



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

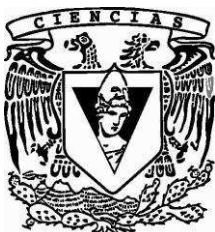
**PAPEL DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE
OXÍGENO EN LAS ACCIONES TRÓFICAS
DEL BDNF Y NMDA EN LAS NEURONAS
GRANULARES DE CEREBELO**

T E S I S

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

P R E S E N T A:

ERIKA AVENDAÑO GUZMÁN



**DIRECTOR DE TESIS:
JULIO EDUARDO ROQUE MORÁN
ANDRADE**

2012



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.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Avendaño
Guzmán
Erika
56 08 47 75
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
407060104

2. Datos del Asesor

Dr.
Abel
Santamaría
Del Ángel

3. Datos del sinodal 2

Dra.
Alette
Ortega
Gómez

4. Datos del sinodal 1

Dr.
Julio Eduardo Roque
Morán
Andrade

5. Datos del sinodal 5

Dr.
Néstor Emmanuel
Díaz
Martínez

6. Datos del sinodal 3

Dra.
Susana Sugela
Blancas
Zugarazo

7. Datos del trabajo escrito

Papel de las especies reactivas de oxígeno en las acciones tróficas del BDNF y NMDA en las neuronas granulares de cerebelo
58 p.
2012

Este trabajo fue realizado en la División de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Julio Morán Andrade.

El proyecto contó con el apoyo de CONACYT 79788 y DGAPA-UNAM IN218310.

La realización de este proyecto contó con el apoyo técnico de la M. en C. Guadalupe Domínguez.

Durante la realización de mi tesis de licenciatura se me otorgó una beca por parte de DGAPA-UNAM IN218310

*“Sé que tu tarea no es fácil,
se que tu mirada siempre grácil
acepta jornadas poco halagadoras
y pesadas cargas nada tentadoras,
para dar a tu hija un pequeño extra
y mostrar al mundo lo que cuesta
entregarse a un ser a cambio de nada,
arriesgar su vida sin consuelo, ni paga...*

*...Tantos momentos de vivo aprendizaje,
tatuaron mi piel, sentaron mi linaje,
me mostraron con cautela la ruta correcta,
me llevaron de la mano, concretaron mis metas;
motivaron mis sueños, enaltecieron mis virtudes,
probaron mis destrezas entre cuantiosas vicisitudes.”*

*-Fragmento obtenido de “Mamá: mi vida es vida mientras siga siendo tu hija” por Erika
Avendaño*

AGRADECIMIENTOS:

Es un placer expresar mi gratitud a todas aquellas personas que han contribuido directa o indirectamente a la culminación de mi proyecto de tesis:

De manera especial expreso mi más sincero agradecimiento a mi tutor, el Dr. Julio Morán, por sus valiosos comentarios, guía y supervisión en la realización de este trabajo, a la M. en C. Guadalupe Domínguez por su apoyo en el cultivo celular y asesoría técnica, al Biól. Mauricio Olguín por enseñarme las técnicas de laboratorio, motivarme en el trabajo diario y estar siempre dispuesto a aclarar mis dudas, y a todos mis compañeros: Fís. Marco Antonio Zaragoza, Biól. Erick Martínez, Dr. Diego Hernández, M. en C. Angélica Coyoy, Q. F. B. Ana Valencia y Patricio Hernández por sus contribuciones y retroalimentación continua brindada a lo largo de mi proyecto y por crear una atmósfera agradable de trabajo dentro del laboratorio.

Asimismo, le agradezco a mis sinodales: Dr. Abel Santamaría Del Ángel, Dra. Alette Ortega Gómez, Dr. Néstor Emmanuel Díaz Martínez y Dra. Susana Sugela Blancas Zugarazo por sus críticas constructivas y observaciones oportunas.

Le dedico esta tesis a mi madre, motivo de todo mi respeto y admiración, por ayudarme a crecer fuerte y preparada y enseñarme a no rendirme hasta ver completadas mis metas y sueños; por predicar con el ejemplo la importancia del estudio y reservarme lo mejor de sí; pero sobre todo, por la entrega y amor incondicional que me ha cobijado en cada etapa de mi vida.

A mis abuelitos, Irma y Alfonso, les expreso mi más profundo agradecimiento por ser el máximo ejemplo de trabajo y honradez, por todos los años que me han cuidado y consentido, siempre alentándome en todas mis aspiraciones y abriéndome la parte más afectuosa de su corazón.

Le agradezco a mi tío Poncho por acompañarme en cada paso y cuidarme como a una hermana pequeña, por confiar y poner sus mayores expectativas en mí y por todo lo compartido en ya casi veinticuatro años de convivencia ininterrumpida.

Finalmente, hago extensiva mi gratitud a todos mis familiares, amigos y profesores que han sido partícipes de este arduo y tempestuoso proceso formativo, a través de sus conocimientos, cariño y apoyo.

ÍNDICE:

i.	ABREVIATURAS.....	i
ii.	RESUMEN.....	ii
I.	INTRODUCCIÓN.....	1
	1.1 <i>Desarrollo de las neuronas granulares de cerebelo</i>	2
	1.2 <i>Papel fisiológico del glutamato en el desarrollo de las NGC</i>	5
	1.3 <i>Crecimiento neurítico</i>	6
	1.4 <i>Neurotrofinas</i>	8
	1.5 <i>Efecto del BDNF en las NGC</i>	9
	1.6 <i>Especies reactivas de oxígeno (ERO)</i>	12
	1.7 <i>Efectos de las ERO en la morfología y función celular</i>	14
II.	ANTECEDENTES.....	16
III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	20
IV.	HIPÓTESIS.....	20
V.	OBJETIVOS.....	21
	5.1 <i>Objetivo general</i>	21
	5.2 <i>Objetivos particulares</i>	21
VI.	MÉTODOS.....	21
	6.1 <i>Cultivo de neuronas granulares de cerebelo</i>	21
	6.2 <i>Medio químicamente definido</i>	22
	6.3 <i>Viabilidad celular</i>	22
	6.4 <i>Medición de especies reactivas de oxígeno (ERO)</i>	23
	6.5 <i>Medición del crecimiento neurítico</i>	23
	6.6 <i>Análisis Estadístico</i>	23
VII.	RESULTADOS.....	24
	7.1 <i>Efecto de K5, BDNF, K25 y NMDA en la supervivencia de las NGC</i>	24
	7.2 <i>Efecto de K5, BDNF, K25 y NMDA en el crecimiento neurítico</i>	29
	7.3 <i>Efecto de K5, BDNF, K25 y NMDA en la producción de ERO en las NGC</i>	30
	7.4 <i>Efecto de K5, BDNF, K25 y NMDA en la supervivencia de las NGC en ausencia y presencia de antioxidantes</i>	34
VIII.	DISCUSIÓN.....	36
IX.	CONCLUSIONES.....	43
X.	BIBLIOGRAFÍA.....	44

ABREVIATURAS

Adenosin monofosfato cíclico	AMPC
Anión superóxido	O ₂ ^{•-}
Capa de células de Purkinje	CCP
Capa granular externa	CGE
Capa granular interna	CGI
Capa molecular	CM
Cinasa regulada por señales extracelulares	ERK
Cloruro de potasio 5mM	K5
Cloruro de potasio 25mM	K25
Diacilglicerol	DAG
Dihidroetidina	DHE
Especies reactivas de oxígeno	ERO
Etidio	Eth
Factor neurotrófico derivado de cerebro	BDNF
Fosfatidil inositol 3 cinasa	PI3K
Fosfolipasa C	PLC
Inositol trifosfato	IP ₃
Ioduro de propidio	IP
Línea celular de feocromocitoma	PC12
Medio Basal Eagle	MBE
Medio Dulbecco Modificado Eagle con Ham F12	DMEM-F12
Medio químicamente definido	CDM
Medio suplementado con suero	SSM
Neuronas granulares de cerebelo	NGC
N-metil- D-aspartato	NMDA
Óxido nítrico	NO•
Oxido Nítrico Sintetasa	NOS
Peróxido de Hidrógeno	H ₂ O ₂
Potenciación a largo plazo	LTP
Proteínas cinasas activadas por mitógenos	MAPK
Proteína cinasa B	Akt
Proteína de unión al elemento de respuesta AMPC	CREB
Radical Hidroxilo	OH ^{•-}
Receptor de glutamato tipo NMDA	NMDAR
Receptor de tropomiosina cinasa	Trk
Singlete de oxígeno	1O ₂
Sistema Nervioso	SN
Sistema Nervioso Central	SNC
Sistema Nervioso Periférico	SNP
Súper óxido dismutasa	SOD

RESUMEN

Durante el desarrollo del sistema nervioso ocurre una serie de eventos celulares que proliferación, migración, diferenciación, crecimiento neurítico y muerte celular. La mayoría de estos procesos están regulados por diversas señales tróficas a través de factores tróficos como el BDNF o la actividad sináptica mediada por neurotransmisores como el glutamato. Se sabe, por ejemplo, que en cultivos de neuronas granulares de cerebelo (NGC) el BDNF, la activación de receptores de glutamato tipo NMDA y concentraciones despolarizantes de potasio (KCl 25mM; K25) reducen la muerte neuronal programada. Por otro lado, algunos estudios recientes han sugerido que la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) podrían estar relacionada con algunos eventos del desarrollo. No existe suficiente información que relacione los efectos tróficos con la generación de ERO en algunos parámetros del desarrollo. Por ello, en el presente trabajo estudiamos el papel del BDNF, el agonista glutamatérgico N-metil-D-aspartato (NMDA) y el K25 en la supervivencia y el crecimiento neurítico de las NGC en cultivo y exploramos las acciones tróficas sobre la supervivencia neuronal están mediadas por las ERO. Debido a que el suero constituye un factor trófico por sí mismo, paralelamente a los experimentos realizados en un medio suplementado con suero (SSM), se realizaron ensayos en un medio químicamente definido (CDM). Nuestros resultados indicaron que las NGC cultivadas en un SSM durante 3 días in vitro (DIV) sobrevivieron en la misma proporción en presencia de NMDA, BDNF o K25 en comparación con el control (K5); sin embargo, a los 7DIV la viabilidad en K5 disminuyó en un 40%, mientras que las 3 condiciones experimentales rescataron completamente a las células de la muerte. En contraste, en un CDM una gran proporción (30-40%) de neuronas murieron a los 3DIV en todas las condiciones, mientras que a los 7DIV hay una disminución del 50% en la viabilidad del control (K5), NMDA y K25 y solo el BDNF rescató a las células de la muerte celular. Por otro lado, las células tratadas con cualquiera de las tres condiciones en SSM mostraron un aumento del 20-30% en el crecimiento neurítico, mientras que en CDM solo el BDNF incrementó el crecimiento, alrededor de un 35%. Por otro lado, las NGC mostraron una generación basal de ERO a todas las edades en condiciones control (K5) en SSM y CDM. La producción de ERO se incrementó con BDNF a los 3 y 5 DIV. NMDA incrementó las ERO a los 3 DIV y K25 no modificó los niveles de ERO a 3 ni 5 DIV. Interesantemente, las 3 condiciones redujeron los niveles de ERO a los 7 DIV. La presencia de antioxidantes no modifica los efectos tróficos de ninguna de las condiciones empleadas a ninguna edad. Los antioxidantes redujeron la viabilidad de NGC en condiciones de K5. Estos resultados sugieren que las acciones tróficas de BDNF, NMDA y K25 en la supervivencia no están mediadas por ERO, mientras que es posible sugerir que las ERO podrían mediar el efecto de BDNF y NMDA en el crecimiento neurítico de las NGC.

I. INTRODUCCIÓN

El desarrollo del cerebro incluye una serie de eventos tales, como la diferenciación y migración neuronal, proliferación de células neuronales, crecimiento axonal y dendrítico, sinaptogénesis, aparición de actividad eléctrica, mielinización axonal y muerte neuronal entre otras. Todos estos eventos se llevan a cabo a través de una gran cantidad de procesos altamente regulados que incluyen la participación de un gran número de cascadas de señalización (Ikonomidou et al., 2000).

Más de la mitad de las neuronas inicialmente formadas mueren durante el desarrollo por un proceso de muerte celular programada, ya que las neuronas que no lograron establecer sus conexiones adecuadamente son eliminadas por apoptosis (Bazan-Peregrino et al., 2007, Oppenheim, 1991, Wood et al., 1993, Alavez et al., 2003). Un déficit de la muerte tipo apoptótica durante el desarrollo del sistema nervioso central (SNC) provoca una desorganización funcional y estructural en diversas áreas del cerebro (Kuida et al., 1996). Estos procesos del desarrollo implican cambios morfológicos, bioquímicos y funcionales que pueden ocurrir en distintos periodos de tiempo y en varias regiones del cerebro, generalmente en una progresión caudal a rostral (Ikonomidou y Kaindl, 2011)

El cerebelo es un órgano importante para la integración de la percepción sensorial, control motor y equilibrio. Su corteza trilaminar ha permanecido invariable desde los peces hasta los mamíferos (Hibi y Shimizu, 2011). El cerebelo emerge de dos zonas de proliferación: la zona ventricular de la placa alar metencefálica, misma que da origen a las células de Pukinje y los núcleos profundos y la zona germinal secundaria denominada capa granular externa (CGE). La CGE se encuentra en la superficie dorsal del cerebelo en desarrollo, se

origina de la mitad rostral del labio rómbico y da lugar a los precursores de las neuronas granulares (Komuro y Yacubova, 2003, Sotelo, 2004).

El cerebelo está formado por varios tipos de neuronas, incluyendo las células de Purkinje, de Golgi, en canasta, estrelladas y las neuronas granulares del cerebelo (NGC), que son las más abundantes, no solo en el cerebelo, sino en todo el sistema nervioso central de mamífero (Sotelo, 2004). Las células de mayor tamaño tales como las neuronas de los núcleos profundos y células de Purkinje se originan antes y son las primeras en migrar. Sucesivamente lo harán las células que conforman el circuito cortical, como las neuronas granulares y las células gliales. Las células de Purkinje y granulares respectivamente, juegan un papel importante en el cerebelo, puesto que constituyen las principales neuronas GABAérgicas y glutamatérgicas (Hibi y Shimizu, 2011).

1.1 Desarrollo de las neuronas granulares de cerebelo

Las NGC poseen un cuerpo celular con un número variable de dendritas, se sitúan en la capa granular del cerebelo y proyectan su axón hacia la capa molecular. En dicha capa su axón se divide en dos ramas (fibras paralelas) que forman sinapsis con las células de Purkinje, estrelladas, de Golgi y de canasta (Komuro y Yacubova, 2003).

De acuerdo a Powell (1996) las NGC pasan por cuatro fases de diferenciación bien identificadas *in vivo*: neurogénesis, iniciación de la diferenciación neuronal, crecimiento axonal y migración neuronal y formación de contactos sinápticos (Komuro y Yacubova, 2003, Sotelo, 2004). Durante el desarrollo postnatal temprano del cerebelo, los precursores de las NGC proliferan activamente en la parte superior de la capa granular externa (CGE). Más tarde,

durante un periodo postmitótico las NGC inician su diferenciación (Ikonomidou y Kaindl, 2011).

Una vez concluidos dichos procesos de mitosis y de empezar su diferenciación, las NGC migran tangencial y radialmente, al mismo tiempo que sufren cambios de morfología en su soma y neuritas. Su trayectoria va desde la capa granular externa (CGE) hasta la capa granular interna (CGI) pasando por la capa molecular (CM) y la capa de células de Purkinje (CCP). Este movimiento intercala periodos estacionarios con desplazamientos cuya velocidad varía. Las NGC atraviesan la CGE a través de una migración tangencial, al mismo tiempo que dan inicio a la formación axonal, primero extienden un sólo proceso y luego un segundo, dejando dos procesos desiguales y paralelos a las capas del cerebelo (Ikonomidou y Kaindl, 2011, Komuro y Rakic, 1998, Sotelo, 2004).

Al llegar a la CM las NGC se alargan verticalmente y desarrollan un tercer proceso, perpendicular a los otros dos y en la dirección a la glia de Bergmann o glia radial. De esta forma las NGC atraviesan la CM en desarrollo hacia la CCP, guiadas por interacciones entre su superficie y las fibras de la glia de Bergmann (Komuro y Yacubova, 2003). Además, mientras las NGC migran sobre las fibras gliales, una neurita delgada sale del soma y se bifurca en “forma de T” hacia la capa molecular, dando lugar a la formación de las fibras paralelas. Estas últimas se convertirán en los axones de las NGC que harán sinapsis con las dendritas de las células de Purkinje, además de las células estrelladas, de Golgi y en canasta (Powell et al., 1997). En la CCP su morfología se torna esférica y desarrolla lamelipodios y filopodios en su porción distal. Estos últimos son altamente mótils y les permiten sondear el microambiente (Komuro y Rakic, 1998).

Posteriormente, las NGC llegan a la CGI donde permanecen alargadas verticalmente y con sus dos procesos perpendiculares al eje de las capas. Sin embargo, mientras más se acercan al límite inferior de la CGI con la materia blanca, más redonda es su morfología (Ikonomidou y Kaindl, 2011). Después de completar su migración, las NGC forman procesos dendríticos que inician la formación de sinapsis con un tipo de fibras aferentes llamadas fibras musgosas (Powell et al., 1997). Una NGC tarda aproximadamente dos días en completar su proceso de migración, el cual puede empezar desde el día postnatal 6 (P6) hasta el P15 donde todavía pueden observarse algunas neuronas llegando a la CGI. Generalmente el pico de migración se da en el P8 (Sotelo, 2004).

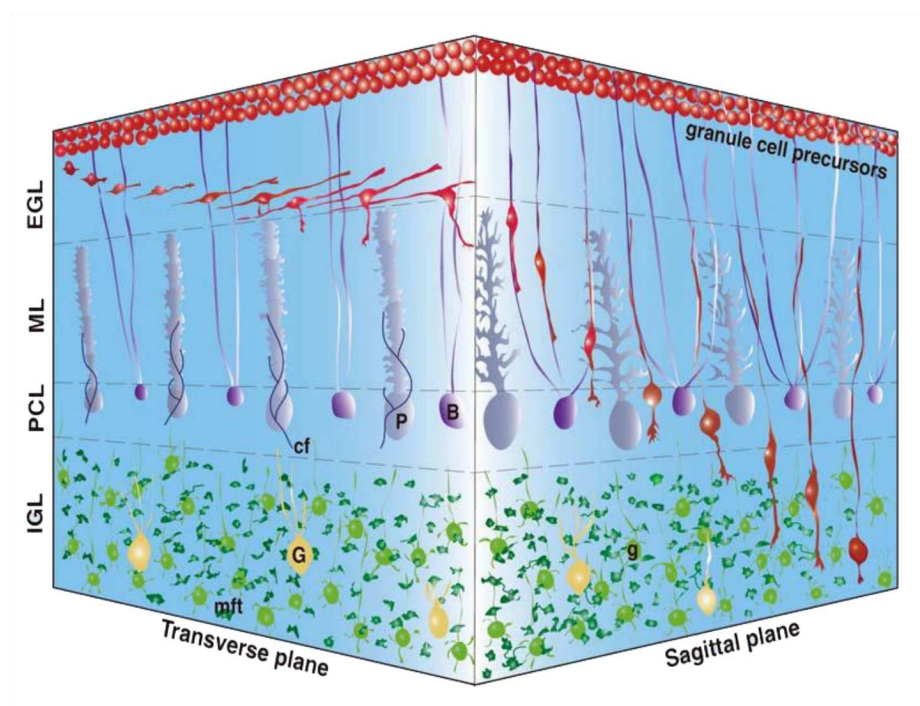


Figura 1. Representación tridimensional de la migración de las neuronas granulares de cerebelo de la capa granular externa (CGE) a la capa granular interna (CGI) en el desarrollo postnatal temprano (modificada de Komuro, 2003)

1.2 Papel fisiológico del glutamato en el desarrollo de las NGC

Sólo aquellas NGC que logran establecer conexiones adecuadas con las fibras musgosas y reciben un estímulo glutamatérgico, sobreviven y continúan el proceso de diferenciación, las demás mueren por un proceso de muerte programada (Alavez et al., 2006, Wood et al., 1993). Diversos factores neurotróficos, incluidos el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y neurotransmisores como el glutamato pueden influenciar la muerte neuronal apoptótica (Bazan-Peregrino et al., 2007). Se ha visto que el efecto trófico del NMDA en las NGC mimetiza el estímulo de excitación que reciben una vez establecidas, posterior a su migración y que es esencial para su supervivencia (Alavez et al., 2006). Este estímulo es dependiente de calcio, ya que la activación de los receptores de glutamato tipo NMDA (NMDAR), permite la entrada de calcio (Moran et al., 1999). Este aumento de las concentraciones de calcio en el medio intracelular se ha visto como un elemento de gran alcance en las cascadas de señalización desencadenadas por la activación de los NMDAR, ya que lleva a la producción de otros segundos mensajeros como el AMPc, inositol trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). La capacidad de los NMDAR para promover la señalización mediada por segundos mensajeros que involucran una gran variedad de mecanismos celulares, hace al receptor un potente regulador de la actividad metabólica neuronal (Tarnok et al., 2008).

Los NMDAR son receptores ionotrópicos de glutamato que forman complejos heteroméricos compuestos por diferentes subunidades: NR1, NR2 y NR3. La activación de los NMDAR requiere de la unión simultánea de dos co-agonistas: glutamato y D-glicina. El dominio de unión a ligando activado por glicina

se encuentra formado por la subunidades NR1 y NR3, mientras que el dominio de unión a ligando activado por glutamato se encuentra formado por la subunidad NR2 (Paoletti y Neyton, 2007). Los NMDAR poseen características únicas que los distinguen; por ejemplo forman un poro sensible a voltaje con alta afinidad a magnesio (Mg^{2+}) extracelular, posee sitios de unión a inhibidores alostéricos como iones de zinc (Zn^{2+}) e ifenprodil y su actividad puede ser modulada por poliaminas (Cull-Candy et al., 2001). El Mg^{2+} que bloquea el poro de los NMDAR es removido cuando surge una despolarización a través de la activación de otro receptor de tipo AMPA/Kaínico activado también por glutamato, facilitando así la activación de dichos receptores que juegan un rol crítico en la transmisión sináptica excitadora, plasticidad y excitotoxicidad (Van Dongen, 2009).

Al igual que el NMDA, condiciones despolarizantes de KCl simulan el estímulo de excitación que reciben las NGC de las fibras musgosas. Por ello, al cultivar las NGC en un medio con KCl 25mM las células sobreviven y se diferencian por más de 8 días. Por el contrario, las NGC mueren a los 8 días *in vitro* con características apoptóticas al ser cultivadas en un medio con concentraciones fisiológicas de KCl 5mM (Alavez et al., 2006).

1.3 Crecimiento neurítico

El correcto funcionamiento neuronal depende del establecimiento apropiado de conexiones durante el desarrollo. Dichas conexiones dependen en gran medida de los procesos celulares altamente especializados de las neuronas. *In vitro*, las NGC pasan de estados unipolares a bipolares, antes de desarrollar una morfología multipolar (Powell et al., 1997).

El crecimiento o elongación de las neuritas es posible gracias a una estructura altamente mótil en el extremo distal del axón, que sufre una constante reorganización del citoesqueleto denominada como de crecimiento. Diversas moléculas señalizadoras guían el crecimiento de axones y dendritas hacia sus blancos, mientras el cono de crecimiento avanza por polimerización y despolimerización de elementos del citoesqueleto (Munnamalai y Suter, 2009).

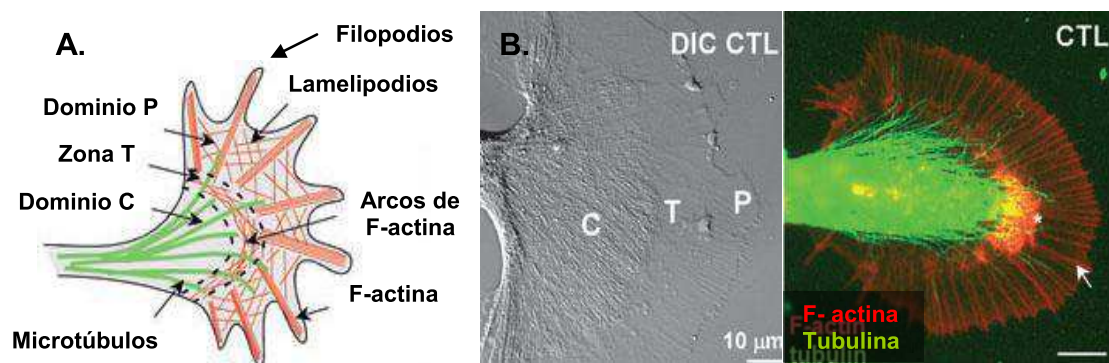


Figura 2. Cono de crecimiento axonal **A.** Representación esquemática de los dominios citoplasmáticos, se muestran los microtúbulos en verde y los microfilamentos en rojo. **B.** Foto de un cono de crecimiento axonal en un medio control, obtenida por microscopía de contraste por interferencia diferencial donde se observa C (dominio central), T (zona de transición) y P (dominio periférico). **C.** Doble marcaje del cono de crecimiento, se muestra la F-actina (rojo) y Tubulina (verde), la flecha señala un filopodio (Munnamalai, 2009)

El cono de crecimiento se compone mayoritariamente por dos macromoléculas: microtúbulos y microfilamentos y se puede dividir en tres partes. Del interior al exterior se sitúa el dominio central o “dominio C”, que representa el sitio principal de polimerización de microtúbulos que permiten el transporte de vesículas y organelos. Posteriormente está la zona de transición o “zona T”, situada en la interfase del dominio central y periférico, donde se concentra miosina, un motor molecular que permite contraer a la red de actina en forma de arcos. En la parte distal se encuentra el dominio periférico o “dominio P” rico en

actina y altamente dinámico. De este dominio salen protrusiones planas y membranosas llamadas lamelipodios, que se intercalan con haces delgados de actina en forma de dedos denominados filopodios y que llevan a cabo ciclos de elongación y retracción (Munnamalai y Suter, 2009).

1.4 Neurotrofinas

La supervivencia de las neuronas tanto centrales como periféricas, incluyendo neuronas granulares, corticales, del hipocampo, simpáticas y sensoriales, por mencionar algunas; depende en gran medida de su interacción con las neurotrofinas, una familia de proteínas esencial para el desarrollo del sistema nervioso, que intervienen en el crecimiento y guía axonal y dendrítica, migración, estructura sináptica y liberación de neurotransmisores, plasticidad sináptica, potenciación a largo plazo (LTP) y neuroprotección (Kim et al., 2002). La interacción de las neurotrofinas con sus receptores también influencia procesos de regeneración y supervivencia de las células neuronales, sus efectos están relacionadas con muchos aspectos de la actividad neuronal como la generación de nuevas conexiones sinápticas, que pueden ser duraderas (Chao et al., 2006, Li et al., 2007, Gao et al., 1995, Cohen-Cory et al., 2010, Haines y Goodhill, 2010).

Las neurotrofinas son factores de crecimiento sintetizados inicialmente como precursores de proteínas o pro-neurotrofinas, que se procesan intracelularmente para ser secretados, en la mayoría de los casos, en su forma madura y biológicamente activa (Mowla et al., 1999, Lu et al., 2005, Matsumoto et al., 2007).

La acción de las neurotrofinas: NGF, BDNF, NT3 y NT4/5 depende de dos receptores transmembranales diferentes; los receptores de tirosina cinasa (Trk),

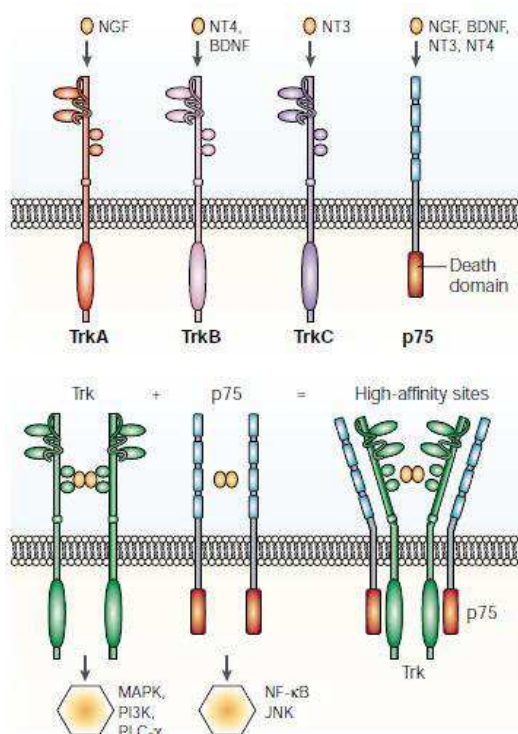


Figura 3 Modelo de activación y dimerización de los receptores Trk y p75 en respuesta a su unión con las neurotrofinas. Los receptores tipo Trk se unen selectivamente a las neurotrofinas, mientras que los receptores p75 se unen a todas, activando diferentes cascadas de señalización (Chao, 2003)

que se consideran de alta afinidad y son TrkA, TrkB y TrkC y los p75 considerados de baja afinidad. Éstos últimos se pueden unir a todas las neurotrofinas y pueden actuar como correceptores con los Trk (Chao, 2003, Li et al., 2007, Chao et al., 2006)).

Como se muestra en la figura 3, la señalización por medio de la familia de receptores Trk, actúa por medio de la dimerización de dos moléculas de dichos receptores que promueve su fosforilación intracelular. Esto es posible gracias a su dominio extracelular de inmunoglobulina

G (IgG) donde se une el ligando y la secuencia catalítica de tirosina cinasa en el dominio intracelular. Cada Trk activa diferentes cascadas de señalización (Chao, 2003)

1.5 Efecto del BDNF en las NGC

Las NGC expresan el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) así como su receptor de alta afinidad TrkB. Los niveles tanto de expresión como de actividad del BDNF y de su receptor TrkB aumentan durante el desarrollo postnatal temprano (Komuro y Yacubova, 2003, Chao, 2003). Entre todas las neurotrofinas, el BDNF tiene la expresión más abundante en el cerebro de mamíferos en

desarrollo y adultos (Cunha, 2010). La expresión y secreción del BDNF requiere de mecanismos ampliamente regulados gracias a la compleja organización del gen; mismo que está constituido por múltiples exones alternativos y un solo exón que codifica para la proteína entera del pro-BDNF (Cohen-Cory, 2011).

La regulación de la transcripción de BDNF por diferentes promotores y mecanismos de “splicing alternativo”, en distintas etapas del desarrollo y tejidos, constituye un mecanismo controlado de la disponibilidad y función del BDNF en distintas locaciones celulares. También es esencial la regulación local de la síntesis de BDNF para su función, ya que no difunde largas distancias, sino que actúa en receptores locales y su secreción puede ocurrir a través de dos vías: una secreción regulada en los procesos distales y una secreción de forma constitutiva en el soma (Cohen-Cory, 2011).

Existe evidencia in vivo e in vitro de que el BDNF modula la supervivencia y el desarrollo neurítico de las NGC (Finsterwald et al., 2010; Gao et al., 1995b; Ji et al., 2010). El BDNF, como las demás neurotrofinas, desencadena respuestas biológicas a través de la unión con su receptor de tirosina cinasa (TrkB). Aunque en general la unión de las neurotrofinas con su receptor tipo Trk lleva a la activación de tres cascadas de señalización intracelular: la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K) y fosfolipasa C (PLC). Por ejemplo, la unión del BDNF con el TrkB promueve el crecimiento neurítico principalmente a través de la cascada de las MAPK (Finsterwald et al., 2010).

La respuesta celular que genera el BDNF varía dependiendo en la forma en que es liberado. Aumentos agudos y graduales en las concentraciones de BDNF

provocan una activación transitoria o sostenida de su receptor TrkB, así como de las cascadas de señalización que se desencadenan río abajo. En cultivos de neuronas de hipocampo la activación transitoria del receptor TrkB promueve crecimiento neurítico y agrandamiento en las cabezas de las espinas neuríticas, mientras que su activación sostenida permite ramificación neurítica y elongación de los cuellos de las espinas neuríticas. Asimismo, un rápido incremento de BDNF facilita la transmisión sináptica basal y un incremento lento promueve la LTP (Ji et al., 2010).

Debido a que la cinética de la activación del TrkB y los demás receptores de neurotrofinas es crítica para la señalización celular; los ratones que carecen totalmente de neurotrofinas mueren durante las primeras semanas de vida. En ausencia de los niveles normales de BDNF, los ratones muestran agresividad, hiperactividad e hiperfagia (Rios et al., 2001), déficit en la memoria, altos niveles de ansiedad y déficits en LTP (Diogenes et al., 2011, Lessmann et al., 2011).

Por otro lado, existe evidencia de que el BDNF tiene un potencial terapéutico en varias enfermedades neurodegenerativas y puede proveer neuroprotección ante el estrés oxidativo. Por ejemplo, el tratamiento con BDNF exógeno puede atenuar la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra en respuesta a ERO y debida a su exposición a 6-hidroxidopamina (Altar et al., 1994). Sin embargo, a altas concentraciones o por medio de exposiciones prolongadas, el BDNF puede potenciar componentes necróticos y muerte neuronal. En modelos de muerte neuronal, el BDNF, NT-3 y NT4/5 pueden dejar a las neuronas altamente vulnerables a la privación de oxígeno y glucosa, posiblemente potenciado por la entrada de calcio y la producción de ERO a través

de los NMDAR. Neuronas corticales de 12-15 DIV expuestas a BDNF 100 ng/ml, aumentan la producción de ERO a las 16 horas (Kim et al., 2002). Además, la cantidad de superóxido aumenta de tres a cuatro veces, y los niveles de las subunidades p47-phox y p67-phox disminuyen en el citosol y aumentan en la membrana, sugiriendo que el BDNF activa a la NADPH oxidasa (Hwang et al., 2002).

En ciertas líneas celulares se ha visto que un incremento en la producción de ERO aumenta la disponibilidad de BDNF, aumentando así su liberación. Cultivos de PC12 y de células endoteliales de la microvasculatura cerebral expuestas a condiciones de hipoxia sostenida o intermitente han estimulado tanto la expresión como la liberación de BDNF por mecanismos que implican la entrada de calcio a través de canales activados por voltaje o de su liberación mediada por inositol trifosfato (IP₃) y reservorios sensibles a rianodina (Wang et al., 2006^a, Wang et al., 2006). También se sabe que el BDNF se encuentra empacado en vesículas y puede ser liberado en respuesta a una despolarización producida por potasio (Kruttgen et al., 1998)

1.6 Especies reactivas de oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son un conjunto de moléculas altamente reactivas que son generadas a través de diversas rutas metabólicas como producto de la ruptura o excitación del O₂ (O, O₃, ¹O₂), o bien por la reducción del mismo (O₂⁻, H₂O₂, OH⁻) (Aguirre et al., 2005). Las ERO generalmente tienen una vida media corta, difunden cortas distancias y reaccionan con moléculas cercanas al sitio donde se generaron debido a su alta reactividad (Covarrubias et al., 2008).

Todos los organismos aeróbicos producen ERO como el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidróxilo ($OH^{\cdot-}$), como producto de su metabolismo oxidante dentro de la mitocondria, ya sea derivado de la cadena de transporte de electrones en el complejo I y III o por enzimas tales como la superóxido dismutasa (SOD), monoamino oxidasa y p66shc (Munnamalai y Suter, 2009b). Por ejemplo, la mitocondria produce continuamente bajos niveles de $O_2^{\cdot-}$ como subproducto de la fosforilación oxidativa, los cuales son rápidamente convertidos a H_2O_2 por la SOD presente en la matriz mitocondrial; éste último es mucho más estable y capaz de difundir a través de la membrana. Otras fuentes de ERO fuera de la mitocondria son la β -oxidación de ácidos grasos, y reacciones catalizadas por oxidasas; ya sea unidas a la membrana como la NADPH oxidasa y lipoxigenasas, o en otros organelos como el citocromo p450 en el retículo endoplásmico y la xantina oxidasa en peroxisomas (Hernandez-Garcia et al., 2010, Vieira et al., 2011).

Por otro lado, las ERO se producen continuamente como parte del metabolismo de la célula, participando en procesos fisiológicos de una manera altamente regulada, ya sea como segundos mensajeros, reguladores en el señalamiento celular, o transductores de mensajes del medio extracelular para generar respuestas específicas dentro de la célula (Covarrubias et al., 2008). Pueden activar factores de transcripción como AP-1 y CREB (Lee et al., 2009, Suzukawa et al., 2000) y la expresión de protooncogenes como c-fos, c-jun, c-myc, egr-1 (Yoneyama et al., 2010). Se ha demostrado que las ERO tienen efectos en la morfología y función celular. Por ejemplo, H_2O_2 y $O_2^{\cdot-}$ pueden modificar cascadas de señalización que afecten la expresión génica, crecimiento y

diferenciación celular en diferentes tipos celulares, neuronales y no neuronales (Tsatmali et al., 2006).

1.7 Efectos de las ERO en la morfología y función celular

Existe una gran cantidad de evidencias que reportan la participación de pequeñas cantidades no tóxicas de ERO en procesos fisiológicos de células neuronales y no neuronales, tales como crecimiento neurítico, proliferación, supervivencia, muerte celular programada, transducción de señales y expresión de genes (Tsatmali et al., 2006, Yoneyama et al., 2010).

Por otro lado, el estatus redox intracelular también puede contribuir a los cambios asociados al envejecimiento y la progresión de desórdenes neurodegenerativos como las enfermedades de Alzheimer y Parkinson, así como a la muerte celular (Yoneyama et al., 2010).

Se ha observado que las ERO, principalmente H_2O_2 , actúan como un mediador en el señalamiento intracelular en la diferenciación neuronal de la línea celular de feocromocitoma (PC12) inducido por la neurotrofina NGF. Las ERO resultan indispensables, ya que al aplicar antioxidantes el crecimiento neurítico y diferenciación celular se suprime, a la par de otros eventos producidos en respuesta a la unión del NGF con su receptor TrkA (y mediados por ERO), como la activación de Rac1, la fosforilación de tirosinas en la vía Ras/Raf/MEK/MAPK y la activación del factor de transcripción AP-1 (Suzukawa et al., 2000a). El H_2O_2 también juega un papel importante mediando la síntesis de DNA inducida por el factor de crecimiento mediado por plaquetas (PDGF) en células de músculo liso (Sundaresan et al., 1995) y se ha descrito el papel de la producción de $O_2^{\cdot -}$ en el

crecimiento celular dependiente de Ras y de la vía de Rac1 (Sundaresan et al., 1996, Suzukawa et al., 2000b, Nimnual et al., 2003). En modelos de muerte celular inducida por K5 y estaurosporina se ha observado que la producción de ERO a través de la NADPH oxidasa modula procesos de muerte apoptótica en las NGC por medio de la activación de MAPK, específicamente p38 y JNK. (Ramiro-Cortes, et al., 2011).

Se ha relacionado la generación de ERO a través de proteínas Nox con la señalización que induce la supervivencia celular. El H₂O₂ producido en respuesta a un estímulo de estrés en dos líneas celulares de la retina (661W y RGC-5) resulta en un aumento de la vía pro-supervivencia de PI3K/Akt y una supresión de la maquinaria apoptótica (Mackey, et al., 2008, Groeger, et al., 2009). Por otro lado, al añadir bajas concentraciones no tóxicas de H₂O₂ a progenitores neurales multipotentes hay un aumento significativo en la densidad de células multipotentes y capaces de producir neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. De forma similar, al aplicar ERO exógeno como estímulo a cultivos de neuroesferas embrionarias y adultas de ratón, así como fetales humanas, también se observa un aumento en la autorenovación de células madre neurales (Le Belle, et al., 2011).

En las células de Aplysia se requieren ciertos niveles fisiológicos de ERO para la organización y correcto ensamblaje del citoesqueleto en el desarrollo del cono de crecimiento axonal. Al inhibir las NADPH oxidasas y lipoxigenasas, o al tratar a las células con antioxidantes, se inhibe la polimerización y se atenúa el flujo retrógrado de la F-actina, comprobando el papel crucial de las ERO en la dinámica de este evento (Munnamalai y Suter, 2009). En cultivos de neuronas corticales se han reportado altos niveles de producción de ERO al día postnatal 20

únicamente en zonas neurogénicas (Tsatmali et al., 2006), también se ha comprobado que los niveles de oxígeno y ERO modulan la proliferación y diferenciación de las células madre embrionarias (Vieira et al., 2011), regulan la motilidad y adhesión celular en fibroblastos y células vasculares endoteliales (Moldovan et al., 2006) y median la reorganización de actina a través de GTPasas de la familia Rho, incrementando a su vez la cantidad de ERO por medio de la activación del complejo NADPH oxidasa o de la cascada de la fosfolipasa A (PLA)/ácido araquidónico/lipoxigenasa (Woo et al., 2000).

II. ANTECEDENTES

Las NGC son un modelo de estudio bien establecido para conocer el desarrollo neuronal del sistema nervioso central ya que posee varias ventajas. Por ejemplo, los cultivos son relativamente homogéneos (95% son neuronas), expresan todos los subtipos de receptores glutamatérgicos y responden a diversos factores neurotróficos, en particular a las neurotrofinas (Jiang et al., 2003). Los cultivos de NGC han sido ampliamente utilizados para el estudio de los mecanismos de muerte neuronal. Estas células requieren la presencia de concentraciones despolarizantes de KCl (25mM) para sobrevivir en cultivo y al reducir las concentraciones de KCl a 5mM (K5) las NGC mueren de manera apoptótica (Balázs, R., et al., 1988, Moran, J., et al., 1999, Caballero-Benítez A y Morán J., 2003).

Como se ha mencionado, el desarrollo del sistema nervioso implica procesos de muerte celular programada en diferentes periodos y puede ser regulada por factores neurotróficos como el BDNF o agonistas de los receptores

de glutamato (Alavez et al., 2006a). Se sabe que las neurotrofinas y sus receptores están ampliamente distribuidas en el cerebelo en desarrollo (Cohen-Cory, 2011, Hofer, 1990, Gao, 1995) y dentro de él, en las NGC (Gao, 1995). Al igual que los NMDAR, cuya activación promueve supervivencia, migración neuronal, elongación neurítica y sinaptogénesis (Komuro y Rakic, 1992, Moran y Patel, 1989).

Se han reportado distintos mecanismos por los cuales el tratamiento con NMDA simula el estímulo glutamatérgico que reciben las NGC en su desarrollo, brindando protección a neuronas inmaduras. Por ejemplo, mecanismos dependientes de calcio, estimulación de la producción de BDNF (Bazan-Peregrino et al., 2007), inhibición de la vía pro-apoptótica de JNK, la activación de cascadas pro-supervivencia como MAPK/ERK1/2, PI3k/Akt, PKA/CREB y NFκB y la regulación de la transcripción de sistemas antioxidantes (Ramiro-Cortés, Y., et al., 2011, Jantas y Lason, 2009, Guerrini et al., 1997).

En estudios in vitro se ha encontrado que el tratamiento de NGC de 8 días postnatales (P8) con NMDA incrementa la supervivencia celular aproximadamente un 50-60%. Por otro lado, en estudios in vivo se ha demostrado que durante una ventana específica del desarrollo (ente el P7 y P11), el bloqueo de los NMDAR a través de antagonistas aumenta la tasa de eliminación apoptótica de NGC (Alavez et al., 2006).

Las condiciones despolarizantes de KCl podrían simular el estímulo de glutamato que reciben las NGC de las fibras musgosas en su desarrollo. Las NGC que permanecen in vitro tratadas crónicamente con concentraciones fisiológicas de potasio (5mM KCl; K5) por más de 5 días, mueren por apoptosis. Por el

contrario, cuando estas neuronas son cultivadas con altas concentraciones de potasio (25mM KCl; K25), la supervivencia aumenta significativamente (Alavez et al., 2006). De igual manera, las NGC cultivadas en un medio K25 por 7-8 días y posteriormente transferidas a un medio con bajo potasio (K5) y mueren apoptóticamente después de 24-48hrs. Bajo estas condiciones tanto el NMDA como el BDNF protegen a las NGC de una muerte inducida por K5. (Bazan-Peregrino et al., 2007).

En este sentido, existe evidencia de que las NGC expuestas a BDNF, entre otras neurotrofinas, muestran un aumento significativo en la extensión de sus neuritas. El crecimiento neurítico de agregados de NGC aumenta hasta tres veces su longitud tras su exposición a BDNF (Gao, 1995). Esto se ha interpretado como una posible acción trófica del BDNF sobre la maduración y diferenciación neuronal.

Además del BDNF, también se ha reportado que la activación de los NMDAR regula procesos de sinaptogénesis, plasticidad neuronal, crecimiento y ramificación de neuritas, arborización dendrítica y morfogénesis de espinas neuríticas, por medio de cascadas que involucran al calcio (Ca^{+}), la proteína cinasa dependiente de calcio-calmodulina (CaMK) y MAPK. En neuronas cerebrocorticales se ha reportado que un aumento en las concentraciones intracelulares de sodio actúa como un regulador positivo de los NMDAR, permitiendo la entrada de Ca^{+} y activando el crecimiento neurítico (George, J., et al., 2009). En el modelo de neuronas indiferenciadas P19, se ha observado que la estimulación del sitio sensible a poliaminas en los receptores NMDAR induce un aumento en la señalización por calcio en los conos de crecimiento neurítico, y su

inhibición selectiva en la subunidad NR2B afecta significativamente la extensión y fasciculación neurítica, sin embargo este proceso negativo puede revertirse totalmente añadiendo poliaminas (Georgiev, D., et al., 2008)

Por otro lado, las ERO juegan un papel importante en el crecimiento neurítico y están presentes en las tres regiones del cono de crecimiento neuronal: el dominio central, la zona de transición y el dominio periférico, siendo el dominio central el que muestra una mayor producción de ERO. Las NADPH oxidasas y lipoxigenasas son las fuentes principales de ERO que regulan el movimiento de la F-actina, principalmente en el dominio P del cono de crecimiento. Al inhibirse dichas fuentes de ERO se producen una serie de cambios morfológicos que implican la detención de la dinámica de los organelos, retracción significativa de los microfilamentos (52%), aplanamiento del dominio P y la zona T, disminución en el transporte axonal retrógrado y reemplazo de los filopodios y lamelipodios altamente estructurados por una red desorganizada (Munnamalai y Suter, 2009).

Diversos estudios han mostrado que las ERO tienen un rol fisiológico en la regulación del crecimiento de procesos celulares para motilidad, adhesión y, en el caso de neuronas, plasticidad y transmisión sináptica. Diferentes líneas celulares utilizan a las ERO como mediadores moleculares que activan diferentes cascadas para promover el crecimiento neurítico. Por ejemplo, el ácido lipoico promueve la extensión de neuritas en las células N2a a través de un aumento en la producción de ERO que activan a la vía de ERK (Wang, et al., 2011).

Aunque aún se desconocen los mecanismos específicos por los cuales las ERO afectan la estructura y dinámica del citoesqueleto, sí se conocen algunos posibles intermediarios de estos procesos. Uno de éstos son las GTPasas

pequeñas, como Rac1, que regulan la activación de NADPH oxidasas llevando a una producción de ERO. En el caso de la diferenciación y crecimiento neurítico de la línea PC12, se ha observado que la producción de ROS inducida por NGF depende directamente de Rac1 (Suzukawa et al., 2000). De la misma manera, en la línea celular HeLA, la producción de ERO regulada por Rac1 modula la activación de Rho para el remodelado del citoesqueleto de actina, así como para la formación de lamelipodios y ondulamientos de la membrana durante procesos de migración celular (Nimnual, A., et al., 2003).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se sabe que ciertas condiciones tróficas son reguladoras de una multitud de eventos durante el desarrollo del sistema nervioso. Por otro lado, existen evidencias que demuestran que las ERO participan en diversos procesos del desarrollo del sistema nervioso. Sin embargo, se desconoce la participación de las ERO en los mecanismos de acción de estas condiciones tróficas durante el desarrollo neural. Para explorar este punto, en este trabajo evaluamos el papel de las ERO en la supervivencia y crecimiento neurítico inducido por NMDA, BDNF y concentraciones despolarizantes de potasio en el desarrollo de NGC.

IV. HIPÓTESIS

La producción de ERO se encuentra mediando el efecto del BDNF y NMDA en la supervivencia y crecimiento neurítico de NGC en periodos tempranos de desarrollo.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Estudiar el papel de los factores neurotróficos en el desarrollo de neuronas granulares de cerebelo mediado por especies reactivas de oxígeno

5.2 Objetivos Particulares

Medir la supervivencia de las neuronas granulares de cerebelo expuestas a diferentes factores neurotróficos y evaluar el efecto de antioxidantes

Medir el desarrollo neurítico de neuronas granulares de cerebelo expuestas a diferentes factores neurotróficos y en los primeros días de desarrollo y evaluar el efecto de antioxidantes

Medir la producción de especies reactivas de oxígeno de la neuronas granulares de cerebelo tras ser expuestas a diferentes factores neurotróficos a distintos tiempos

VI. MÉTODOS

6.1 Cultivo de neuronas granulares de cerebelo

Se realizaron cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo, de acuerdo a Morán y Patel (1989). Las neuronas fueron obtenidas de ratas Wistar de 7-8 días siguiendo los procedimientos aprobados por el bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México y siguiendo la Guía para el Uso de Animales en Neurociencias. Las neuronas granulares de cerebelo fueron disociadas del tejido con tripsina y ADNasa y sembradas a una densidad de 1.5×10^6 células/ml en multicajas de cultivo de 12 ó 24 pozos previamente tratadas con poli-L-lisina (5µg/ml por 3h). Se empleó medio basal eagle (MBE) suplementado con 10% v/v de suero fetal bovina inactivado por calor, 2nM de glutamina, 20mM de KCl, 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomycin. Las células sembradas fueron incubadas a 37°C en una atmósfera saturada con vapor

de agua con 5% de CO₂ y 95% de aire. Para evitar la proliferación de células no neuronales se añadió citosina arabinosa a las 24 hrs. Las células fueron sembradas en un medio con cloruro de potasio 5mM (K5) y tratadas con BDNF (100ng/ml) K25 (cloruro de potasio 25mM) o NMDA (150 μM). En los ensayos con antioxidantes se aplicó EUK-134 (10μM) 24 hrs antes de realizar el experimento.

6.2 Medio químicamente definido

En algunos casos las células se cultivaron en un medio químicamente definido (CMD) elaborado con medio basal eagle (MBE) N2 suplementado (insulina 5μg/ml, transferrina 100μl/ml, progesterona 20nM, piruvato 1mM, putrescina 100nM, selenito de sodio 30nM). Al MBE se le agregó glutamina 2mM y penicilina 50 U/ml-estreptomicina 50μg/ml.

6.3 Viabilidad celular

La supervivencia fue estimada con un ensayo de vida-muerte con calceína-AM/ioduro de propicio (IP). Los cultivos fueron incubados con Calceína-AM (0.5 μM) y IP (10μM) por 15 minutos a 37°C. La calceína-AM entra a las células viables y metabólicamente activas y emite fluorescencia verde cuando ésta es hidrolizada por esterasas. Una vez hidrolizada deja de ser permeable para las membranas celulares. El IP es impermeable a las membranas celulares y tiñe únicamente a las células con la membrana celular dañada. Se empleó un microscopio invertido de epifluorescencia (Nikon Diaphot TMD; Nikon Corp., Japan) con filtros Nikon para detección de fluoresceína y rodamina con un objetivo Nikon 20x. Se tomaron fotos de cuatro campos por condición escogidos al azar. Para cuantificar la viabilidad, los resultados se expresaron como el porcentaje de células metabólicamente activas (positivas a calceína-AM) respecto al total de células (las células positivas a calceína-AM sumadas a las positivas a IP) y como el número de células contabilizadas como positivas a calceína normalizadas con respecto al control.

6.4 Medición de especies reactivas de oxígeno (ERO)

Se evaluó la producción de ERO mediante la oxidación fluorogénica de dihidroetidina (DHE) a etidio (Eth), en un ensayo cuantitativo. El dihidroetidio penetra las células y en presencia de ERO se oxida a etidio que se intercala en el DNA nuclear y fluoresce alrededor de los 600nm al ser excitado a 500-530nm. Los cultivos neuronales se incubaron durante 30 minutos con DHE (3.2 μ M) en condiciones de oscuridad a 37°C.

Los cultivos se observaron con un microscopio invertido de epifluorescencia Carl Zeiss con un filtro para detección de rodamina y un objetivo 20x de inmersión en aceite. Se tomaron fotos de cuatro campos por pozo escogidos al azar en dos intensidades diferentes y se midió la fluorescencia de las células con núcleos rojos mediante el software Image J versión 1.43u, tomando como parámetro la intensidad media de grises. Los resultados de fluorescencia de las NGC en respuesta a los diferentes tratamientos, fueron normalizados respecto a K5.

6.5 Medición del crecimiento neurítico

Se mezclaron NGC teñidas con el marcador de membranas PKH 67 (4 μ M) con NGC del mismo cultivo no teñidas en una proporción 1/36. Las células se observaron en un microscopio invertido de epifluorescencia Olympus IX-71, en un objetivo de 20x y con un filtro para detección de fluoresceína. Las imágenes obtenidas se analizaron con el software Image J versión 1.43u

6.6 Análisis Estadístico

Los datos se obtuvieron de al menos tres experimentos independientes y se expresaron como la media \pm E.E.S. Se les aplicó la prueba de ANOVA de una vía, o bien ANOVA Kruskal Wallis para los datos no paramétricos, seguidas de la pruebas post hoc Tukey y Fisher.

VII. RESULTADOS

Los resultados de este trabajo se dividen en cuatro secciones. La primera (7.1) se refiere al papel del BDNF, K25 y NMDA en la supervivencia de las NGC a los 3, 5 y 7DIV en presencia y ausencia de suero. Para ello, se obtuvieron los porcentajes de las células vivas y muertas por medio del ensayo de calceína y yoduro de propidio. La segunda parte (7.2) se enfoca a la medición del crecimiento neurítico de las NGC por medio del marcaje de la membrana celular con PKH26, en respuesta a las condiciones tróficas BDNF, K25 y NMDA en presencia y ausencia de suero a los 3 DIV. La tercera parte (7.3) estudia la producción de ERO de las NGC a través de ensayos fluorométricos que detectan la oxidación de dihidroetidina en presencia y ausencia de suero a los 3, 5 y 7DIV para conocer su papel. Finalmente, en la cuarta parte (7.4) se evalúa el efecto de antioxidantes para saber si las ERO están involucradas en la supervivencia de las NGC inducida por las condiciones tróficas mencionadas.

7.1 Efecto de K5, BDNF, K25 y NMDA en la supervivencia de las NGC

Como se ha mencionado, existen diversos estudios que muestran la participación del K25, BDNF y NMDA en la supervivencia de las NGC; sin embargo aún se desconoce el papel que juegan la ERO modulando la supervivencia durante los primeros días del desarrollo del cerebelo.

Como un primer paso se midió la viabilidad celular de cultivos primarios de NGC a los 3, 5 y 7DIV tratadas desde el primer día con K25, BDNF o NMDA y teniendo como control condiciones fisiológicas de potasio (K5). Al evaluar la supervivencia de las NGC se observó que aquellas cultivadas en SSM se protegen de la muerte celular por las condiciones tróficas K25, BDNF y NMDA a los 5 y 7DIV. Mientras que en las NGC cultivadas con CDM, sólo aquellas tratadas con BDNF se protegieron a los 5 y 7DIV. En el caso de las NGC tratadas con BDNF y mantenidas en cultivo por 5DIV, al comparar el porcentaje de células vivas con respecto al número total de células (número de células vivas sumadas al número de células muertas) no se observan cambios significativos; sin embargo al comparar el número de células vivas normalizado con respecto al control (K5) se

observan diferencias estadísticamente significativas; lo que nos sugiere que más que un aumento en la proporción de células vivas con respecto a las muertas hay un aumento en la densidad celular y en el número total de células en esta ventana específica del desarrollo que corresponde a los 5DIV. A los 3DIV, cuando las neuronas se encuentran en etapas tempranas del desarrollo, ninguno de los tratamientos aumentó la supervivencia celular en ausencia y presencia de suero y observándose aproximadamente el mismo número de células vivas teñidas con calceína. A partir de los 5DIV, se observa un mayor porcentaje de células vivas en un SSM, en ambos casos, respecto al número total de células, como normalizado respecto a K5. Sólo en el caso de las NGC cultivadas en BDNF se observa un aumento en la supervivencia a los 7DIV de las células cultivadas en CDM en comparación con SSM.

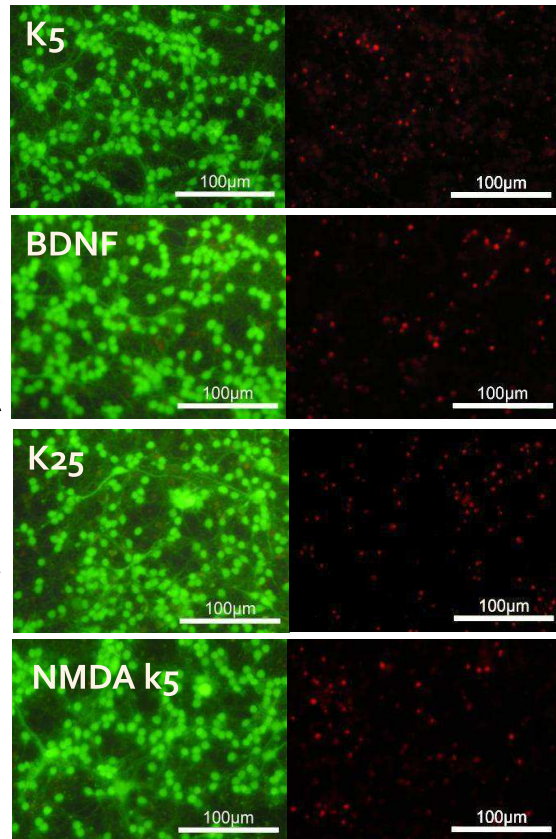
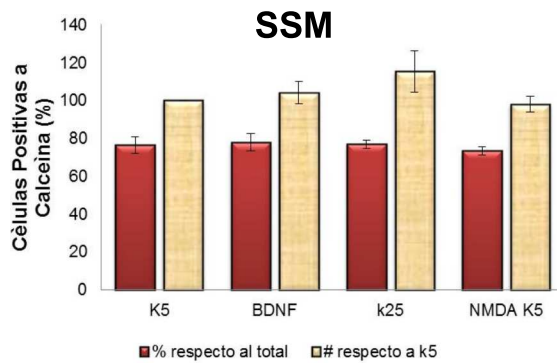


Figura 4. Efecto de K5, BDNF, K25 y NMDA en la supervivencia de NGC cultivadas en SSM a los 3DIV. NGC fueron obtenidas de ratas al P8 cultivadas en K5 en un medio suplementado con suero (SSM) y tratadas con BDNF, K25, o NMDA cuando fueron sembradas. La supervivencia celular fue estimada a los 3DIV como el porcentaje de células positivas a calceína respecto al número total y como el número de células positivas a calceína respecto a K5. Los resultados fueron expresados como el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes; no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los grupos, % del total, $p=0.361$ y # respecto a K5, $p=0.329$.

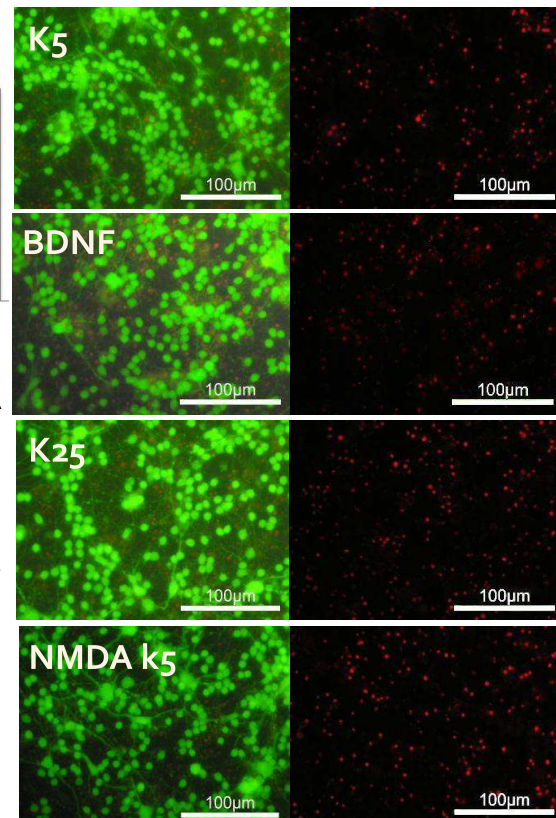
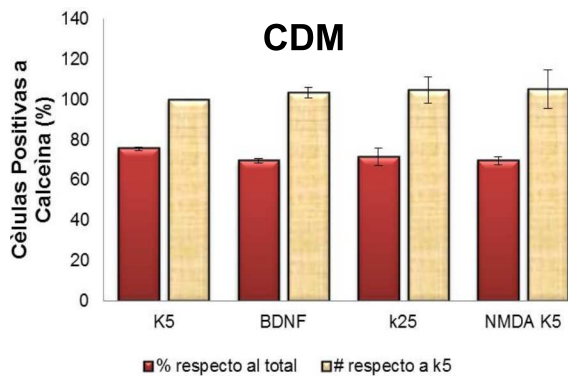


Figura 5. Efecto de K5, BDNF, K25 y NMDA en la supervivencia de NGC cultivadas en CDM a los 3DIV. NGC fueron obtenidas de ratas al P8 cultivadas en K5 en un medio químicamente definido (CDM) y tratadas con BDNF, K25, o NMDA cuando fueron sembradas. La supervivencia celular fue estimada a los 3DIV como el porcentaje de células positivas a calceína respecto al número total y como el número de células positivas a calceína respecto a K5. Los resultados fueron expresados como el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes; no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los grupos, % del total, $p=0.333$ y # respecto a K5, $p=0.929$.

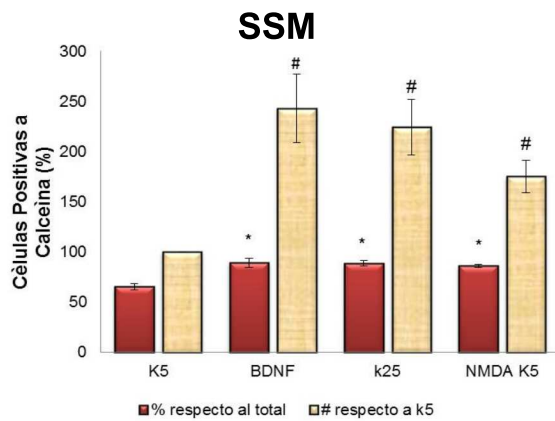


Figura 6. Efecto de K5, BDNF, K25 y NMDA en la supervivencia de NGC cultivadas en SSM a los 5DIV. Las NGC fueron obtenidas de ratas al P8 cultivadas en K5 en un medio suplementado con suero (SSM) y tratadas con BDNF, K25, o NMDA cuando fueron sembradas. La supervivencia celular fue estimada a los 5DIV como el porcentaje de células positivas a calceína respecto al número total y como el número de células positivas a calceína respecto a K5. Los resultados fueron expresados como el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes; * $p=0.002$ y # $p=0.011$.

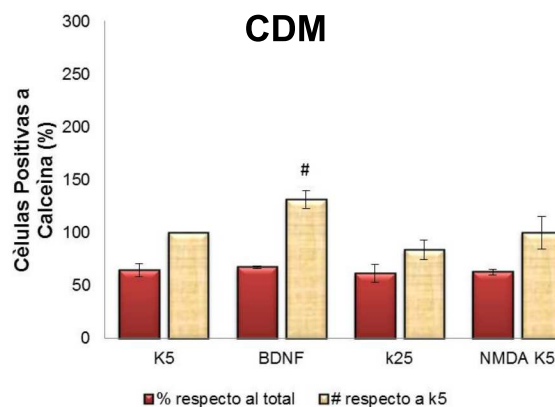
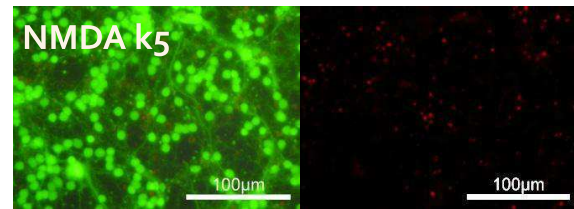
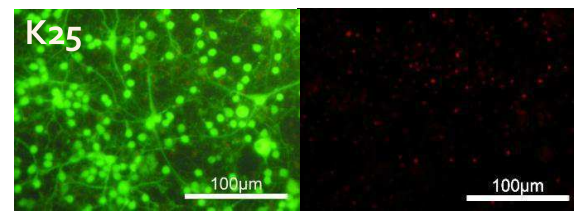
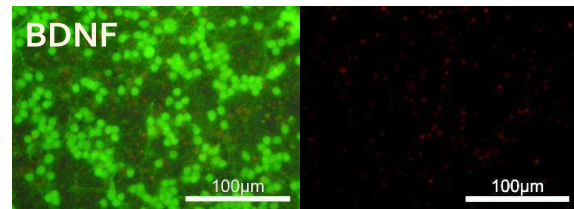
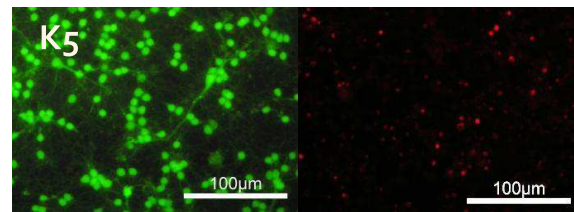
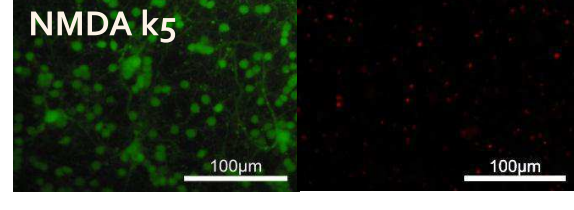
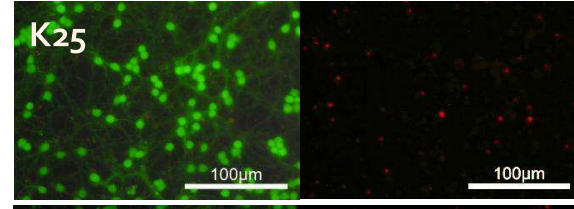
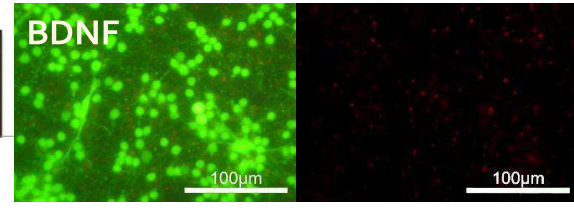
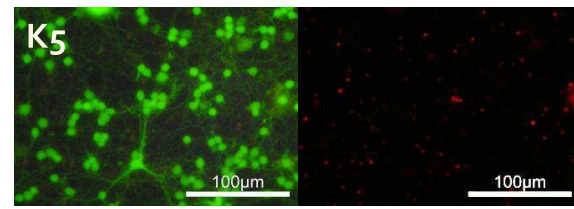


Figura 7. Efecto de K5, BDNF, K25 y NMDA en la supervivencia de NGC cultivadas en CDM a los 5DIV. Las NGC fueron obtenidas de ratas al P8 cultivadas en K5 en un medio químicamente definido (CDM) y tratadas con BDNF, K25, o NMDA cuando fueron sembradas. La supervivencia celular fue estimada a los 5DIV como el porcentaje de células positivas a calceína respecto al número total y como el número de células positivas a calceína respecto a K5. Los resultados fueron expresados como el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes; # $p=0.003$



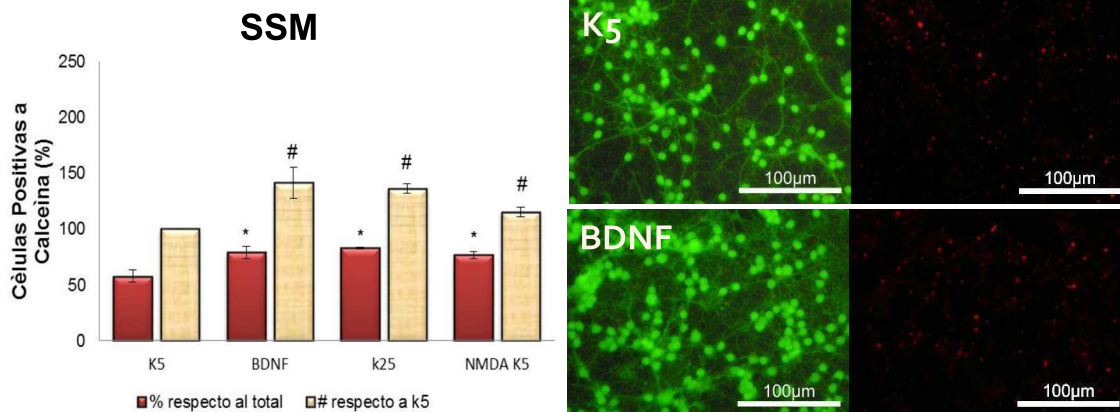


Figura 8. Efecto de K5, BDNF, K25 y NMDA en la supervivencia de NGC cultivadas en SSM a los 7DIV. Las NGC fueron obtenidas de ratas al P8 cultivadas en K5 en un medio suplementado con suero (SSM) y tratadas con BDNF, K25, o NMDA cuando fueron sembradas. La supervivencia celular fue estimada a los 7DIV como el porcentaje de células positivas a calceína respecto al número total y como el número de células positivas a calceína respecto a k5. Los resultados fueron expresados como el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes; * $p=0.018$ y # $p=0.011$

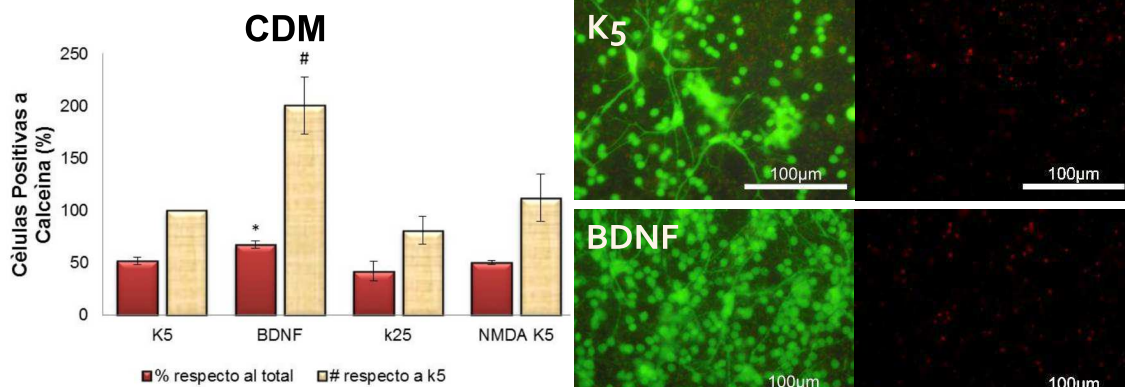


Figura 9. Efecto de K5, BDNF, K25 y NMDA en la supervivencia de NGC cultivadas en CDM a los 7DIV. Las NGC fueron obtenidas de ratas al P8 cultivadas en K5 en un medio químicamente definido (CDM) y tratadas con BDNF, K25, o NMDA cuando fueron sembradas. La supervivencia celular fue estimada a los 7DIV como el porcentaje de células positivas a calceína respecto al número total y como el número de células positivas a calceína respecto a k5. Los resultados fueron expresados como el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes; * $p=0.009$ y # $p=0.023$

7.2 Efecto de K5, BDNF, K25 y NMDA en el crecimiento neurítico de las NGC

El BDNF, K25 y NMDA aumentan el crecimiento neurítico en NGC cultivadas en SSM respecto al control con K5; mientras el BDNF es el único tratamiento que promueve un aumento en el crecimiento neurítico de las células cultivadas en CDM. Las células cultivadas en SSM responden al NMDA y condiciones despolarizantes de potasio (K25) que mimetizan el estímulo de excitación que reciben las NGC durante su desarrollo. Además, es posible generar una condición trófica por activación de los receptores tipo NMDA, que también influyen en la síntesis y liberación del BDNF. En contraste, las NGC tratadas en un CDM, donde los NMDAR no se expresan correctamente y no se requieren condiciones despolarizantes para su desarrollo, no se observa un efecto por parte de los tratamientos NMDA y K25.

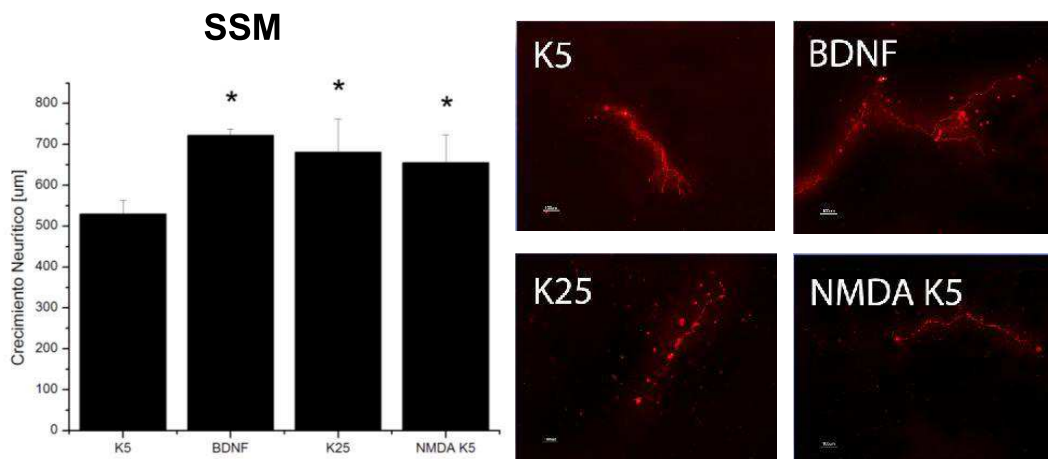


Figura 10. Efecto de K5, BDNF, K25 y NMDA en el crecimiento neurítico de NGC cultivadas en SSM a los 3DIV. NGC fueron obtenidas de ratas al P8, una fracción de células fueron incubadas con el compuesto fluorescente PKH26 y después cocultivadas con células sin teñir en K5 en un medio suplementado con suero (SSM) y tratadas con BDNF, K25, o NMDA cuando fueron sembradas. El crecimiento neurítico fue estimado a los 3DIV. Los resultados fueron expresados como el promedio SEM de 3 experimentos independientes; * $p=0.039$.

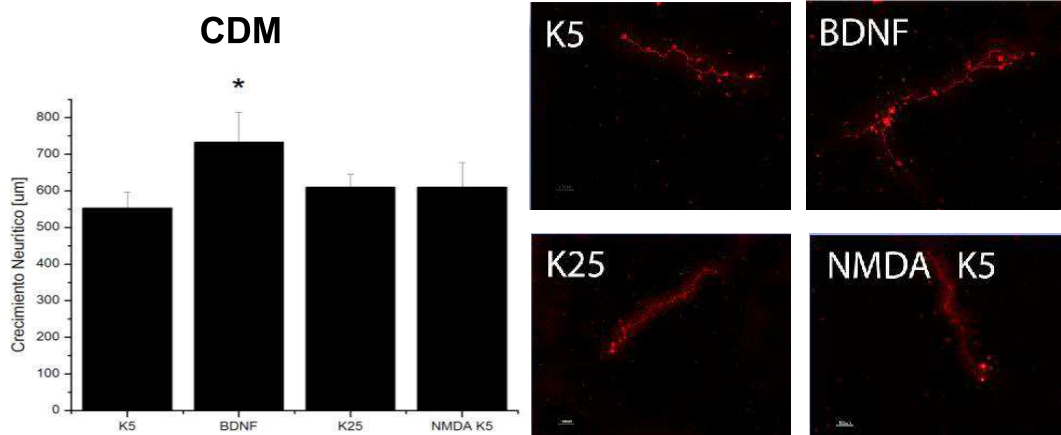


Figura 11. Efecto de K5, BDNF, K25 y NMDA en el crecimiento neurítico de NGC cultivadas en CDM a los 3DIV. NGC fueron obtenidas de ratas al P8, una fracción de células fueron incubadas con el compuesto fluorescente PKH26 y después cocultivadas con células sin teñir en K5 en un medio químicamente definido (CDM) y tratadas con BDNF, K25, o NMDA cuando fueron sembradas. El crecimiento neurítico fue estimado a los 3DIV. Los resultados fueron expresados como el promedio SEM de 3 experimentos independientes; *p=0.004

7.3 Efecto de K5, BDNF, K25 y NMDA en la producción de ERO de las NGC

Al evaluarse la producción de ERO en respuesta a las condiciones tróficas K25, BDNF y NMDA, se observó que las NGC tratadas con BDNF y K25 cultivadas en presencia de suero, mostraron un aumento en las concentraciones de ERO a los 3DIV. En el caso de las NGC cultivadas en CDM, sólo las células tratadas con BDNF mostraron un aumento en la producción de ERO a los 3DIV. A los 5DIV únicamente aquellas células tratadas con BDNF y cultivadas en SSM mostraron un incremento significativo en la producción de ERO.

Como se observaba en los experimentos de viabilidad celular, a los 7DIV las NGC cultivadas en presencia de suero eran rescatadas de la muerte al ser tratadas con K25, BDNF y NMDA, lo cual coincide con una caída significativa en la producción de ERO en respuesta a los diferentes tratamientos, mientras que K5 mantiene una mayor producción de ERO. Esto se debe a que las ERO juegan un papel crucial en otro proceso fisiológico que corresponde a un tipo de muerte celular programada inducida por condiciones fisiológicas de potasio (K5) en las NGC a los 6-7DIV (Blancas, S. y Morán, J., 2011).

Los cambios en la producción de ERO no correlacionan con cambios en la viabilidad celular a los 3DIV, a diferencia del crecimiento neurítico inducido por BDNF en presencia y ausencia de suero y por K25 en presencia de suero, lo que

sugiere que éstos últimos podrían estar modulando la señalización que interviene en el crecimiento neurítico.

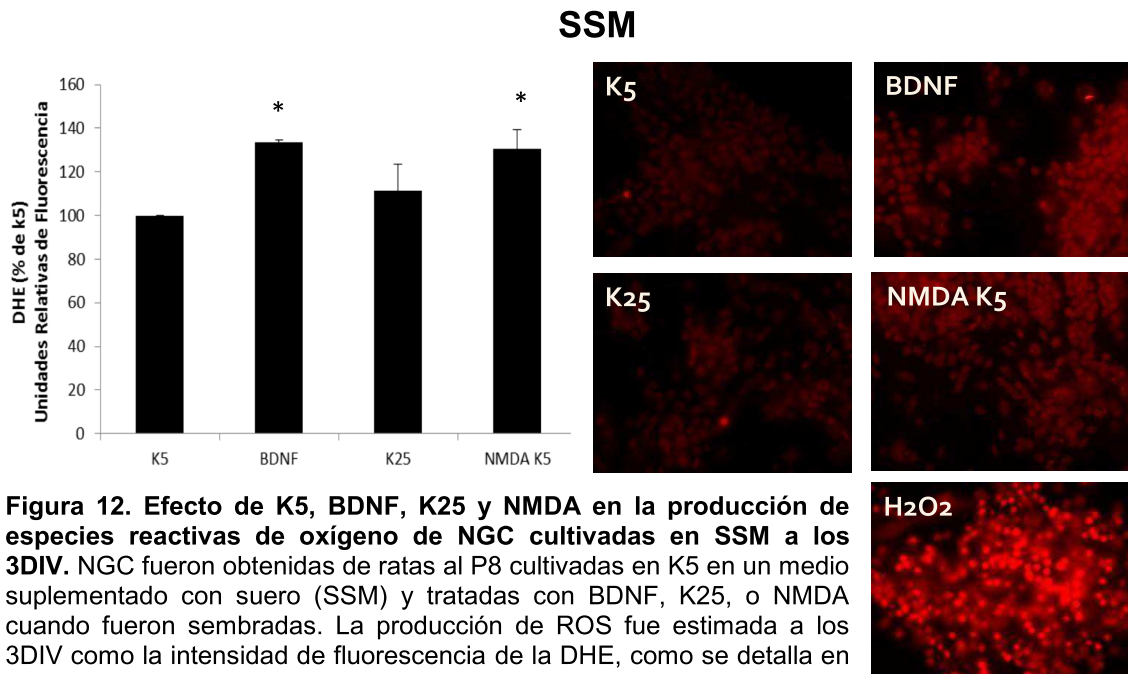


Figura 12. Efecto de K5, BDNF, K25 y NMDA en la producción de especies reactivas de oxígeno de NGC cultivadas en SSM a los 3DIV. NGC fueron obtenidas de ratas al P8 cultivadas en K5 en un medio suplementado con suero (SSM) y tratadas con BDNF, K25, o NMDA cuando fueron sembradas. La producción de ROS fue estimada a los 3DIV como la intensidad de fluorescencia de la DHE, como se detalla en los métodos. Cada condición fue normalizada con respecto al control (K5) Los resultados fueron expresados como el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes; * $p=0.036$.

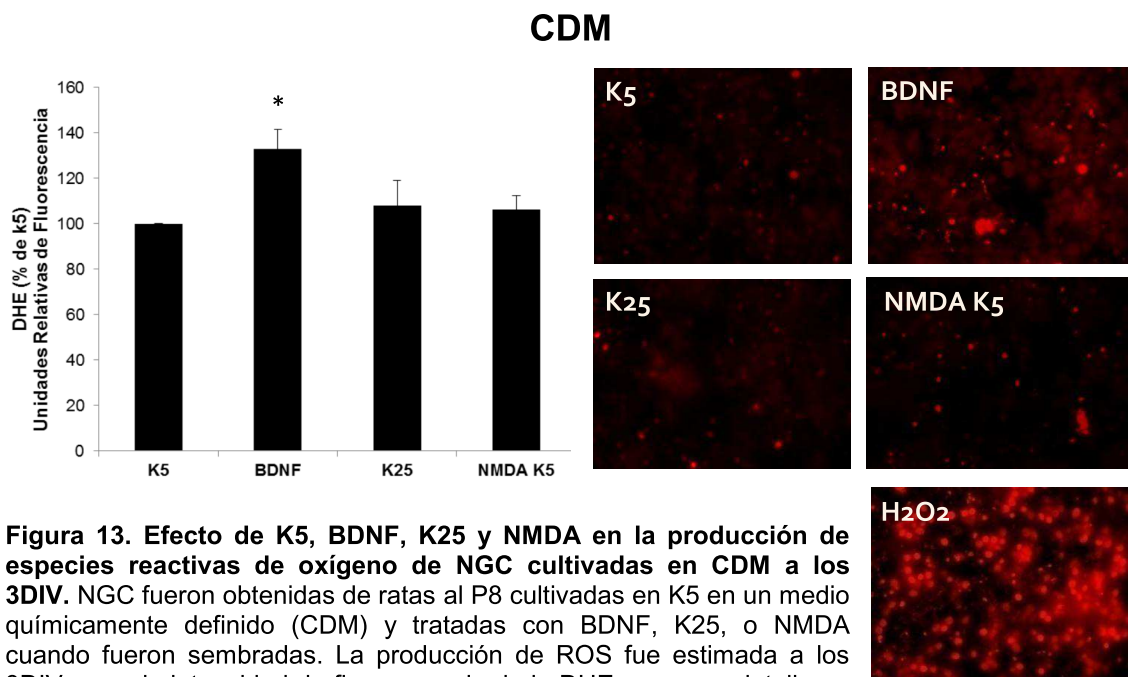


Figura 13. Efecto de K5, BDNF, K25 y NMDA en la producción de especies reactivas de oxígeno de NGC cultivadas en CDM a los 3DIV. NGC fueron obtenidas de ratas al P8 cultivadas en K5 en un medio químicamente definido (CDM) y tratadas con BDNF, K25, o NMDA cuando fueron sembradas. La producción de ROS fue estimada a los 3DIV como la intensidad de fluorescencia de la DHE, como se detalla en los métodos. Cada condición fue normalizada con respecto al control (K5) Los resultados fueron expresados como el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes; * $p=0.004$.

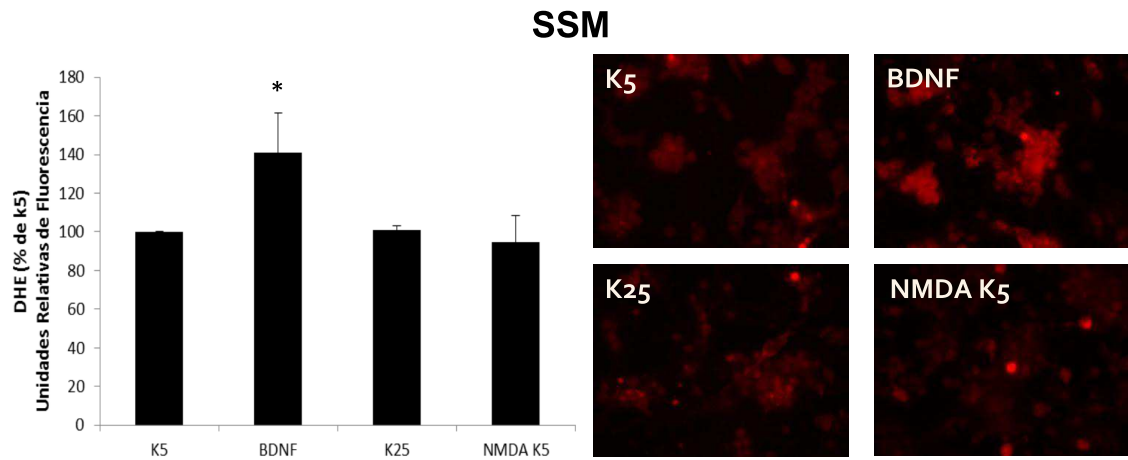


Figura 14. Efecto de K5, BDNF, K25 y NMDA en la producción de especies reactivas de oxígeno de NGC cultivadas en SSM a los 5DIV. NGC fueron obtenidas de ratas al P8 cultivadas en K5 en un medio suplementado con suero (SSM) y tratadas con BDNF, K25, o NMDA cuando fueron sembradas. La producción de ROS fue estimada a los 5DIV como la intensidad de fluorescencia de la DHE, como se detalla en los métodos. Cada condición fue normalizada con respecto al control (K5) Los resultados fueron expresados como el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes; * $p=0.079$.

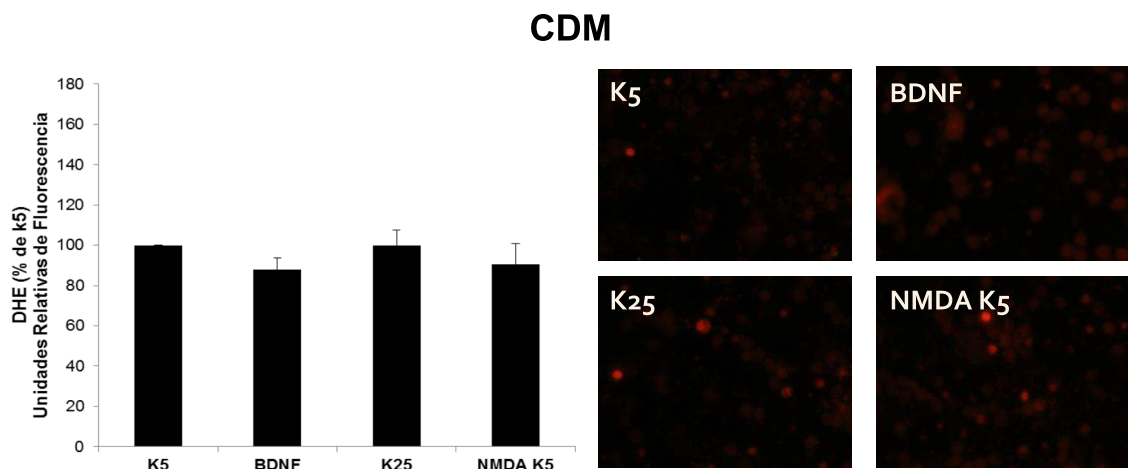


Figura 15. Efecto de K5, BDNF, K25 y NMDA en la producción de especies reactivas de oxígeno de NGC cultivadas en CDM a los 5DIV. NGC fueron obtenidas de ratas al P8 cultivadas en K5 en un medio químicamente definido (CDM) y tratadas con BDNF, K25, o NMDA cuando fueron sembradas. La producción de ROS fue estimada a los 5DIV como la intensidad de fluorescencia de la DHE, como se detalla en los métodos. Cada condición fue normalizada con respecto al control (K5) Los resultados fueron expresados como el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes; no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los grupos $p=0.524$.

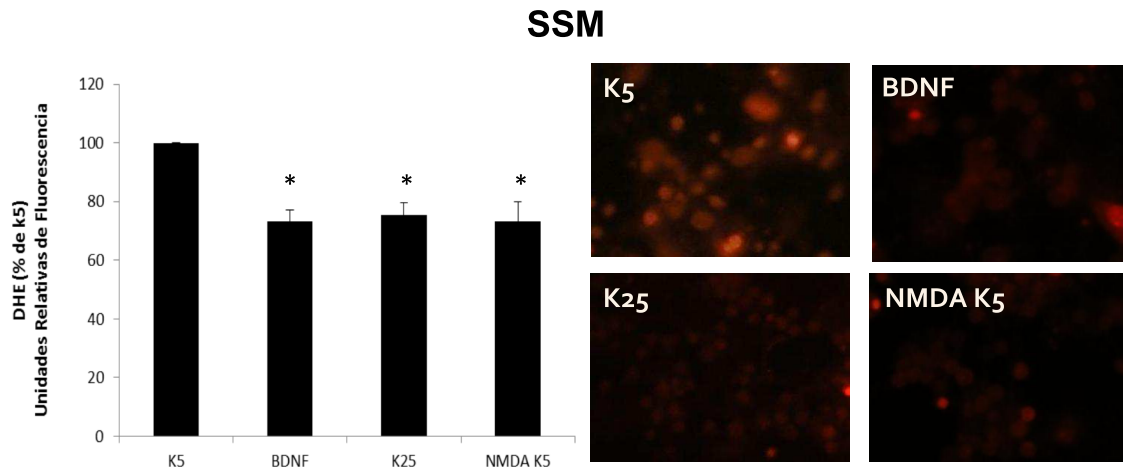


Figura 16. Efecto de K5, BDNF, K25 y NMDA en la producción de especies reactivas de oxígeno de neuronas granulares de cerebelo cultivadas en SSM a los 7DIV. NGC fueron obtenidas de ratas al P8 cultivadas en K5 en un medio suplementado con suero (SSM) y tratadas con BDNF, K25, o NMDA cuando fueron sembradas. La producción de ROS fue estimada a los 7DIV como la intensidad de fluorescencia de la DHE, como se detalla en los métodos. Cada condición fue normalizada con respecto al control (K5) Los resultados fueron expresados como el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes; * $p=0.007$.

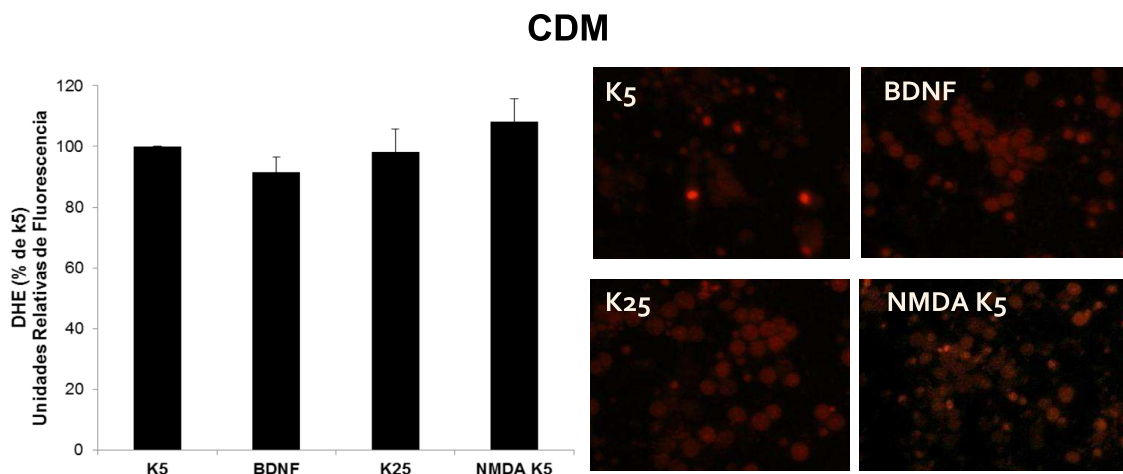


Figura 17. Efecto de K5, BDNF, K25 y NMDA en la producción de especies reactivas de oxígeno de neuronas granulares de cerebelo cultivadas en CDM a los 7DIV. NGC fueron obtenidas de ratas al P8 cultivadas en K5 en un medio químicamente definido (CDM) y tratadas con BDNF, K25, o NMDA cuando fueron sembradas. La producción de ROS fue estimada a los 7DIV como la intensidad de fluorescencia de la DHE, como se detalla en los métodos. Cada condición fue normalizada con respecto al control (K5) Los resultados fueron expresados como el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes; no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los grupos $p=0.323$.

7.4 Efecto de K5, BDNF, K25 y NMDA en la supervivencia de las NGC en ausencia y presencia de antioxidantes

Para estudiar el efecto de las ERO en la supervivencia inducida por K25, BDNF y NMDA, se realizaron ensayos en ausencia y presencia del antioxidante EUK-134, a 3, 5 y 7DIV. La supervivencia de las NGC no cambio significativamente al ser tratadas únicamente con K25, BDNF o NMDA en comparación con sus homólogos con el respectivo tratamiento más antioxidante, en ninguno de los tiempos. Sin embargo, las condiciones control sí mostraron cambios a los 7DIV al aplicar EUK-134. Las NGC cultivadas en K5 están destinadas a morir por apoptosis; sin embargo al aplicar antioxidantes las células mueren 20% más; probablemente debido a que son necesarias ciertas concentraciones fisiológicas de ERO que le permiten a la célula mantener el equilibrio redox, entre otras funciones, y al ser inhibidas llevan a la muerte. Estos experimentos corroboran los primeros ensayos de calceína, donde las NGC mueren a los 5 y 7DIV al ser tratadas crónicamente con K5 y condiciones despolarizantes de potasio, BDNF y NMDA rescatan a las células de la muerte. Debido a que las NGC no se desarrollan de forma óptima en un medio con CDM y no me permite ver el efecto de dos de mis tratamientos (K25 y NMDA), sólo se efectuaron los experimentos en un SSM.

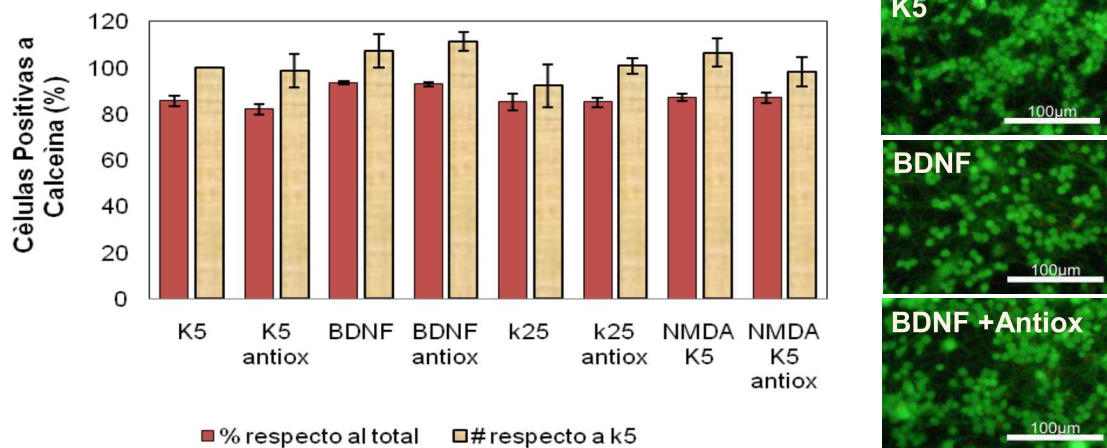


Figura 18. Efecto de K5, BDNF, K25 y NMDA en la supervivencia de NGC cultivadas en SSM a los 3DIV en ausencia y presencia de antioxidantes. Las NGC fueron obtenidas de ratas al P8 cultivadas en K5 en un SSM y tratadas con BDNF, K25, o NMDA cuando fueron sembradas. Se aplicó EUK-134 24hrs antes del ensayo. La supervivencia celular fue estimada a los 3DIV como el porcentaje de células positivas a calceína respecto al número total y como el número de células positivas a calceína respecto a k5. Los resultados fueron expresados como el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes; no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los grupos $p=0.458$.

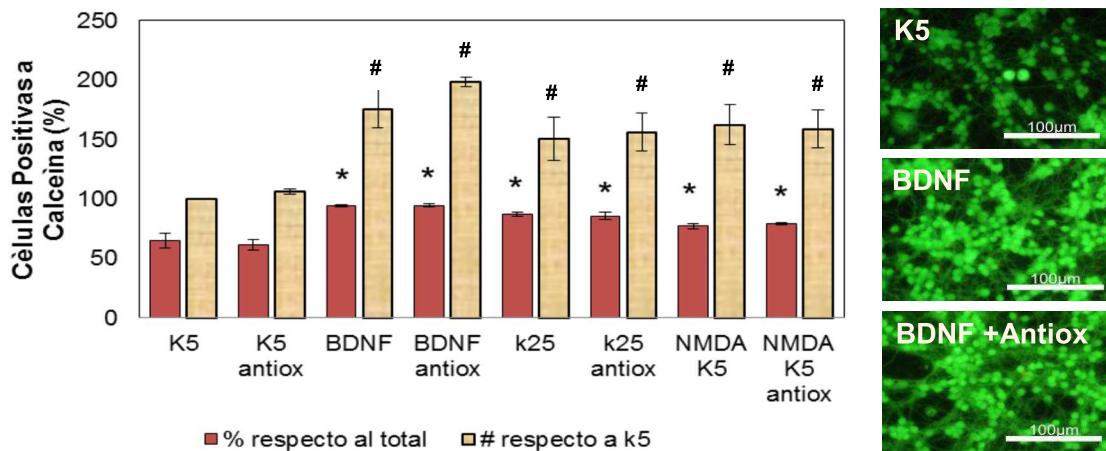


Figura 19. Efecto de K5, BDNF, K25 y NMDA en la supervivencia de NGC cultivadas en SSM a los 5DIV en ausencia y presencia de antioxidantes. Las NGC fueron obtenidas de ratas al P8 cultivadas en K5 en un SSM y tratadas con BDNF, K25, o NMDA cuando fueron sembradas. Se aplicó EUK-134 24hrs antes del ensayo. La supervivencia celular fue estimada a los 5DIV como el porcentaje de células positivas a calceína respecto al número total y como el número de células positivas a calceína respecto a k5. Los resultados fueron expresados como el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes; % del total, $p < 0.001$ y # respecto a k5, $p = 0.794$.

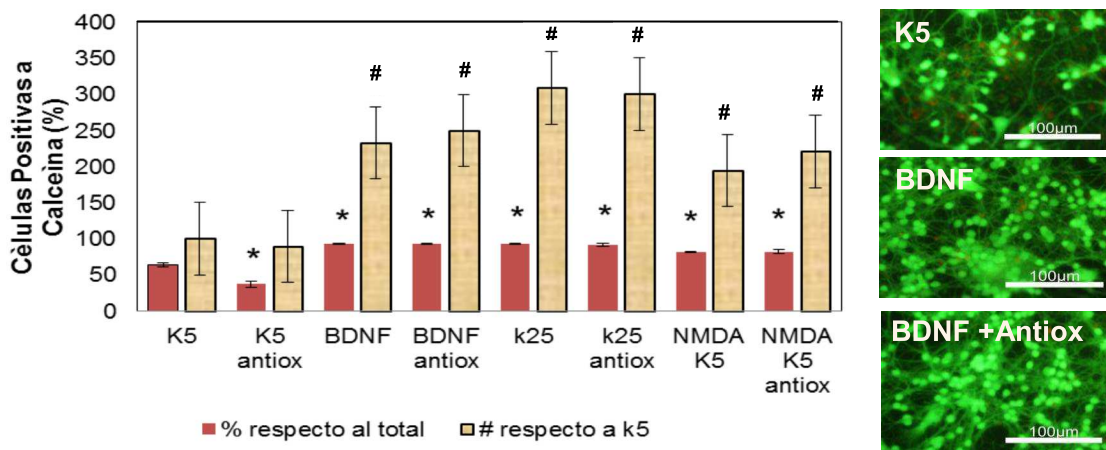


Figura 20. Efecto de K5, BDNF, K25 y NMDA en la supervivencia de NGC cultivadas en SSM a los 7DIV en ausencia y presencia de antioxidantes. Las NGC fueron obtenidas de ratas al P8 cultivadas en K5 en un SSM y tratadas con BDNF, K25, o NMDA cuando fueron sembradas. Se aplicó EUK-134 24hrs antes del ensayo. La supervivencia celular fue estimada a los 7DIV como el porcentaje de células positivas a calceína respecto al número total y como el número de células positivas a calceína respecto a k5. Los resultados fueron expresados como el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes; % del total, $p < 0.001$ y # respecto a k5, $p < 0.001$.

VIII. DISCUSIÓN

Para estudiar las acciones tróficas del BDNF y el NMDA sobre la supervivencia y crecimiento neurítico se realizaron ensayos de calceína/ yoduro de propidio y marcaje de la membrana celular con PKH26, respectivamente; para estudiar el papel de las ERO como moduladores intracelulares de estos procesos fisiológicos se realizaron ensayos fluorométricos de la oxidación de dihidroetidina y ensayos de viabilidad en presencia y ausencia de antioxidantes.

Debido a que el suero contiene compuestos con posible acción trófica y para asegurarnos que su efecto no interfiriera con las acciones del BDNF y el NMDA, se probaron paralelamente medios sin suero. Entre ellos, se probó el medio Dulbecco Modificado Eagle con Ham F12 (DMEM-F12) 3:1 N2 suplementado, DMEM-F12 1:1 N2 suplementado, medio neurobasal y MBE N2 suplementado, de los cuales sólo el último fue propicio para que las NGC vivieran hasta dos semanas in vitro.

Los ensayos de viabilidad indican que las tres condiciones tróficas: BDNF, K25 y NMDA proveen neuroprotección a las NGC a los 5 y 7 DIV en un SSM; en contraste, las células cultivadas en CDM no son protegidas a ninguna edad por NMDA y K25, excepto en el caso de BDNF que promueve una mayor supervivencia a los 7 DIV. Morán y col. (1989) reportaron que las NGC cultivadas en CDM no requieren condiciones despolarizantes para su supervivencia como aquellas cultivadas en SSM y que estas células no maduran adecuadamente. Esto podría tener ciertas consecuencias que incluiría una expresión deficiente de algunos elementos asociados a la neurotransmisión como el receptor de glutamato tipo NMDA. Otra posibilidad sería que no se expresaran adecuadamente los

canales de calcio sensibles a voltaje alterándose las concentraciones intracelulares de calcio necesarias para mantener las condiciones de supervivencia neuronal reportadas para ésta y otras preparaciones del sistema nervioso (Morán et al., 1999; Johnson, et al., 1992). Se sabe que la activación de dichos canales de calcio es esencial para que la despolarización inducida por K^+ promueva la supervivencia, ya que al inhibirse el flujo intracelular de calcio, se alcanzan niveles que llevan a la activación de la caspasa 3 y con ello a una muerte celular apoptótica (Moran et al., 1999).

Por otro lado, observamos que el BDNF es la única condición que induce una mayor supervivencia en las NGC cultivadas tanto en SSM como en CDM. El efecto del BDNF sobre la viabilidad de las NGC se observa de forma más tardía en CDM (hasta los 7DIV) que en SSM (desde los 5DIV), lo cual puede deberse a que los niveles de BDNF están íntimamente ligados a la disponibilidad de receptores tipo NMDA en la superficie celular (Caldeira et al., 2007) ya que, como se ha mencionado, estos receptores no se expresan de forma óptima en ausencia de suero. Se ha reportado que el NMDA puede ejercer actividad neurotrófica de manera indirecta. Por ejemplo, los mecanismos de neuroprotección a través del NMDA involucran a la activación de los NMDAR como señal para una rápida liberación del BDNF (Jiang, 2003, Zhu et al., 2002). De hecho, se ha sugerido que el NMDA tiene un efecto temprano y uno tardío sobre el BDNF. Desde los dos minutos el NMDA favorece la liberación de BDNF produciendo un aumento en su concentración en el medio de cultivo, dicho aumento continúa promoviendo una mayor fosforilación de los TrkB de manera autócrina. De forma más tardía, esta

liberación de BDNF se acompaña de una síntesis de mRNA de BDNF. (Jiang et al., 2003).

El efecto del BDNF a los 5DIV en CDM sólo es significativo al comparar el número de células vivas normalizado con respecto a K5 (100%), pero no al comparar el porcentaje de células vivas con respecto al número total de células. Esto se debe a que hay un aumento en el número total de NGC tras ser expuestas a BDNF, pero las proporciones de células vivas con respecto a las muertas no cambian. De tal manera que se cuentan un mayor número de células vivas y metabólicamente activas con respecto al control, pero también existe un mayor número de células muertas. Esto implicaría un papel trófico del BDNF en la proliferación in vitro de las NGC a los 5DIV que no se había reportado previamente.

Un resultado interesante es que parece no existir una correlación entre de la protección provista por NMDA y K25 a los 5-7DIV en SSM y la producción de ROS. Esto sugiere que dichos procesos de supervivencia no están mediados por cambios en la concentración de las ERO fisiológicas. Como se mencionó, de todos los tratamientos, el BDNF fue el único que protegió a las NGC cultivadas en CDM de una muerte celular y su efecto sobre la supervivencia celular sólo se observó a los 7DIV; sin embargo este efecto tampoco correlaciona con cambios en la concentración de ERO. Además al aplicar antioxidantes no se disminuyó la viabilidad celular, indicando que al menos las ERO no se encuentran mediando la supervivencia en la ventana de tiempo en que se probaron, que corresponde a las 24 hs antes del ensayo (a los 2, 4 y 6DIV). Por consiguiente, todo parece indicar que el efecto trófico de las condiciones probadas: BDNF, K25 y NMDA promueven

supervivencia por mecanismos independientes de las concentraciones de las ERO.

Por otro lado, la muerte inducida por K5 a los 7DIV coincide con concentraciones superiores de ERO registradas en el control con respecto a los tratamientos. Esta diferencia en las concentraciones de ERO no se debe del todo a un aumento de la producción de ERO en condiciones de K5; también es resultado de una disminución en las concentraciones de ERO de las NGC que fueron protegidas de la muerte tras ser expuestas a K25, BDNF y NMDA, lo que apoya la idea de que las células en desarrollo requieren mayores concentraciones fisiológica de ERO que la células maduras (Mackey, et al., 2008, Groeger, et al., 2009).

Las NGC tratadas por 7DIV con K5 exhiben mayores concentraciones de ERO, debido a que se encuentran mediando un tipo de muerte celular programada inducida al exponer crónicamente a las células a bajas concentraciones de potasio. Este tipo de muerte exhibe características apoptóticas como condensación nuclear, translocación de fosfatidilserina, liberación mitocondrial y translocación nuclear del factor inductor de apoptosis (AIF) y formación de cuerpos apoptóticos (Blancas, y Morán, 2011).

Al parecer las ERO funcionan de forma similar al calcio, ya que la célula requiere de ciertas concentraciones fisiológicas que participen en la señalización y transducción de señales que modulan procesos celulares como supervivencia, crecimiento neurítico, proliferación, muerte, entre otros. Si la célula alcanza cierto umbral de ERO, la célula percibe este evento como una señal de muerte con características apoptóticas y si llega a recibir una concentración mucho más

elevada del umbral, las ERO comienzan a destruir las macromoléculas que componen a la célula y ésta muere de una forma súbita y desorganizada con características necróticas. Asimismo, si reducimos significativamente las concentraciones fisiológicas de ERO con antioxidantes, la célula se queda sin los elementos necesarios para mantener la homeostasis celular y muere. En el caso particular de las NGC de 7DIV tratadas con K5 más antioxidantes, las células ya estaban destinadas a la muerte celular; sin embargo al disminuir las concentraciones de ERO, esta muerte se agudizó, observándose un mayor porcentaje de células marcadas con yoduro de propidio.

El grupo de Mackey y col. (2008), han demostrado en una línea celular de retina, que la inducir estrés en la célula esta aumenta sus niveles de ERO como un mecanismo de neuroprotección, oxidando a la fosfatasa PTEN y activando la vía de supervivencia PI3K/Akt. En el caso del modelo de estudio aquí presentado, las neuronas sufrieron un estímulo de estrés en condiciones de K5 y al bajarles las concentraciones de ERO murieron significativamente más.

Se ha reportado que las NGC cultivadas en K5 comienzan a morir desde los 5DIV en un SSM (Blancas, y Morán, 2011), lo cual fue corroborado por los experimentos de viabilidad con calceína; sin embargo, no se observa un aumento en la producción de ERO desde dicha edad, el incremento es visible hasta los 7DIV. Aunque existe la posibilidad de que la producción de ERO aumente a los 5DIV y esté siendo enmascarada por las ERO fisiológicas, sólo podría determinarse si las ERO están mediando o no el proceso de muerte realizando experimentos con antioxidantes por periodos más largos.

Con respecto al crecimiento neurítico, el BDNF, K25 y NMDA mostraron un efecto trófico en las NGC cultivadas en SSM respecto al control con K5; como en el caso de la supervivencia, el BDNF es el único tratamiento que promueve un aumento en el crecimiento neurítico de las células cultivadas en CDM. El efecto del BDNF en las NGC cultivadas en ambos medios concuerda con las evidencias bien documentadas sobre su papel en el crecimiento y ramificación de las terminales neuríticas, guía axonal y dinámica del cono de crecimiento, siendo fundamental en la modulación de dichos procesos que responden a sus gradientes de concentración ((Finsterwald et al., 2010; Gao et al., 1995b; Ji et al., 2010).

El crecimiento neurítico inducido por BDNF tanto en CDM como en SSM y por NMDA en SSM a los 3 DIV correlaciona con un aumento en la generación de ERO, por lo que éstos podrían estar jugando algún papel en la señalización que promueve la elongación de las neuritas de las NGC mediado por BDNF.

Las neuritas de las NGC tratadas con BDNF tuvieron aproximadamente la misma longitud en ausencia y presencia de suero, al igual que el control; por lo que no se observa un efecto trófico del suero en el crecimiento neurítico inducido por BDNF y bajo condiciones fisiológicas de potasio. En el caso del CDM persistió la desventaja de no poder observar el efecto trófico del NMDA y K25 debido a que las neuronas tardan más en desarrollarse y expresan tardíamente diversos receptores de membrana (Morán, et al., 1989).

El efecto trófico del K25 sobre el crecimiento neurítico debe estar regulado por mecanismos independientes de ERO, ya que no correlaciona con cambios en sus concentraciones. Existe evidencia de que al despolarizar crónicamente la membrana celular con altas concentraciones (K25) se produce un rápido

incremento en las concentraciones intracelulares de calcio que modula la transcripción de determinados mRNA (Benavides, et al., 2008). Una posible hipótesis es que el K25 tenga un rol importante en la extensión de procesos neuríticos por cascadas de señalización desencadenadas por medio de calcio. Tanto la entrada de calcio a través de sus canales en la membrana como su movilización de los reservorios intracelulares, son señales para el desarrollo del cono axónico, la dinámica del citoesqueleto y la señalización necesaria para el crecimiento neurítico (Brailoiu, et al., 2005, Munnamalai, y Suter, 2009)

Como se ha descrito, las ERO participan activamente en la señalización que interviene en el crecimiento neurítico de células neuronales y no neuronales y se han reportado numerosas evidencias de que el BDNF es una señal extracelular que promueve la morfogénesis neurítica a través de la activación de diferentes cascadas como la vía de la proteína cinasa dependiente de calcio-calmodulina (CaMK), ERK o PI3K. Sin embargo, hasta ahora no se había encontrado relación de la producción de ERO con el crecimiento neurítico de las NGC inducido por BDNF.

IX. CONCLUSIONES

Las acciones tróficas del NMDA y K25 en la viabilidad celular son independientes de las concentraciones fisiológicas de las ERO.

El suero juega un papel importante en el efecto del NMDA y K25 sobre la viabilidad y crecimiento neurítico de las NGC, ya que al cultivarlas en un CDM las neuronas no responden a dichas condiciones tróficas.

El efecto trófico del BDNF sobre el crecimiento neurítico de las NGC puede estar mediado por las concentraciones de ERO a los 3DIV y es independiente del suero.

Los niveles intracelulares de ERO se incrementan con la edad en cultivo, entre 3 y 7 DIV.

Las ERO no se encuentran mediando la muerte apoptótica inducida por un estímulo con K5 a los 5DIV en una ventana de 24hrs antes.

Bajo condiciones de estrés inducidas por bajas concentraciones de potasio, las NGC podrían estar produciendo ERO como señal de supervivencia.

Los datos sugieren que las ERO modulan de manera diferencial las acciones tróficas del BDNF, NMDA y K25 dependiendo del parámetro de desarrollo medido.

X. REFERENCIAS

1. Aguirre, J., M. Rios-Momberg, D. Hewitt, W. and Hansberg. 2005. Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends Microbiol.* 13:111-118.
2. Alavez, S., S. Blancas, and J. Moran. 2006a. Effect of N-methyl-D-aspartate receptor blockade on caspase activation and neuronal death in the developing rat cerebellum. *Neurosci. Lett.* 404:176-181.
3. Alavez, S., S. Blancas, and J. Moran. 2006b. Effect of NMDA antagonists on the death of cerebellar granule neurons at different ages. *Neurosci. Lett.* 398:241-245.
4. Alavez, S., D. Pedroza, and J. Moran. 2003. Mechanisms of cell death by deprivation of depolarizing conditions during cerebellar granule neurons maturation. *Neurochem. Int.* 43:581-590.
5. Altar, C. A., C. B. Boylan, M. Fritsche, B. E. Jones, C. Jackson, S. J. Wiegand, R. M. Lindsay, and C. Hyman. 1994. Efficacy of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 on neurochemical and behavioral deficits associated with partial nigrostriatal dopamine lesions. *J. Neurochem.* 63:1021-1032.
6. Balázs R., Jorgensen O. S., and Hack N. 1988. N-Methyl-D-aspartate promotes the survival of cerebellar granule cells in culture. *Neuroscience* 27:437-451.
7. Bazan-Peregrino, M., L. Gutierrez-Kobeh, and J. Moran. 2007a. Role of brain-derived neurotrophic factor in the protective action of N-methyl-D-aspartate in the apoptotic death of cerebellar granule neurons induced by low potassium. *J. Neurosci. Res.* 85:332-341.
8. Benavides A, D. Pastor, N. Fradejas, D. Tornero, S. Calvo. 2007. Differential regulation of calcium channel coding genes by prolonged depolarization. *Neurochem Int.* 50(2):395-403.
9. Brailoiu E, Hoard J. L., C. M. Filipeanu, G. C. Brailoiu, S. L. Dun, S. Patel, N. J. Dun 2005. Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate potentiates neurite outgrowth. *J Biol Chem.* 280(7):5646-50.
10. Caballero-Benítez A, Morán J. 2003. Caspase activation pathways induced by staurosporine and low potassium: role of caspase-2. *J Neurosci Res.* 71:383-96.

11. Caldeira, M. V., C. V. Melo, D. B. Pereira, R. F. Carvalho, A. L. Carvalho, and C. B. Duarte. 2007. BDNF regulates the expression and traffic of NMDA receptors in cultured hippocampal neurons. *Mol. Cell Neurosci.* 35:208-219.
12. Chao, M. V. 2003. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat. Rev. Neurosci.* 4:299-309.
13. Chao, M. V., R. Rajagopal, and F. S. Lee. 2006. Neurotrophin signalling in health and disease. *Clin. Sci. (Lond)* 110:167-173.
14. Cohen-Cory, S., A. H. Kidane, N. J. Shirkey, and S. Marshak. 2010. Brain-derived neurotrophic factor and the development of structural neuronal connectivity. *Dev. Neurobiol.* 70:271-288.
15. Covarrubias, L., D. Hernandez-Garcia, D. Schnabel, E. Salas-Vidal, and S. Castro-Obregon. 2008a. Function of reactive oxygen species during animal development: passive or active? *Dev. Biol.* 320:1-11.
16. Cull-Candy, S., S. Brickley, and M. Farrant. 2001. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11:327-335.
17. Diogenes, M. J., A. R. Costenla, L. V. Lopes, A. Jeronimo-Santos, V. C. Sousa, B. M. Fontinha, J. A. Ribeiro, and A. M. Sebastiao. 2011. Enhancement of LTP in aged rats is dependent on endogenous BDNF. *Neuropsychopharmacology* 36:1823-1836.
18. Finsterwald, C., H. Fiumelli, J. R. Cardinaux, and J. L. Martin. 2010. Regulation of dendritic development by BDNF requires activation of CRTCL1 by glutamate. *J. Biol. Chem.* 285:28587-28595.
19. Gao, W. Q., J. L. Zheng, and M. Karihaloo. 1995a. Neurotrophin-4/5 (NT-4/5) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) act at later stages of cerebellar granule cell differentiation. *J. Neurosci.* 15:2656-2667.
20. George J, Dravid S. M., Prakash A., Xie J., Peterson J., Jabba S. V., Baden D. G., Murray T. F. 2009. Sodium channel activation augments NMDA receptor function and promotes neurite outgrowth in immature cerebrocortical neurons. *J Neurosci.* 29(10):3288-301.
21. Georgiev D, Taniura H, Kambe Y, Takarada T, Yoneda Y. 2008. A critical importance of polyamine site in NMDA receptors for neurite outgrowth and fasciculation at early stages of P19 neuronal differentiation. *Exp Cell Res.* 314(14):2603-17.
22. Groeger G., Mackey A. M., Pettigrew C. A., Bhatt L., Cotter T. G. 2009. Stress-induced activation of Nox contributes to cell survival signalling via production of hydrogen peroxide. *J Neurochem.* 109(5):1544-54.

23. Guerrini, L., A. Molteni, T. Wirth, B. Kistler, and F. Blasi. 1997. Glutamate-dependent activation of NF-kappaB during mouse cerebellum development. *J. Neurosci.* 17:6057-6063.
24. Haines, C., and G. J. Goodhill. 2010. Analyzing neurite outgrowth from explants by fitting ellipses. *J. Neurosci. Methods* 187:52-58.
25. Hernandez-Garcia, D., C. D. Wood, S. Castro-Obregon, and L. Covarrubias. 2010. Reactive oxygen species: A radical role in development? *Free Radic. Biol. Med.* 49:130-143.
26. Hibi, M., and T. Shimizu. 2011. Development of the cerebellum and cerebellar neural circuits. *Dev. Neurobiol.*
27. Hwang, J. J., S. Y. Choi, and J. Y. Koh. 2002. The role of NADPH oxidase, neuronal nitric oxide synthase and poly(ADP ribose) polymerase in oxidative neuronal death induced in cortical cultures by brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-4/5. *J. Neurochem.* 82:894-902.
28. Ikonomidou, C., and A. M. Kaindl. 2011. Neuronal death and oxidative stress in the developing brain. *Antioxid. Redox. Signal.* 14:1535-1550.
29. Ikonomidou, C., V. Stefovská, and L. Turski. 2000. Neuronal death enhanced by N-methyl-D-aspartate antagonists. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97:12885-12890.
30. Jantas, D., and W. Lason. 2009. Different mechanisms of NMDA-mediated protection against neuronal apoptosis: a stimuli-dependent effect. *Neurochem. Res.* 34:2040-2054.
31. Ji, Y., Y. Lu, F. Yang, W. Shen, T. T. Tang, L. Feng, S. Duan, and B. Lu. 2010. Acute and gradual increases in BDNF concentration elicit distinct signaling and functions in neurons. *Nat. Neurosci.* 13:302-309.
32. Jiang, X., D. Zhu, P. Okagaki, R. Lipsky, X. Wu, K. Banaudha, K. Mearow, K. I. Strauss, and A. M. Marini. 2003. N-methyl-D-aspartate and TrkB receptor activation in cerebellar granule cells: an in vitro model of preconditioning to stimulate intrinsic survival pathways in neurons. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 993:134-145.
33. Johnson E. M. Jr., Koike T., and Franklin J. 1992. A "calcium set-point hypothesis" of neuronal dependence on neurotrophic factor. *Exp. Neurol.* 115, 163-166
34. Kim, S. H., S. J. Won, S. Sohn, H. J. Kwon, J. Y. Lee, J. H. Park, and B. J. Gwag. 2002. Brain-derived neurotrophic factor can act as a pronecrotic factor through transcriptional and translational activation of NADPH oxidase. *J. Cell Biol.* 159:821-831.

35. Komuro, H., and P. Rakic. 1992. Selective role of N-type calcium channels in neuronal migration. *Science* 257:806-809.
36. Komuro, H., and P. Rakic. 1998. Distinct modes of neuronal migration in different domains of developing cerebellar cortex. *J. Neurosci.* 18:1478-1490.
37. Komuro, H., and P. Rakic. 1998. Orchestration of neuronal migration by activity of ion channels, neurotransmitter receptors, and intracellular Ca²⁺ fluctuations. *J. Neurobiol.* 37:110-130.
38. Komuro, H., and E. Yacubova. 2003. Recent advances in cerebellar granule cell migration. *Cell Mol. Life Sci.* 60:1084-1098.
39. Kruttgen, A., J. C. Moller, J. V. Heymach, Jr., and E. M. Shooter. 1998. Neurotrophins induce release of neurotrophins by the regulated secretory pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95:9614-9619.
40. Kuida K., Zheng T. S., Na S., Kuan C., Yang D., Karasuyama H., Rakic P, Flavell RA. 1996. Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature.* 1996 Nov 28;384(6607):368-72.
41. Le Belle J. E., Orozco N. M., Paucar A. A., Saxe J. P., Mottahedeh J., Pyle A. D., Wu H., Kornblum H. I. 2011. Proliferative neural stem cells have high endogenous ROS levels that regulate self-renewal and neurogenesis in a PI3K/Akt-dependant manner. *Cell Stem Cell.* 7;8(1):59-71.
42. Lee, B., R. Cao, Y. S. Choi, H. Y. Cho, A. D. Rhee, C. K. Hah, K. R. Hoyt, and K. Obrietan. 2009. The CREB/CRE transcriptional pathway: protection against oxidative stress-mediated neuronal cell death. *J. Neurochem.* 108:1251-1265.
43. Lessmann, V., S. Stroh-Kaffei, V. Steinbrecher, E. Edelmann, T. Brigadski, W. Kilb, and H. J. Luhmann. 2011. The expression mechanism of the residual LTP in the CA1 region of BDNF k.o. mice is insensitive to NO synthase inhibition. *Brain Res.* 1391:14-23.
44. Li, N., H. Yang, L. Lu, C. Duan, C. Zhao, and H. Zhao. 2007. Spontaneous expression of neural phenotype and NGF, TrkA, TrkB genes in marrow stromal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 356:561-568.
45. Lu, P., L. L. Jones, and M. H. Tuszynski. 2005. BDNF-expressing marrow stromal cells support extensive axonal growth at sites of spinal cord injury. *Exp. Neurol.* 191:344-360.
46. Matsumoto, K., C. Sato, Y. Naka, A. Kitazawa, R. L. Whitby, and N. Shimizu. 2007. Neurite outgrowths of neurons with neurotrophin-coated carbon nanotubes. *J. Biosci. Bioeng.* 103:216-220.

47. Mackey A. M., N. Sanvicens, G. Groeger, F. Doonan, D. Wallace, T. G. Cotter. 2008. Redox survival signalling in retina-derived 661W cells. *Cell Death Differ.* 15(8):1291-303.
48. Moldovan, L., K. Mythreye, P. J. Goldschmidt-Clermont, and L. L. Satterwhite. 2006. Reactive oxygen species in vascular endothelial cell motility. Roles of NAD(P)H oxidase and Rac1 *Cardiovasc. Res.* 71:236-246.
49. Moran, J., T. Itoh, U. R. Reddy, M. Chen, E. S. Alnemri, and D. Pleasure. 1999. Caspase-3 expression by cerebellar granule neurons is regulated by calcium and cyclic AMP. *J. Neurochem.* 73:568-577.
50. Moran, J., and A. J. Patel. 1989. Stimulation of the N-methyl-D-aspartate receptor promotes the biochemical differentiation of cerebellar granule neurons and not astrocytes. *Brain Res.* 486:15-25.
51. Moran, J., and A. J. Patel. 1989. Effect of potassium depolarization on phosphate-activated glutaminase activity in primary cultures of cerebellar granule neurons and astroglial cells during development. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 46:97-105
52. Mowla, S. J., S. Pareek, H. F. Farhadi, K. Petrecca, J. P. Fawcett, N. G. Seidah, S. J. Morris, W. S. Sossin, and R. A. Murphy. 1999. Differential sorting of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 19:2069-2080.
53. Munnamalai, V., and D. M. Suter. 2009a. Reactive oxygen species regulate F-actin dynamics in neuronal growth cones and neurite outgrowth. *J. Neurochem.* 108:644-661.
54. Nimnual, A. S., L. J. Taylor, and D. Bar-Sagi. 2003. Redox-dependent downregulation of Rho by Rac *Nat. Cell Biol.* 5:236-241.
55. Oppenheim, R. W. 1991. Cell death during development of the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 14:453-501.
56. Paoletti, P., and J. Neyton. 2007. NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr. Opin. Pharmacol.* 7:39-47.
57. Powell, S. K., R. J. Rivas, E. Rodriguez-Boulan, and M. E. Hatten. 1997a. Development of polarity in cerebellar granule neurons. *J. Neurobiol.* 32:223-236.
58. Ramiro-Cortés Y, Guemez-Gamboa A, Morán J. 2011. Reactive oxygen species participate in the p38-mediated apoptosis induced by potassium deprivation and staurosporine in cerebellar granule neurons. *Int J Biochem Cell Biol.* 43:1373-82.

59. Rios, M., G. Fan, C. Fekete, J. Kelly, B. Bates, R. Kuehn, R. M. Lechan, and R. Jaenisch. 2001. Conditional deletion of brain-derived neurotrophic factor in the postnatal brain leads to obesity and hyperactivity. *Mol. Endocrinol.* 15:1748-1757.
60. Sotelo, C. 2004. Cellular and genetic regulation of the development of the cerebellar system. *Prog. Neurobiol.* 72:295-339.
61. Sundaresan, M., Z. X. Yu, V. J. Ferrans, K. Irani, and T. Finkel. 1995. Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* 270:296-299.
62. Suzukawa, K., K. Miura, J. Mitsushita, J. Resau, K. Hirose, R. Crystal, and T. Kamata. 2000a. Nerve growth factor-induced neuronal differentiation requires generation of Rac1-regulated reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.* 275:13175-13178.
63. Tarnok, K., K. Czondor, M. Jelitai, A. Czirok, and K. Schlett. 2008. NMDA receptor NR2B subunit over-expression increases cerebellar granule cell migratory activity. *J. Neurochem.* 104:818-829.
64. Tsatmali, M., E. C. Walcott, H. Makarenkova, and K. L. Crossin. 2006. Reactive oxygen species modulate the differentiation of neurons in clonal cortical cultures. *Mol. Cell Neurosci.* 33:345-357.
65. Vieira, H. L., P. M. Alves, and A. Vercelli. 2011. Modulation of neuronal stem cell differentiation by hypoxia and reactive oxygen species. *Prog. Neurobiol.* 93:444-455.
66. Wang, H., N. Ward, M. Boswell, and D. M. Katz. 2006. Secretion of brain-derived neurotrophic factor from brain microvascular endothelial cells. *Eur. J. Neurosci.* 23:1665-1670.
67. Wang, H., G. Yuan, N. R. Prabhakar, M. Boswell, and D. M. Katz. 2006b. Secretion of brain-derived neurotrophic factor from PC12 cells in response to oxidative stress requires autocrine dopamine signaling. *J. Neurochem.* 96:694-705.
68. Wang X, Wang Z, Yao Y, Li J, Zhang X, Li C, Cheng Y, Ding G, Liu L, Ding Z. 2011. Essential role of ERK activation in neurite outgrowth induced by α -lipoic acid. *Biochim Biophys Acta.* 1813(5):827-38.
69. Woo, C. H., Y. W. Eom, M. H. Yoo, H. J. You, H. J. Han, W. K. Song, Y. J. Yoo, J. S. Chun, and J. H. Kim. 2000. Tumor necrosis factor- α generates reactive oxygen species via a cytosolic phospholipase A₂-linked cascade. *J. Biol. Chem.* 275:32357-32362.

70. Wood, K. A., B. Dipasquale, and R. J. Youle. 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.
71. Yoneyama, M., K. Kawada, Y. Gotoh, T. Shiba, and K. Ogita. 2010. Endogenous reactive oxygen species are essential for proliferation of neural stem/progenitor cells. *Neurochem. Int.* 56:740-746.
72. Zhu, D., R. H. Lipsky, and A. M. Marini. 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* 23:11-17.
73. Zirrgiebel, U., Y. Ohga, B. Carter, B. Berninger, N. Inagaki, H. Thoenen, and D. Lindholm. 1995. Characterization of TrkB receptor-mediated signaling pathways in rat cerebellar granule neurons: involvement of protein kinase C in neuronal survival. *J. Neurochem.* 65:2241-2250.