993; Marini et al, 1992). En este estudio también sugerimos que existe una temporalidad en el proceso de muerte por privación de estímulos tróficos, ya que las NGC que son cultivadas en bajo potasio y se les añade BDNF o NMDA después de los 4 DIV no son capaces de sobrevivir. Esto sugiere que el proceso apoptótico de NGC presenta un tiempo crítico antes de comprometerse a morir.

En cultivos maduros, NGC crecidas en K25 por 5-6 DIV, la respuesta de las NGC al efecto protector de BDNF por privación de potasio no sólo es dependiente de concentración, sino también de la temporalidad del proceso apoptótico. Si el BDNF es añadido 2 y 4 h después del estímulo de muerte, el efecto protector se reduce y es nulo cuando las neuronas se han comprometido a morir. El BDNF previene aún más la muerte cuando es añadido al medio de cultivo 3h antes de exponerse a la privación de potasio, lo que sugiere que su efecto protector además de involucrar una señalización con segundos mensajeros podría requerir de la síntesis de macromoléculas capaces de contrarrestar la señalización inducida por la privación de potasio.

La protección o los estímulos de sobrevivencia que induce el BDNF en las NGC son específicos y por eso no pueden prevenir la muerte apoptótica provocada por otros estímulos como el de la estaurosporina. La señalización o los mecanismos de inducción de muerte de la estaurosporina difieren con los del modelo de privación de potasio. La muerte inducida por estaurosporina es en parte mediada por la inhibición de proteínas cinasas

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

como la PKC. Además, el patrón de inducción de caspasas es diferente con ambos estímulos, lo que refleja una señalización intracelular distinta (Caballero-Benítez y Morán, 2003). Por estas razones podemos señalar que a pesar de que la muerte inducida por K5 y estaurosporina son de tipo apoptótico, el balance entre las señales pro y anti-apoptóticas es diferente. El destino celular en el caso de la muerte inducida por K5 puede estar favorecido anti-apoptoticamente cuando está presente el BDNF, pero las señales anti-apoptóticas del BDNF no son suficientes para contrarrestar los efectos de la estaurosporina.

La respuesta de las NGC al NMDA es dependiente de la maduración de las neuronas en cultivo. Si las NGC son tratadas con NMDA después de los 8 DIV, el estímulo en vez de ser anti-apoptótico es excitotóxico. Uno de los primeros eventos en la muerte apoptótica de NGC por privación de potasio es la reducción del calcio intracelular resultante de una hiperpolarización y el cierre de los canales de calcio tipo L sensibles a voltaje. El papel del calcio en la prevención de la muerte ha sido demostrado dado que ionóforos de calcio como la ionomicina logran prevenir de manera significativa la muerte por privación de potasio. En este estudio, el NMDA previno la muerte inducida por privación de potasio en NGC de 5-6 DIV, en parte por la entrada de calcio a través de su receptor-canal NMDA. Los niveles intracelulares de calcio no fueron tan elevados como los observados por la despolarización con K25.

Las NGC en cultivo sobreviven debido a la despolarización por 25mM de KCl, lo que mimetizaría un aporte trófico. El NMDA también sería análogo a lo que ocurre *in vivo*, simulando las aferencias glutamatérgicas de las fibras musgosas. Se ha demostrado *in vitro* que el mecanismo por el cual estos dos estímulos promueven sobrevivencia es a través de la entrada de calcio a la célula. Si bien el potasio previene la muerte a través de incrementar los niveles intracelulares de calcio, cabe mencionar que esta sobrevivencia se afecta parcialmente en presencia de un inhibidor de TrkB, el ICT. Lo que sugiere una posible participación del receptor TrkB y BDNF. Esto sugeriría que el calcio sería la primera señal en la vía a partir de la cual podría inducirse una o más señales involucradas en la sobrevivencia, como la liberación de BDNF. Así, es posible que los mecanismos involucrados, no sólo en K25 sino también en el NMDA estén mediados por TrkB. Sin embargo, a diferencia del K25, las acciones del NMDA parecerían ocurrir casi totalmente a

través de este receptor, ya que si se adiciona ICT a células tratadas con K10+N, la sobrevivencia inducida por NMDA es casi completamente inhibida.

Se sabe que los niveles intracelulares de calcio inducidos por NMDA participan fundamentalmente en la sobrevivencia de las NGC; por otro lado, dado que la sobrevivencia es casi totalmente inhibida por ICT, podemos sugerir que el NMDA promueve un incremento de calcio intracelular que directa o indirectamente produce una síntesis y liberación de BDNF, el cual promueve sobrevivencia a través de la interacción con los receptores TrkB. Esta idea se apoya por el hecho de que la acción del BDNF es independiente de la entrada de calcio a la célula. Hay que mencionar que cuando el NMDA y el BDNF están juntos se promueve una mayor sobrevivencia, probablemente debido a que complementan sus acciones sobre mecanismos dependientes e independientes de calcio. Es necesario aclarar que aunque las evidencias apoyan la idea de que el efecto del ICT es inhibir una acción del NMDA mediada por TrkB, no se puede excluir una posible participación de otras cinasas como la PKA, PKC, PKG o CaM cinasa II que podrían ser sustrato de este inhibidor. Finalmente, la falta de efecto del antagonista del receptor de NMDA, el MK-801, sobre la acción protectora del BDNF permite sugerir fuertemente que el efecto del BDNF no está mediado por la activación directa o indirecta de los receptores tipo NMDA.

Se conocen mecanismos de interrelación funcional entre la activación del receptor NMDA y la acción del BDNF sobre la sobrevivencia neuronal. Ambos pueden inducir una señalización intracelular muy similar para promover sobrevivencia como lo es la activación de la vía PI-3K/Akt (Zhu et al, 2002). Ambos pueden activar la vía MAPK/ERK (Sato et al, 2001) y al factor de transcripción NF- κ B. Éste último es necesario para la neuroprotección inducida por NMDA (Lipsky et al, 2001). Es por ello que no es sorprendente que si ambos están presentes ante un estímulo pro-apoptótico como la privación de potasio, las señales de sobrevivencia sean de mayor magnitud y se vea reflejado en mayor sobrevivencia de las NGC.

El mecanismo por el cual actúan promoviendo sobrevivencia está parcialmente explicado por las vías PI-3K/Akt, MAPK/ERK y NF- κ B, y dado que ambos pueden inducir la liberación del otro se podría crear una asa de regulación de uno sobre el otro para tener efectos de sobrevivencia más duraderos. Sin embargo, se desconocía la acción de estos dos

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

factores sobre las caspasas, moléculas involucradas en el proceso apoptótico. En este trabajo se determinó que tanto el BDNF como el NMDA disminuyen alrededor de 50% la activación de la caspasa-3. Es importante señalar que al igual que en la sobrevivencia, cuando el NMDA y el BDNF actúan juntos, existe una acción aditiva sobre la inhibición de la activación de la caspasa-3 en tiempos relativamente largos.

En el presente trabajo se encontró también un pequeño incremento en el procesamiento proteolítico de la caspasa-9 en un tiempo temprano de la inducción apoptótica, 1h después del cambio de medio K25 a K5. Debido al procesamiento tan temprano de esta caspasa se podría proponer que juega un papel como señal iniciadora y no como proteasa ejecutora. A la hora del inicio del estímulo apoptótico, las NCG todavía no están comprometidas a la muerte, no se han presentado eventos determinantes en el destino celular como el incremento en las especies reactivas de oxígeno, la translocación de la fosfatidil serina ni la activación de caspasas ejecutoras como la caspasa-3 (Valencia y Morán, 2001). En un estudio reciente realizado por nuestro grupo se demostró la activación de la caspasa-9 a partir de las 3h, sin embargo no se exploró su procesamiento proteolítico en un tiempo tan corto (Caballero-Benitez y Morán, 2003).

La vía de señalización que lleva a la inhibición de la caspasa-3 por medio de BDNF y NMDA se desconoce, sin embargo gracias al empleo del inhibidor ICT y a otros estudios, se puede sugerir la vía de señalización pro-apoptótica que parcialmente están inhibiendo.

Una posibilidad de explicar la acción de ICT en la inhibición parcial de la actividad de la caspasa-3 sería a través de su acción inhibitoria sobre la PKC. Recientemente, se ha establecido la participación de la PKC δ en la apoptosis. En contraste con PKC α y ϵ , las cuales promueven sobrevivencia, la PKC δ ejerce una función pro-apoptótica a través de una vía de activación proteolítica dependiente de caspasa-3. PKC δ induce la liberación de citocromo c y la activación de caspasa-3 y gracias a la retro-activación por la caspasa-3 se genera una amplificación de su propia activación proteolítica (Leverrier et al, 2002). En relación a esto se ha encontrado que en ausencia de señales de sobrevivencia (privación de potasio en las NGC), la PKC δ induce la expresión y la acumulación de la ciclina D1 en el núcleo, lo cual da como resultado un ciclo celular abortado y muerte apoptótica (Villalba, 1998a). Si se inhibe la PKC δ , la apoptosis se bloquea hasta 7h después de la privación de potasio, lo que sugiere que su activación es un proceso secundario (Villalba, 1998b).

Recientemente se ha asociado también la acción de la PKC δ con la producción de especies de oxígeno reactivas por la NADPH oxidasa que resulta crítica para la promoción de la muerte apoptótica (Brown et al., 2003). La acción inhibitoria del ICT sobre las cinasas PKA y PKG no puede explicar su acción sobre la inhibición de la actividad de la caspasa-3, ya que estas dos cinasas promueven sobrevivencia neuronal (Li et al, 2000; Bonthius et al, 2003).

En función a los datos de la literatura podemos sugerir que existe una vía de activación de la caspasa-3 posiblemente a través de la señalización de PKC δ , sin embargo, la simple adición de ICT en las NGC en K25, promueve sólo una muerte parcial acompañada de una baja activación de caspasa-3. Esto significa que probablemente ICT promueve muerte a través de la inhibición de la actividad de TrkB y que esta falta de estímulo trófico induce la activación de la caspasa-3 independiente de la posible vía ya descrita.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CONCLUSIONES

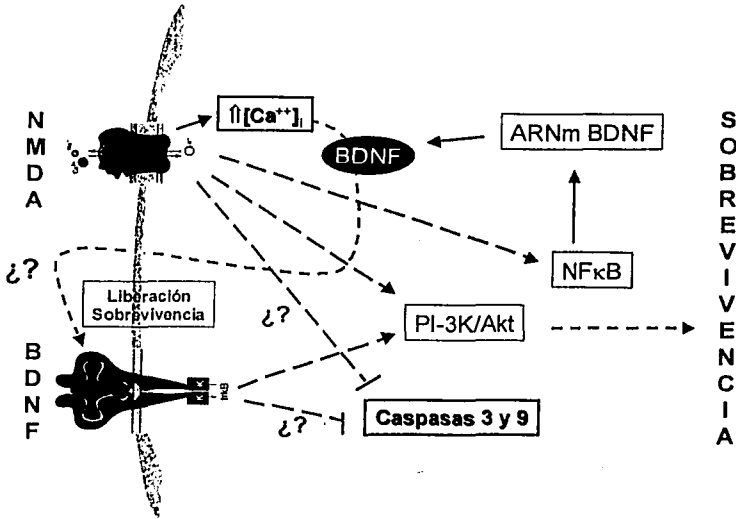
Tanto el BDNF como el NMDA protegen a las NGC de la muerte apoptótica inducida por privación de potasio. La protección por el BDNF y el NMDA está mediada por la activación de los receptores, TrkB y NMDAR, respectivamente. La sobrevivencia inducida por la activación del NMDAR parece estar mediada por la entrada de calcio a través del propio receptor y probablemente por una subsecuente liberación de BDNF y activación del receptor TrkB.

El BDNF y el NMDA disminuyen la activación de la caspasa-3 inducida por bajo potasio. El BDNF disminuye el incremento en el ARN mensajero de la caspasa-3 inducido por bajo potasio. Estas dos señales tróficas también disminuyen parcialmente la fragmentación de la caspasa-9 inducida por bajo potasio

La protección inducida por K25 está mediada parcialmente por BDNF, lo que sugiere la presencia de dos mecanismos de protección. En contraste, el efecto del NMDA pareciera estar mediado sólo por la acción de BDNF. Estos datos apoyan la idea de que el NMDA libera BDNF y éste ejerce su efecto protector a través de su receptor TrkB. Dado que K25 y NMDA elevan la concentración intracelular de calcio, es posible que el calcio dispare la liberación de BDNF.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

SEÑALIZACIÓN INDUCIDA POR BDNF Y NMDA



El BDNF y el NMDA inhiben parcialmente la muerte apoptótica inducida por la privación de señales tróficas como la despolarización por potasio. La protección dada por el BDNF y el NMDA está mediada por la activación de sus receptores (TrkB y NMDAR). El BDNF y el NMDA inhiben parcialmente la activación de las caspasas 3 y 9 inducida por bajo potasio. La supervivencia celular inducida por la activación del NMDAR parece estar mediada por la entrada de calcio a través del propio receptor (Balázs et al., 1988; Pearson et al., 1992) y probablemente por una subsecuente síntesis y liberación de BDNF que activaría al TrkB (Marini et al., 1998). Tanto la señalización inducida por NMDAR como por TrkB parecen converger en la activación de la vía PI-3K/Akt promotora de la supervivencia celular (Nonomura et al., 1996; Zhu et al., 2002). Además, la activación de NMDAR induce la activación de NFκB, el cual participa en la transcripción del ARN mensajero del BDNF, lo que probablemente contribuye a una mayor expresión de BDNF (Favaron et al., 1993; Lipsky et al., 2001).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMPA	Ácido D-Amino-3-Hidroxi-5-Metil-4-Isoxazol
ARN	Ácido ribonucleico
B	Factor Neurotrófico Derivado de Cerebro
BDNF	Factor Neurotrófico Derivado de Cerebro
CF	Contraste de fases
CGE	Capa granular externa
CGI	Capa granular interna
DIV	Días <i>in vitro</i>
DPN	Días postnatales
FDA	Diacetato de fluoresceína
ICT	K252a, inhibidor de cinasas de tirosinas preferencial al TrkB.
K10	Medio de cultivo con KCl 10 mM
K25	Medio de cultivo con KCl 25 mM
K5	Medio de cultivo con KCl 5 mM
KA	Kainato
KCl	Cloruro de potasio
MAPK	Cinasa de proteínas activada por mitógeno
MK-801	Antagonista de NMDA. 5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzof[a,d]ciclohepten-5,10-imine maleato
MTT	Sal de tetrazolio. Ensayo de viabilidad o actividad mitocondrial.
N	N-metil-D-aspartato
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina (reducido)
NFκB	Factor de transcripción nuclear kappaB
NGC	Neuronas o células granulares de cerebelo
NGF	Factor de Crecimiento Neuronal
NMDA	N-metil-D-aspartato
NMDAR	Receptor de glutamato tipo NMDA
NT-3	Neurotrofina-3
NT-4/5	Neurotrofina-4/5
NT-6	Neurotrofina-6
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PI	Ioduro de propidio
PI-3K	Cinasa de fosfoinositido-3
PKA	Cinasa de proteínas A dependiente de AMPc
PKC	Cinasa de proteínas C
PKG	Cinasa de proteínas G dependiente de GMPc
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
TGF β1	Factor de crecimiento transformante β1

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

BIBLIOGRAFÍA

- Akazawa C, Shigemoto R, Bessho Y, Nakanishi S y Mizuno N. 1994. Differential expression of five N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs in the cerebellum of developing and adults rats. *J Comp Neurol* 347:150-160.
- Alavez S, Gutierrez-Kobeh L, Moran J. 1996. Characterization of the activation of glutaminase induced by N-methyl-D-aspartate and potassium in cerebellar granule cells. *J Neurosci Res*. 45(5):637-46.
- Alavez S, Blancas S y Morán J. NMDA receptor inhibition modulates the apoptotic process in the rat cerebellum during development. Datos no publicados.
- Ankarcrona M, Dypburk JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, Nicotera P. 1995. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron*, 15:961-73.
- Arsenio-Núñez, M y Sotelo C. 1985. Development in the spino cerebral system in the postnatal rat. *J Comp Neurol*. 237:291-306.
- Balázs R, Jorgensen OS, Hack N. 1988. N-methyl-d-aspartate promotes the survival of cerebellar granule cells in culture. *Neuroscience* 27:437-451.
- Balázs R, Resink A, Hack N, Van der Valk JBF, Kuman KN y Michaelis E. 1992. NMDA treatment y K⁺-induced depolarization selectively promote the expression of a NMDA-preferring class of the ionotropic glutamate receptor in cerebellar granule cells. *Neurosci Lett* 137:109-113.
- Barbacid M. 1994. The Trk family of neurotrophin receptors. *J Neurobiol* 25:1386-1403.
- Beltrami E, Jesty J. 1995. Mathematical analysis of activation thresholds in enzyme-catalyzed positive feedbacks: application to the feedbacks of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92(19):8744-8.
- Bhave SV, Ghoda L y Hoffman PL. 1999. Brain-Derived Neurotrophic Factor mediates the anti-apoptotic effect of NMDA in cerebellar granule neurons: signal transduction cascades and site of ethanol action. *J Neurosci* 19(9):3277-3286.
- Bonni A, Brunet A, West AE, Datta SR, Takasu MA y Greenberg MA. 1999. Cell survival promoted by Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* 286:1358-1362.
- Bonthius DJ, Karacay B, Dai D, Pantazis NJ. 2003. FGF-2, NGF and IGF-1, but not BDNF, utilize a nitric oxide pathway to signal neurotrophic and neuroprotective effects against alcohol toxicity in cerebellar granule cell cultures. *Brain Res Dev Brain Res*.140(1):15-28.
- Brandoli C, Sanna A, Bernardi MA, Pollesa P, Brooker G y Mochetti I. 1998. Brain-Derived Neurotrophic Factor y Basic Fibroblast Growth Factor Downregulate NMDA receptor function in cerebellar granule cells. *J Neurosci* 18(19):7953-7961.
- Brown GE, Stewart MQ, Liu H, Ha VL, Yaffe MB. 2003. A Novel Assay System Implicates PtdIns(3,4)P(2), PtdIns(3)P, and PKCdelta in Intracellular Production of Reactive Oxygen Species by the NADPH Oxidase. *Mol Cell*. 11(1):35-47.
- Burgoyne R y Cambray-Deakin M. 1988. The cellular neurobiology of neural development, the cerebellar granule cell. *Brain Res Rev* 13:77-101.
- Caballero-Benitez A, Moran J. 2003. Caspase activation pathways induced by staurosporine and low potassium: Role of caspase-2. *J Neurosci Res*. 71(3):383-96.
- Chomeczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 162(1):156-9.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Cryns V y Yuan J. 1998. Proteases to die for. *Genes Dev* 12:1551-1570.
- Cunningham TJ. 1982. Naturally occurring neuron death and its regulation by developing neural pathways. *Int Rev Cytol*. 74:163-86.
- D'Mello Santosh R. Kuan Chia-Yi, Flavell Richard A y Rakie Pasko. 2000. Caspase-3 is required for apoptosis-associated DNA Fragmentation but not for cell death in neurons deprived of potassium. *J Neuroscience Res* 59:24-31.
- Davies AM, Lee KF, Jaenisch R. 1993. p75-deficient trigeminal sensory neurons have an altered response to NGF but not to other neurotrophins. *Neuron*. 11(4):565-74.
- Du Y, Bales KR, Dodel RC, Hamilton-Byrd E, Horns JW, Czilli DL, Simmons LK, Ni B y Paul SM. 1997. Activation of a caspase 3-related cysteine protease is required for glutamate-mediated apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:11657-11662.
- Erfors P, Lee KF y Jaenisch R. 1994. Mice lacking brain-derived neurotrophic factor develop with sensory deficits. *Nature* 368:147-150.
- Favaron M, Manev RM, Rimly JM, Candeo P, Beccaro M y Manev H. 1993. NMDA-stimulated expression of BDNF mRNA in cultured cerebellar granule neurones. *NeuroReport* 4:1171-1174.
- Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES. 1994. CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *J Biol Chem*. 269(49):30761-4.
- Frade JM, Rodríguez-Tébar A y Barde YA. 1996. Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor. *Nature* 383:166-168.
- Fraser A, Evan G. 1996. A license to kill. *Cell*. 85(6):781-4.
- Gallo V, Kingsbury A, Balázs R, Jørgensen OS. 1987. The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J Neurosci* 7:2203-2213.
- Hamburger V y Levi-Montalcini R. 1949. Proliferation, differentiation and degeneration in the spinal ganglia of the chick embryo under normal and experimental conditions. *J Exp Zool* 111:457-501.
- Harris CA, Deshmukh M, Tsui-Pierchala B, Maroney AC, Johnson EM Jr. 2002. Inhibition of the c-Jun N-terminal kinase signaling pathway by the mixed lineage kinase inhibitor CEP-1347 (KT7515) preserves metabolism and growth of trophic factor-deprived neurons. *J Neurosci*. 22(1):103-13.
- Hengartner MO. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407:770-776.
- Hu S, Snipas SJ, Vincenz C, Salvesen G, Dixit VM. 1998. Caspase-14 is a novel developmentally regulated protease. *J Biol Chem*. 273(45):29648-53.
- Ibanez, CF. 1994. Structure-function relationships in the neurotrophin family. *J Neurobiol* 25:1349-1361.
- Ikonomidou C, Bosch F, Miksa M, Bittigau P, Vockler J, Dikranian K, Tenkova TI, Stefovská V, Turski L y Olney JW. 1999. Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science* 283(5398):70-4
- Jones KR, Reichardt LF. Molecular cloning of a human gene that is a member of the nerve growth factor family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87(20):8060-4.
- Kandel ER, Shwartz JH y Jessell TM. 2000. Principles of Neural Science. Fourth Edition, McGraw-Hill.
- Katoh-Semba R, Takeuchi IK, Semba R, Kato K. 1997. Distribution of brain-derived neurotrophic factor in rats and its changes with development in the brain. *J Neurochem*. 69(1):34-42.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with a wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239-257.

- Kingsbury A, Balázs R. 1987. Effect of calcium agonists and antagonists on cerebellar granule cells. *Eur J Pharmacol* 140:275-283.
- Klein R, Ilos-santiago I, Smeyne RJ, Lira SA, Brambilla R, Bryant S, Zhang L, Snider WD y Barbacid M. 1994. Disruption of the neurotrophin-3 receptor gene *trkC* eliminates Ia muscle afferents and results in abnormal movements. *Nature* 368:249-2451.
- Klein R, Smeyne RJ, Wurst W, Long LK, Auerbach BA, Joyner AL y Barbacid M. 1993. Targeted disruption of the *trkB* neurotrophin receptor gene results in nervous system lesions and neonatal death. *Cell* 8:113-122.
- Komuro H y Rakic P. 1993. Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science* 260:95-97.
- Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, McGarry TJ, Kirschner MW, Kothe K, Kwiatkowski DJ, Williams LT. 1997. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science*. 278(5336):294-8.
- Kubo T, Nonomura T, Enokido Y, Hatanaka H. 1995. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) can prevent apoptosis of rat cerebellar granule neurons in culture. *Brain Res Dev Brain Res*. 85(2):249-58.
- Leist M y Jäättelä M. 2001. Four deaths y a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2:1-10.
- Leverrier S, Vallentin A, Joubert D. 2002. Positive feedback of protein kinase C proteolytic activation during apoptosis. *Biochem J*. 368(Pt 3):905-13.
- Levi G, Patrizio M y Gallo V. 1989. Release of endogenous y newly synthesized glutamate and other amino acids induced by N-methyl-D-aspartate receptor activation in cerebellar granule cell cultures. *J Neurochem* 56:199-206.
- Levine ES y Kolb JE. 2000. Brain-Derived Neurotrophic Factor increases activity of N-methyl-D-aspartate receptors in excised patches from hippocampal neurons. *J Neurosci Res* 62:357-362.
- Li M, Wang X, Meintzer MK, Laessig T, Birnbaum MJ, Heidenreich KA. 2000. Cyclic AMP promotes neuronal survival by phosphorylation of glycogen synthase kinase 3beta. *Mol Cell Biol*. 20(24):9356-63.
- Lindholm Dan, Dechant G, Heisenberg CP y Thoenen H. 1993. Brain-derived neurotrophic factor is a survival factor for cultured rat cerebellar granule neurons and protects them against glutamate induced neurotoxicity. *Eur J Neurosci* 5:1455-1464.
- Linnarsson S, Willson CA y Ernfors. 2000. Cell death in regenerating populations of neurons in BDNF mutant mice. *Mol Brain Res* 75:61-69.
- Lipsky RH, Xu K, Zhu D, Kelly C, Terhakopian A, Novelli A, Marini AM. 2001. Nuclear factor kappaB is a critical determinant in N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neuroprotection. *J Neurochem*. 78(2):254-64.
- Marini AM, Paul SM. 1992. N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neuroprotection in cerebellar granule cells requires new RNA and protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89(14):6555-9.
- Monti B y Contestabile. 2000. Blockade of the NMDA receptor increases developmental apoptotic elimination of granule neurons and activates caspases in the rat cerebellum. *Eur J Neurosci* 12(9):3117-3123.
- Morán J y Patel AJ. 1989. Effect of potassium depolarization on phosphate activated glutaminase activity in primary cultures of cerebellar granule neurons and astroglial cells during development. *Dev Brain Res* 46:97-105.
- Morán J, Alavez S, Rivera-Gaxiola M, Valencia A y Hurtado S. 1999a. Effect of NMDA antagonists on the activity of glutaminase and aspartate aminotransferase in the developing rat cerebellum. *Int J Devl Neuroscience* 17(1):57-65.

- Morán J, Itoh T, Reddy U, Chen M, Alnemri E y Pleasure D. 1999b. Caspase-3 expression by cerebellar granule neurons is regulated by calcium and cyclic AMP. *J Neurochem* 73:568-577.
- Nicholls D. 1995. *Proteins, Transmitters and Synapses*. Blackwell Science. Pp 155-183. Gran Bretaña.
- Nicholls DG, Budd SL. 1998. Mitochondria and neuronal glutamate excitotoxicity. *Biochim Biophys Acta*. 1366(1-2):97-112.
- Nijhawan D, Hornarpour N y Wang X. 2000. Apoptosis in neural development and disease. *Annu Rev Neurosci* 23:73-87.
- Nonomura T, Kubo T, Oka T, Shimoke K, Yamada M, Enokido Y, Hatanaka H. 1996. Signaling pathways and survival effects of BDNF and NT-3 on cultured cerebellar granule cells. *Brain Res Dev Brain Res*. 97(1):42-50.
- Numakawa T, Takei N, Yamagishi S, Sakai N y Hatanaka H. 1999. Neurotrophin-elicited short-term glutamate release from cultured cerebellar granule neurons. *Brain Res* 842:431-438.
- Okada A, Furber S, Okado N, Homma S, Oppenheim RW. 1989. Cell death of motoneurons in the chick embryo spinal cord. X. Synapse formation on motoneurons following the reduction of cell death by neuromuscular blockade. *J Neurobiol*. 20(4):219-33.
- Oppenheim R, Prevette D, Tytell M y Homma S. 1990. Naturally occurring and induced neuronal death in the chick embryo in vivo requires protein and RNA synthesis: evidences for the role of cell death gene. *Dev Biol* 138:104.
- Oppenheim RW. 1991. Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 14:453-501.
- Pearson H, Graham MR, Burgoyne RD. 1992. Relationship between intracellular free calcium concentration and NMDA-induced cerebellar granule cell survival in vitro. *Eur J Neurosci* 4:1369-1375.
- Purves D y Lichtman JW. 1985. *Principles of Neural Development*. Sinauer Associates, Inc.
- Purves D, Snider WD, Voyvodic JT. 1988. Trophic regulation of nerve cell morphology and innervation in the autonomic nervous system. *Nature*. 10;336(6195):123-8.
- Resink A, Hack N, Boer GJ y Balázs R. 1994. Growth conditions differentially modulate the vulnerability of developing cerebellar granule cells to excitatory amino acids. *Brain Res*. 655(1-2):222-32.
- Resink A, Villa M, Benke D, Möler H y Balázs R. 1995. Regulation of the expression of NMDA receptor subunits in rat cerebellar granule cells: effect of chronic K+-induced depolarization and NMDA exposure. *J Neurochem* 64:558-565.
- Rocamora N, García-Ladona FJ, Palacios JM y Mengod G. 1993. Differential expression of brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, y low-affinity nerve growth factor receptor during postnatal development of the rat cerebellar system. *Mol Brain Res* 17:1-8.
- Roth KA, D'Sa C. 2001. Apoptosis and brain development. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 7(4):261-266
- Sanes DH, Reh TA y Harris WA. 2000. *Development of the Nervous System*. Academic Press.
- Sato M, Suzuki K, Nakanishi S. 2001. NMDA receptor stimulation and brain-derived neurotrophic factor upregulate homer 1a mRNA via the mitogen-activated protein kinase cascade in cultured cerebellar granule cells. *J Neurosci*. 21(11):3797-805.
- Schulz JB, Weller M, Klockgether T. 1996. Potassium deprivation-induced apoptosis in cerebellar granule neurons: a sequential requirement for new mRNA and protein synthesis, ICE-like protease activity, and reactive oxygen species. *J Neurosci* 16:4696-4706.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Schwartz PM y Borghesani PR. 1997. Abnormal cerebellar development and foliation in BDNF -/- mice reveals a role for neurotrophins in CNC patterning. *Neuron* 19:269-281.
- Shwartz JP. 1992. Neurotransmitters as neurotrophic factors: a new set of functions. *International Review of Neurobiology*, 34:1-23
- Segel GJ., Agranoff BW, Fisher SK, Albers RW, Uhler MD. 1999. *Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular and Medical Aspects*. Sexta edición.
- Suzuki K y Koike T. 1996. Brain-derived neurotrophic factor suppresses programmed death of cerebellar granule cells through a posttranslational mechanism. *Mol Chem Neuropathol* 30:101-124.
- Thornberry NA y Lazebnik Y. 1998. Caspases: enemies within. *Science* 281:1312-1316.
- Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molineaux SM, Weidner JR, Aunins J, et al. 1992. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature*. 356(6372):768-74.
- Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP, Rasper DM, Timkey T, Garcia-Calvo M, Houtzager VM, Nordstrom PA, Roy S, Vaillancourt JP, Chapman KT, Nicholson DW. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. 1997. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem*. 272(29):17907-11.
- Thornberry NA. 1994. Interleukin-1 beta converting enzyme. *Meth Enzymol* 244:615-631.
- Timusk T, Belluardo N, Metsis M y Person H. 1993. Widespread and developmentally regulated expression of Neurotrophin-4 mRNA in rat brain and peripheral tissues. *Eur J Neurosci* 5:605-613.
- Valencia A y Morán J. 2001. Role of oxidative stress in the apoptotic cell death of cultured cerebellar granule neurons. *J Neurosci Res* 64:284-297.
- Verderio C, Coco S, Prevettoni E, Bacci A, y Matteoli M. 1999. Synaptogenesis in hippocampal cultures. *Cell Mol Life Sci* 55:1448-1462.
- Villalba M. 1998a. A possible role for PKC delta in cerebellar granule cells apoptosis. *Neuroreport*. 9(10):2381-5.
- Villalba M. 1998b. Bisindolylmaleimide prevents cerebellar granule cells apoptosis: a possible role for PKC. *Neuroreport*. 9(8):1713-7
- Walker NP, Talanian RV, Brady KD, Dang LC, Bump NJ, Ferez CR, Franklin S, Ghayur T, Hackett MC, Hammill LD, et al. 1994. Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer. *Cell*. Jul 29;78(2):343-52.
- Ward M W, Rego AC, Frenguelli BG y Nicholls DG. 2000. Mitochondrial membrane potential and glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *J Neurosci* 20:7208-7219.
- Word K, Dispasquale B y Youle R. 1993. In situ labeling of granule cells for apoptosis associated DNA fragmentation reveals different mechanisms of cell loss in developing cerebellum. *Neuron* 11:621-632.
- Xue D, Horvitz HR. 1997. *Caenorhabditis elegans* CED-9 protein is a bifunctional cell-death inhibitor. *Nature*. 390(6657):305-8.
- Yuan J y Yankner BA. 2000. Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407:802-809.
- Zhu D, Lipsky RH, Marini AM. 2002. Co-activation of the phosphatidylinositol-3-kinase/Akt signaling pathway by N-methyl-D-aspartate and TrkB receptors in cerebellar granule cell neurons. *Amino Acids*. 23(1-3):11-7.
- Zigmond M J. *Fundamental Neuroscience* 1999. San Diego: Academic Press.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN